



01674  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN PARENTERAL DE ACETATO DE  
MEDROXIPROGESTERONA EN LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE  
TESTOSTERONA, MORFOLOGÍA DEL TESTÍCULO Y DEL EPIDÍMIO Y  
CARACTERÍSTICAS DEL EYACULADO EN EL PERRO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**VERÓNICA GARZA MEDINA**

**ASESORES:**

**DRA. ROSA MARÍA PÁRAMO RAMÍREZ**

**DRA. IRMA VILLALPANDO FIERRO**

**DR. VALENCIA MÉNDEZ JAVIER**

**MÉXICO, D. F.**

**2003**

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

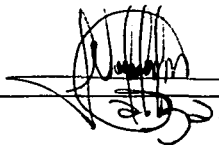
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DECLARACIÓN

---

---

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, de que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



A handwritten signature in black ink, consisting of several vertical strokes and a horizontal line, positioned above a horizontal line that spans the width of the signature.

*Las evidencias de la obriedad cortan las alas  
al pájaro inquieto de la imaginación  
J. Saramago*

*...por que cuando deseas algo tolo el mundo  
conspira para que lo logres  
P. Coelho*

*...El barro al barro, el polvo al polvo, la tierra a la tierra,  
nada empieza que no tenga fin,  
todo lo que comienza nace de lo que se acabó...  
...cada persona tiene su hiora....  
y cada cosa su tiempo.  
J. Saramago*

*¿No te parece imperdonable que solo hayamos calculado  
nuestra victoria y jamás nuestra derrota?  
M. Benedetti*

# DEDICATORIAS

---

## *A mi Madre*

*Por que a pesar de todos los escollos de nuestra relación siempre he contado con su gran amor y su valioso apoyo en cualquier circunstancia de mi vida.*

TQM

## *A mi abuela*

*Por que sé el gran amor que me profesa y por que aunque a veces nos separa la distancia y mis actividades ha luchado por mantenerse siempre a mi lado, apoyándome.*

## *A Jorge*

*Por su infinito apoyo incondicional y siempre desinteresado. Y por sus consejos tan apegados a la realidad.*

## *A Javier*

*Por todo su gran paciencia, su infinita tolerancia y su gran apoyo en esta aventura tan prolongada*

## *A José Juan*

*Por todo sus inapreciables consejos (siempre bien fundamentados) y por su apoyo para que yo pudiera concluir este proyecto.*

# AGRADECIMIENTOS

---

## *Al comité*

*Dra. Rosa María Páramo Ramírez: Por su tiempo.*

*Dr. Javier Valencia Méndez: Por su asesoría en este trabajo.*

*Dra. Irma Villalpando Fierro: Por haberme brindado mucho de su tiempo para la revisión de este trabajo, por su gran capacidad de escuchar y por sus consejos.*

*Dra. Lourdes Juárez Mosqueda: Por tu invaluable ayuda desde el principio hasta el final y en todos los aspectos de este trabajo, sencillamente no tengo palabras para expresarte mi infinito agradecimiento, así mismo, por haberme permitido acercarme a la órbita de tu vida*

*Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar: Por su apoyo en el análisis estadístico*

## *A Carlos Esquivel*

*Ante todo por su amistad y por su gran apoyo para la manutención de mis perritos*

## *Al Depto. De Morfología*

*Por todas las facilidades para la realización de este trabajo*

## *Al Sr. Francisco*

*Por su tesón para el trabajo, por su gran disposición para ayudar y por su amistad*

## *A Clara y Susana*

*Por su apoyo en los análisis hormonales*

*A Renato*

*Por el invaluable tiempo que me dedicó para correr el análisis estadístico y por permitirme conocer un poco de su vida*

*A Marta Elena y Estrella*

*Por tu amistad, aún cuando las cosas no resultaran tan gratas y por la gran ayuda en la parte experimental. No tengo palabras para expresarte lo importante que eres en mi vida*

*A Gisel*

*Por su gran amistad, consejos y ayuda, te estimo infinitamente.*

*A Nico y Laura*

*Por su gran amistad, paciencia y ayuda*

*A Rosa Elena*

*Por tu amistad, por permitirme conocerte y valorar la grandeza de ser humano y maestra que eres.*

*A CONACYT*

*Por el apoyo económico otorgado*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



*Sin libros, la Historia queda silenciosa, la Literatura muda,  
la Ciencia tullida y el pensamiento inmóvil.  
Barbara W. Tuchman*

*...Lo que la alta ciencia se esmera en suprimir es lo que el arte elevado  
se afana en provocar: el misterio, letal para aquella y vital para este.  
John Fowles*

*La gran tragedia de la ciencia es el asesinato  
de una bella hipótesis por una fea realidad.  
T. H. Huxley*

*Las palabras rebuscadas sirven para nombrar las cosas pequeñas.  
Las cosas grandes tienen nombres sencillos.  
Anónimo*

# CONTENIDO

---

	<i>Páginas</i>
<i>I</i> INTRODUCCIÓN.....	1
<i>II</i> REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Células germinales primordiales y diferenciación celular.....	3
2.2. Histología.....	4
2.2.1. Túbulo seminífero.....	4
2.2.2. Epidídimo.....	5
2.3. Espermatogénesis.....	7
2.3.1. Espermatocitogénesis.....	7
2.3.2. Meiosis.....	7
2.3.3. Espermiogénesis.....	8
2.3.4. Espermiación.....	10
2.4. Ciclo del epitelio seminífero.....	10
2.5. Control endocrino de la espermatogénesis.....	11
2.6. Control local de la función testicular.....	13
2.7. Función de las células de Sertoli.....	14
2.8. Maduración espermática.....	15
2.8.1. Formación de los dominios de la membrana plasmática.....	16
2.8.2. Mecanismos de transporte.....	17
2.8.3. Almacenamiento.....	17
2.9. Morfología del espermatozoide.....	17
2.9.1. Cabeza.....	18
2.9.2. Acrosoma.....	18

2.9.3.	Flagelo.....	18
2.10.	Generalidades del semen canino.....	19
2.10.1.	Obtención.....	19
2.10.2.	Características.....	20
2.10.3.	Evaluación.....	20
2.11.	Efecto de los progestágenos como anticonceptivos en el macho.....	21
2.11.1.	Metabolismo.....	22
2.11.2.	Establecimiento de la dosis.....	22
2.11.3.	Efecto del MPA en los niveles hormonales.....	23
2.11.4.	Efecto en el testículo y el epidídimo.....	24
2.11.5.	Efecto en el eyaculado.....	24
<b>III</b>	<b><i>HIPÓTESIS</i></b> .....	<b>26</b>
<b>IV</b>	<b><i>OBJETIVOS</i></b> .....	<b>27</b>
4.1.	Evaluar el efecto de la aplicación parenteral de MPA en la concentración plasmática de testosterona.....	27
4.2.	Investigar si se producen cambios histológicos en testículo y epidídimo.....	27
4.3.	Determinar si la aplicación de MPA induce cambios en el eyaculado.....	27
4.4.	Identificar los cambios morfológicos en el espermatozoide.....	27
<b>V</b>	<b><i>MATERIAL Y MÉTODOS</i></b> .....	<b>28</b>
5.1.	Localización de la muestra experimental.....	28
5.2.	Animales.....	28
5.3.	Tratamiento.....	28
5.4.	Muestreo sanguíneo y medición de testosterona.....	28
5.5.	Colección y evaluación de semen.....	29
5.6.	Histología.....	30
5.7.	Análisis estadístico.....	30
<b>VI</b>	<b><i>RESULTADOS</i></b> .....	<b>31</b>

6.1.	Efecto de la aplicación parenteral de MPA en los niveles plasmáticos de testosterona .....	31
6.2.	Efecto en el testículo y en el epidídimo .....	31
6.2.1.	Testículo.....	31
6.2.2.	Cabeza de epidídimo.....	31
6.2.3.	Cuerpo del epidídimo.....	32
6.2.4.	Cauda del epidídimo.....	32
6.3.	Efecto en el eyaculado del perro .....	32
6.3.1.	Volumen de eyaculado.....	33
6.3.2.	Concentración espermática.....	33
6.3.3.	Mortalidad espermática.....	33
6.4.	Efecto en la morfología espermática.....	34
 <i>VII DISCUSIÓN.....</i>		<i>35</i>
7.1.	Efecto en los niveles plasmáticos de testosterona.....	36
7.2.	Efecto en la histología del testículo y del epidídimo.....	37
7.3.	Efecto en el eyaculado.....	38
7.3.1.	Volumen de eyaculado.....	38
7.3.2.	Concentración espermática.....	38
7.3.3.	Mortalidad espermática.....	39
7.4.	Efecto en la morfología espermática.....	39
 <i>VIII CONCLUSIONES.....</i>		<i>41</i>
 <i>IX REFERENCIAS.....</i>		<i>43</i>
 <i>X ANEXO.....</i>		<i>52</i>

## *LISTA DE CUADROS Y FIGURAS*

---

---

CUADRO 1.....	56
CUADRO 2.....	57
CUADRO 3.....	58
CUADRO 4.....	60
CUADRO 5.....	62
CUADRO 6.....	63
CUADRO 7.....	64
FIGURA 1.....	57
FIGURA 2.....	59
FIGURA 3.....	61
FIGURA 4.....	62
FIGURA 6 y 7.....	65
FIGURA 8 y 9.....	66
FIGURA 10 y 11.....	67
FIGURA 12 y 13.....	68
FIGURA 14 y 15.....	69
FIGURA 16 y 17.....	70

# RESUMEN

---

---

**GARZA MEDINA VERÓNICA** Efecto de la aplicación parenteral de acetato de medroxiprogesterona en la concentración plasmática de testosterona, morfología del testículo y epidídimo y características del eyaculado del perro. MVZ Ph D. Páramo Ramírez Rosa María, Dr. Valencia Méndez Javier y Dra. Villalpando Fierro Irma

Los progestágenos se han utilizado como anticonceptivos en la mujer desde la década de 1960; su empleo en el hombre es reciente y en la mayoría de estas investigaciones se han utilizado en combinación con otras hormonas. Actualmente no existe información suficiente a cerca de su mecanismo de acción en el macho. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la administración parenteral de acetato de medroxiprogesterona como único fármaco, produce cambios en la concentración plasmática de testosterona, en la morfología del testículo, y epidídimo y en las características del eyaculado del perro. Se utilizaron 12 perros divididos en 2 grupos de 6; al primero se le aplicó 1 dosis de 20 mg/kg de acetato de medroxiprogesterona por vía subcutánea y al segundo, únicamente solución salina fisiológica. Con el fin de determinar los cambios producidos tanto en la concentración plasmática de testosterona, como en la calidad del semen, se muestreó a todos los perros, 1 vez por semana, comenzando un mes antes de la aplicación del fármaco y concluyendo tres meses después. La determinación de los niveles de testosterona se realizó por medio de radioinmunoanálisis. En la evaluación del semen se midió el volumen y se evaluó la concentración, morfología y mortalidad espermática, para estas últimas se utilizaron la triple tinción y Spermac. A los 3 meses postratamiento, se castraron a todos los animales para valorar los cambios histológicos producidos en el testículo, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo. El análisis estadístico de las variables de respuesta se realizó por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas ( $p < 0.05$ ). De los parámetros medidos en este experimento, únicamente se encontró diferencia significativa en la concentración plasmática de testosterona (ng/ml) para dos periodos, el primero comprendido entre el día 23 ( $1.27 \pm 0.36$  y  $3.70 \pm 0.36$ ) y el 37 ( $0.90 \pm 0.36$  y  $2.84 \pm 0.36$ ) y el segundo en el día 47 ( $2.31 \pm 0.36$  y  $3.70 \pm 0.36$ ), 61 ( $1.61 \pm 0.36$  y  $3.06 \pm 0.36$ ) y 68 ( $1.15 \pm 0.36$  y  $2.79 \pm 0.36$ ) para el grupo tratado y control respectivamente. Por lo anterior se concluye, que el tratamiento único de 20 mg/kg de acetato de medroxiprogesterona por vía subcutánea pudo disminuir significativamente la concentración plasmática de testosterona, sin embargo, este efecto no produjo cambios aparentes en la calidad del semen ni tampoco alteraciones histológicas en testículo y en epidídimo durante los tres meses que se evaluó. Se requieren más estudios para determinar si aplicaciones repetidas de este fármaco son capaces de inducir alteraciones en la calidad del semen y en la morfología testicular y del epidídimo.

**Palabras clave:** anticoncepción, anticoncepción en el macho, agentes anticonceptivos, progestágenos; acetato de medroxiprogesterona en el macho, testosterona, hormonales en macho.

# ABSTRACT

---

**GARZA MEDINA VERÓNICA** Parenteral administration effect of medroxiprogesterone acetate in the plasmatic concentration of testosterone, testicular and epididymal morphology and characteristics of the dog ejaculate. **MVZ Ph D. Páramo Ramírez Rosa María, Dr. Valencia Méndez Javier y Dra. Villalpando Fierro Irma**

Progestagens have been used as contraceptives in women since the sixties; their use in men is recent and in most research, it has been used in combination with other hormones. At present there is not enough information about their action mechanisms in the male. The goal of this work was to determine if the parenteral administration of medroxiprogesterone acetate (MPA) as a single hormone, produces alterations in the plasmatic concentration of testosterone, in the testicular and epididymal morphology and in the characteristics of the dogs ejaculate. 12 dogs were divided into equal groups; the first one received one dose of 20 mg/kg of body weight of MPA by subcutaneous route. In the second group, only physiologic saline solution was administered. With the purpose of determining the changes produced in the plasmatic concentration of testosterone in the semen quality, samples were taken from the dogs of both groups once a week. The procedure began one month before the application of the hormone and it was concluded three months later. The testosterone was determined by radioimmunoassay. The spermatic volume, concentration, morphology and mortality were evaluated in the ejaculate by triple stain and Spermac. All the animals were castrated three months posttreatment in order to determine the histological changes in the testicle and in the epididymal head, body and tail. The statistical design consisted of analyses of variance for repeated measures ( $p < 0.05$ ). The only significant statistical difference was found in the plasmatic concentration of testosterone (ng/ml) for two periods. The first between day 23 ( $1.2 \pm 0.36$  and  $3.70 \pm 0.36$ ) and day 37 ( $0.90 \pm 0.36$  and  $2.84 \pm 0.36$ ) and the second one following day 47 ( $2.31 \pm 0.36$  and  $3.70 \pm 0.36$ ), 61 ( $1.61 \pm 0.36$  and  $3.06 \pm 0.36$ ) and 68 ( $1.15 \pm 0.36$  and  $2.79 \pm 0.36$ ) for the treated and the control group respectively. The conclusion of this work is that single treatment with 20 mg/kg body weight of MPA by subcutaneous route reduced significantly the plasmatic concentration of testosterone, however this effect did not produce apparent changes in the semen quality nor histological alterations in the testicle and epididymis, during the three months evaluated. More studies are required to determine if repeated applications of this product are capable of inducing changes in the semen quality and in the testicular and epididymal morphology.

**Key words:** Anticonception, male anticonceptions, anticonceptive agents progestagens, medroxiprogesterone acetate in males, testosterone or hormones in male.

# I INTRODUCCIÓN

---

Los progestágenos se han utilizado como un método anticonceptivo en la mujer desde la década de 1960 (Wu, 1988; Agencia de los EE UU para el desarrollo internacional, 1995; Rosenstein, 1996); su empleo con el mismo fin en el varón, es reciente (Schaffenburg y col., 1981; Wu y Aitken, 1989; Foresta y col., 1992; Lincoln, 1992); y en la mayoría de los casos se han empleado en combinación con andrógenos o estrógenos. Hasta la fecha, es poca la información disponible acerca del mecanismo de acción de estos fármacos en el macho y en el hombre, por lo que su uso como un método de anticoncepción hormonal, no es considerada una práctica común en la clínica. A esto se suma el hecho de que no se ha podido estandarizar una dosis de progestágenos como la que se ha logrado en el caso de la hembra y la mujer. Además, no se encuentran datos adicionales acerca de qué progestágenos u otros compuestos hormonales pueden ser más eficaces, ni tampoco se tienen datos puntuales de las posibles combinaciones que se pueden hacer de éstos con los otros fármacos, para con ellos obtener resultados más seguros, eficaces y con menos efectos colaterales (Schaffenburg y col., 1981; England, 1995).

En medicina humana, por razones éticas y metodológicas, no se puede realizar la castración experimental en los hombres, con el fin de investigar qué efectos produce la aplicación de estos compuestos hormonales en el testículo y epidídimo. Además, resulta difícil obtener de manera constante, eyaculados frescos para su evaluación inmediata. Debido a esto, es necesario recurrir a modelos experimentales animales, tales como el perro. En esta especie, al igual que en el hombre, existen importantes razones para abrir nuevas líneas de investigación, que puedan aportar una mayor información acerca de los agentes anticonceptivos utilizados.

Una de las principales razones es la sobrepoblación canina, ya que representa un grave problema de salud pública, no solo en México, sino a nivel mundial y ésta sigue en aumento, a pesar de los múltiples esfuerzos realizados para su control (Carter, 1990; Slater, 2001). Desde el punto de vista de salud pública, los perros son portadores de enfermedades zoonóticas como la rabia (Jöchle,



1991; Matter y col., 2000; Slater, 2001), así como de padecimientos bacterianos y parasitarios, esto último debido a la gran cantidad de excretas depositadas en las calles (Faulkner, 1975; Olson y col., 1989a). El método de sacrificio no ha constituido una solución eficaz (Faulkner, 1975; Méndez, 1986; Slater, 2001). En la ciudad de México, tan solo se logra sacrificar una décima parte de la población canina callejera (Méndez, 1986).

Una solución más adecuada para disminuir la sobrepoblación canina sería el control de su reproducción, para lo cual se hace necesario diversificar los métodos anticonceptivos (Olson y col., 1989a; Olson y col., 1989b). Sin embargo, la gran mayoría de éstos son quirúrgicos (Slater, 2001) y están enfocados principalmente a la hembra. Los métodos hormonales resultan ser una mejor opción, pero al igual que los anteriores, han sido estudiados en la hembra que en el macho (Méndez, 1986; Garza, 1996).

Otra razón para utilizar al perro como modelo experimental, es que su endocrinología reproductiva ha sido escasamente estudiada (England, 1995). Por tal motivo, la investigación sobre la acción de los esteroides exógenos, podría ampliar el entendimiento de la fisiología de la reproducción en el macho (England, 1995). Adicionalmente, el perro podría ser utilizado como un modelo experimental para valorar el efecto de la aplicación de diferentes fármacos que puedan ser usados como un método anticonceptivo en el hombre (England, 1995). Por lo tanto, los protocolos de tratamiento que resultaran eficaces podrían ser aplicados para estos fines en ambas especies (England, 1995). Actualmente, los progestágenos con fines anticonceptivos en el hombre, continúan probándose (Schaffenburg y col., 1981; Wu y Aitken, 1989; England, 1995). En el perro se utilizan con la finalidad de controlar el comportamiento sexual indeseado; problemas de hiperplasia prostática (Olson y col., 1989b; Christiansen, 1989; Jonhston y col., 2001; England, 2000) y más recientemente se están utilizando como un posible método de anticoncepción (Olson y col., 1989b; Christiansen, 1989; Páramo, y col. 1993; England, 1995; England, 2000; Jonhston y col., 2001).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la administración parenteral de un progestágeno sintético, el acetato de medroxiprogesterona (MPA), produce cambios en la concentración plasmática de la testosterona, en la morfología del testículo, del epidídimo y en las características del eyaculado del perro.

## II REVISIÓN DE LITERATURA

---

### 2.1. Células germinales primordiales y diferenciación gonadal

Durante el desarrollo embrionario, las células germinales primordiales (CGP), están situadas en el endodermo de la parte superior del saco vitelino (Baker, 1982; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996), cerca de la membrana alantoidea que se encuentra en desarrollo. De esta zona migran hacia la pared ventral del intestino (mesonefros) (Baker, 1982), luego al primordio gonadal adyacente (crestas gonadales o gónadas indiferenciadas) (Baker, 1982; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996) y de ahí hacia la región medular para después dar lugar a la formación de un testículo (Baker, 1982). Este desplazamiento se presenta debido a que las células germinales primordiales emiten pseudópodos para movilizarse sobre o a través de los tejidos (Baker, 1982). Se ha propuesto que las crestas gonadales, producen una sustancia quimiotáctica (teloferón) que atrae a las células sexuales primitivas. Durante la migración de las CGP hacia las crestas gonadales, éstas se van multiplicando (Baker, 1982).

Cada una de las futuras gónadas (primordios o crestas gonadales) están formadas de una capa de epitelio celómico delgado que recubre un acúmulo de tejido mesenquimatoso (Baker, 1982). Cuando las CGP alcanzan el área presuntiva de las gónadas, se asocian con los elementos celulares del epitelio celómico del embrión, moviéndose a lo largo del tejido mesenquimatoso entre el mesonefros y el epitelio celómico. Una vez en las gónadas, las CGP continúan dividiéndose por mitosis. Es en esta etapa donde se presenta la diferenciación en espermatozoides u ovocitos. El cromosoma Y es el factor determinante en el desarrollo de un macho, pues este cromosoma es quien determina el sexo del individuo, ya que induce a las células somáticas de las crestas gonadales a diferenciarse en un testículo en lugar de un ovario. El gen crucial en el cromosoma Y, que tiene la función de determinar el desarrollo testicular ha sido llamado Sry (Sex-determining region of Y, es decir Región de determinación sexual de Y).

El gen Sry se expresa únicamente en un grupo de células somáticas de la gónada en desarrollo y provoca que estas se diferencien en células de Sertoli, que son el tipo principal de células de sostén encontradas en el testículo. Las células de Sertoli dirigen el desarrollo de un macho, al afectar a otras células en la cresta gonadal, por lo menos de 4 formas:

1. Estimulan a las recién establecidas CGP a desarrollarse por la vía que produce a los espermatozoides.
2. Secretan la hormona antimülleriana, que suprime el desarrollo del tracto reproductor femenino.
3. Estimulan a determinadas células somáticas, que quedan adyacentes a la gónada en desarrollo, a migrar dentro de la gónada y forma las estructuras de tejido conectivo necesarias para la producción normal de espermatozoides.
4. Las células de Sertoli ayudan a inducir a otras células somáticas en la gónada en desarrollo a convertirse en las células de Leydig (Alberts 1996).

Por otra parte, las células mesonéfricas en crecimiento, forman los cordones sexuales que conectan al mesonefros o a los túbulos mesonéfricos y las gónadas. Los cordones sexuales comienzan a desarrollarse de la parte ventral central del túbulo hacia la periferia. Estos cordones testiculares encierran a las espermatogonias junto con las células de Sertoli. Los cordones testiculares son formados en conexión con los cordones celulares mesonéfricos en crecimiento. Esta conexión permanece a través del desarrollo para construir la red testicular (Bysson, 1990).

## 2.2. Histología del testículo y del epidídimo

Una vez que se establece la madurez sexual los cordones testiculares desarrollan un lumen, formando los túbulos seminíferos, que contienen a las células de soporte. Estas cesan de dividirse y se convierten en las células de Sertoli. Los túbulos también contienen a las células germinales en desarrollo (Baker, 1982; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996) que experimentan divisiones celulares y cambios que comienzan en la periferia y avanzan hacia la luz del túbulo (Baker, 1982; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996).

### 2.2.1. Túbulo seminífero

El testículo adulto esta compuesto por grandes cantidades de túbulos seminíferos altamente contorneados, que contienen tres tipos de células:

**Células mioideas:** Rodean al túbulo seminífero y derivan de elementos del tejido conjuntivo intersticial primitivo; poseen características de músculo liso y son contráctiles, pero tienen una forma atípica y una organización epiteloide (Fawcett, 1989). Se ha propuesto que estas células son las responsables de las contracciones rítmicas y débiles que se observan en los túbulos seminíferos (Fawcett, 1989).

**Células de Leydig:** Son células grandes con citoplasma vacuolado, núcleo y retículo endoplásmico liso bien desarrollado. Se encuentran en grupos compactos, alojadas en las áreas angulares creadas por la asociación de varios túbulos seminíferos. (Lesson y col., 1987).

**Células de Sertoli:** Son células de soporte de forma piramidal y grandes, con su base fija en la membrana basal y con el vértice que se extiende hacia el conducto (Foote, 1972; Monesi, 1982; Orsi, 1983; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992), sus límites no pueden distinguirse claramente, su núcleo es ovoide con dos nucleolos grandes (Monesi, 1982; Fawcett, 1989). El citoplasma exhibe finas prolongaciones que rodean a las células germinales, exceptuando a las células espermatogónicas, que se encuentran en estrecho contacto con su membrana basal (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992). Estas células forman uniones estrechas que dividen el revestimiento del túbulo seminífero en tres compartimentos; el basal que contiene espermatogonias y espermatocitos preleptoténicos (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992); el intermedio, formado por la transición de células en leptoteno del compartimento basal y adluminal (Russel, 1990) y el luminal, compuesto por espermatocitos primarios, secundarios y espermátides (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992).

**Células espermatogónicas:** Existen diferentes tipos:

**Espermatogonias:** El tipo A tiene un núcleo que puede variar de esférico a ovoide, contiene gránulos muy finos de cromatina distribuidos a lo largo de la envoltura nuclear y tiene dos nucleolos centrales (Foote, 1972; Monesi, 1982; Fawcett, 1989). Las espermatogonias de tipo B, se caracterizan por tener gránulos finos de cromatina adheridos a la envoltura del núcleo (Foote, 1972; Monesi, 1982).

**Espermatocitos primarios:** Son células redondas, con núcleo esférico y pequeño, que contiene cromatina finamente dispersa y varias masas de cromatina más oscura (Foote, 1972; Monesi, 1982). A medida que se separan de la lámina basal del epitelio germinal, van acumulando más citoplasma y se agrandan (Fawcett, 1989).

**Espermatocitos secundarios:** Son células más pequeñas que los espermatocitos primarios, con núcleo esférico también, pero de menor tamaño y membrana nuclear clara. La cromatina se encuentra distribuida homogéneamente y en gránulos unidos por filamentos (Foote, 1972).

**Espermátides:** Son células pequeñas, esféricas o poligonales, con núcleo pequeño, de cromatina finamente granular. En este estadio, como se explicará más adelante se pueden observar los gránulos proacrosómicos, ricos en glicoproteínas y que finalmente darán lugar al acrosoma (Stevens y Lowe 1992).

### 2.2.2. Epidídimo

El epidídimo está recubierto con un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, en el que se distinguen 2 tipos celulares; las células basales y las células principales; contiene además, macrófagos y

linfocitos (Fawcett, 1989; Palacios y col., 1993). Este órgano se divide en tres regiones que están relacionadas con los cambios en la capacidad de motilidad y fertilidad espermática:

**Cabeza:** Se encuentra cerca del conducto eferente (Orsi, 1983), tiene un lumen muy extenso donde se observan grandes cantidades de células exfoliadas y espermatozoides (Orsi, 1983). Esta región se encuentra revestida por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado muy alto, con numerosas microvellosidades atípicas muy largas e inmóviles llamadas estereocilios (Orsi, 1983; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe 1992). Contiene también una población de células basales, redondas, pequeñas con una proporción núcleo-citoplasma muy elevada. Estas se sitúan sobre la membrana basal y se cree que son las precursoras de las células altas (Stevens y Lowe 1992). Por fuera, el conducto epididimal está rodeado por una delgada vaina de músculo liso circular (Orsi, 1983; Stevens y Lowe, 1992), células de tejido conjuntivo y fibroblastos (Orsi, 1983).

**Cuerpo:** A este nivel el lumen es más pequeño y casi no contiene espermatozoides, pero sí material de exfoliación y eosinófilos (Orsi, 1983). Tiene un epitelio pseudoestratificado más bajo y extremadamente vacuolado (Orsi, 1983); las microvellosidades son más cortas y también se encuentran células basales (Fawcett, 1989). La capa externa del túbulo es incompleta y contiene algunos cordones de células musculares lisas con disposición longitudinal y oblicua (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992), el tejido intersticial es abundante (Orsi, 1983).

**Cauda:** Es la región que desemboca al conducto deferente y en su lumen hay grandes cantidades de espermatozoides (Orsi, 1983). El epitelio que recubre este segmento es cuboidal muy bajo, con estereocilios muy cortos y abundantes. Las células basales tienen la misma disposición que en los otros segmentos (Orsi, 1983; Fawcett, 1989). La región peritubular está constituida por una capa muscular longitudinal interna, una circular y otra capa longitudinal externa (Stevens y Lowe 1992).

Entre los estereocilios, la superficie celular es irregular y muestra numerosas invaginaciones que sugieren una pinocitosis activa (Fawcett, 1989). Hay un gran número de vesículas revestidas y cuerpos multivesiculares grandes en el citoplasma apical, lo cual sugiere una función absorbente del epitelio epididimal, pues más del 90% del líquido que sale del testículo es reabsorbido en los conductos eferentes y el epidídimo (Fawcett, 1989).

En la transición del cuerpo a la cauda hay grandes células musculares lisas, que se añaden a las más pequeñas. En la porción distal de la cauda, la capa muscular está compuesta únicamente de dos estratos y se transforma en una capa de tres, la cual sufre un engrosamiento conforme se va acercando al conducto deferente (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe 1992).

Las diferencias histológicas de la musculatura, se acompañan también de diferencias en la motilidad del epidídimo. Así, en la cabeza y el cuerpo, donde predominan las células musculares finas, el epidídimo experimenta contracciones peristálticas rítmicas, espontáneas e independientes de la estimulación nerviosa, que sirven para transportar a los espermatozoides a lo largo de su luz.

Las fibras musculares lisas mayores que predominan en la región caudal, necesitan una estimulación nerviosa simpática adrenérgica, dado que éste es el lugar principal para el almacenamiento de los espermatozoides (Fawcett, 1989).

### **2.3. Espermatogénesis**

Es el proceso mediante el cual las espermatogonias se transforman en espermatozoides a través de divisiones mitóticas y meióticas (Russell y col., 1990).

La espermatogénesis se divide en tres etapas:

#### **2.3.1. Espermatocitogénesis**

Una vez establecida la pubertad se forman las espermatogonias tipo A0, estas se dividirán por mitosis y darán lugar a las espermatogonias tipo A1 y así progresivamente hasta formar el tipo A4 (Baker, 1982; Garner y Hafez, 1996). Esta última se divide otra vez para formar espermatogonias intermedias y luego el tipo B (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996). Estos distintos tipos de espermatogonias, son la base para la proliferación de la línea de células germinales (Baker, 1982; Garner y Hafez, 1996). Las espermatogonias A2 no solo producen muchas células germinales que darán origen a los espermatozoides, sino que también experimentan una división específica para reponer la población de espermatogonias tipo A1 (Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Al parecer, las espermatogonias de reserva tipo A0 reponen la población de células madre (Garner y Hafez, 1996).

#### **2.3.2. Meiosis**

Las espermatogonias tipo B se dividen una o dos veces para formar los espermatocitos primarios, los cuales duplican su DNA ( $4n$ ) inmediatamente después de su formación y experimentan cambios nucleares progresivos de la primera profase meiótica (dividida en 4 estadios preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y díploteno), antes de dividirse para formar los espermatocitos secundarios (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Es en la etapa de paquiteno, donde los espermatocitos primarios emparejan sus cromosomas homólogos para realizar el intercambio de material genético y después continúan con la división I de la meiosis produciendo 2 espermatocitos secundarios, cada uno de los cuales contiene sus cromosomas autosómicos duplicados y un cromosoma X o Y duplicados (Fawcett, 1989; Alberts y col., 1996). Sin una síntesis posterior de DNA, los espermatocitos secundarios resultantes presentan la segunda división meiótica para formar cuatro células haploides conocidas como espermátides (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996).

### 2.3.3. Espermiogénesis

Es el conjunto de cambios morfológicos progresivos mediante los cuales, las espermátides redondas se transforman en espermatozoides (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996). Consta de 4 fases:

**Fase de Golgi:** Se forman los gránulos proacrosómicos provenientes del aparato de Golgi (Monesi, 1982; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996) hasta que coalescen en uno solo. Se lleva a cabo la adhesión del gránulo acrosómico resultante a la envoltura nuclear y se desarrollan las etapas tempranas de la formación del flagelo en el polo opuesto al de la adhesión del polo proacrosómico (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996). El centriolo proximal se acerca al núcleo, en el polo opuesto y es ahí donde se forma la base para la unión del flagelo con la cabeza (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996).

**Fase de casquete:** En esta fase se lleva a cabo la dispersión del gránulo acrosómico, adherido en la superficie apical del núcleo de la espermátide (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996). Este proceso continúa hasta que aproximadamente 2/3 de la porción anterior del núcleo de cada espermátide, quedan cubiertos por un delgado saco membranoso de doble capa, que se adhiere íntimamente a la envoltura nuclear (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996). Durante esta fase los componentes axonémicos, formados a partir de elementos del centriolo distal, se alargan más allá de la periferia del citoplasma celular (Garner y Hafez, 1996). Durante las primeras etapas de formación, la estructura del axonema consta únicamente de 2 microtúbulos centrales, rodeados por 9 pares de microtúbulos en la periferia (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996).

**Fase acrosómica:** Se presentan cambios en el núcleo, el acrosoma y el flagelo de la espermátide (Monesi, 1982; Russell, 1990; Garner y Hafez, 1996). Estos cambios son facilitados por la rotación de cada espermátide, de modo que el acrosoma se dirige hacia la base del tubo seminífero y la cauda hacia la luz (Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996). Los cambios nucleares incluyen condensación de la cromatina en gránulos densos y la remodelación del núcleo de esferoide a alargado y aplanado (Monesi, 1982; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996; Garner y Hafez, 2000). La cromatina condensada está formada por DNA y unas proteínas especiales llamadas protaminas. En esta etapa la sustitución de las histonas nucleares por las protaminas es con la finalidad de conferir una mayor estabilidad y un mayor grado de compactación al DNA espermático (Garner y Hafez, 2000). El acrosoma que se encuentra íntimamente adherido al núcleo, también se condensa y se alarga de manera que concuerda con

éste (Garner y Hafez, 1996). La formación del acrosoma es un proceso lento pero continuo y se completa hasta después de la espermiogénesis (Russell, 1990).

Los cambios en la morfología nuclear, son acompañados por el desplazamiento del citoplasma hacia la parte caudal del núcleo, donde el citoplasma rodea la parte proximal del flagelo en desarrollo (Garner y Hafez, 1996). Dentro de este citoplasma los microtúbulos se asocian y forman una vaina cilíndrica temporal llamada *manguito* y rodea laxamente al axonema (Garner y Hafez, 1996). Dentro del manguito cilíndrico, se encuentra un cuerpo cromatoide, estructura citoplasmática especializada, que se condensa alrededor del axonema para formar el anillo citoplasmático (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996). Este anillo se forma cerca del centriolo proximal y después migra en sentido posterior a lo largo del flagelo (Garner y Hafez, 1996). Las mitocondrias, que antes estaban distribuidas por todo el citoplasma de la espermátide, comienzan a concentrarse cerca del axonema, donde forman la vaina que caracteriza al segmento medio del flagelo (Fawcett, 1989; Monesi, 1982; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996).

**Fase de maduración:** Esta fase comprende la transformación final de las espermátides alargadas, en células que serán liberadas en la luz del túbulo seminífero como espermatozoides (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996). Dentro del núcleo, los gránulos de cromatina experimentan una condensación progresiva hasta que se transforman en un fino material homogéneo, que llena de manera uniforme todo el núcleo espermático (Hafez y Garner, 1996).

Durante ésta fase, se forma la vaina fibrosa y las 9 fibras gruesas subyacentes alrededor del axonema, que se asocian individualmente con los 9 pares de microtúbulos de éste y además se continúan con las fibras presentes en la pieza de conexión del cuello de la espermátide (Garner y Hafez, 1996). La vaina fibrosa cubre a las fibras gruesas desde la pieza principal hasta el inicio del segmento caudal (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996), en la pieza final del flagelo no hay vaina fibrosa ni fibras externas (Monesi, 1982). El anillo citoplasmático migra caudalmente desde su posición adyacente al núcleo por todo lo largo del flagelo, hasta un punto en el que más tarde separará a la pieza media de la pieza principal de éste (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996). Las mitocondrias se empaquetan apretadamente en una vaina continua que se extiende desde el cuello hasta el anillo citoplasmático en forma espiral (Garner y Hafez, 1996; Monesi, 1982).

Durante las últimas etapas de la espermiogénesis, el manguito desaparece y se forma el llamado cuerpo residual (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996); que contiene gran número de ribosomas, membranas de Golgi, gotitas de lípidos y mitocondrias en degeneración (Baker, 1982; Monesi, 1982). El cuerpo residual permanece unido a la espermátide alargada por medio de un delgado filamento citoplasmático, también está interconectado con otros cuerpos residuales mediante puentes intercelulares resultantes de la división incompleta de las células germinales durante la espermatocitogénesis (Garner y Hafez, 1996). Este mecanismo probablemente se establece para



coordinar el desarrollo simultáneo de las células germinales como grupo (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996). Con este hecho, también se puede explicar por qué los espermatozoides maduros surgen sincrónicamente en cualquier área del túbulo seminífero (Fawcett, 1989; Alberts y col., 1996). La presencia de estos sincitios significa que cada espermatozoide haploide en desarrollo comparte un citoplasma común con sus vecinos, de forma que puede ser abastecido con todos los productos de un genoma diploide completo (Fawcett, 1989; Alberts y col., 1996). Así el genoma diploide dirige la diferenciación de los espermatozoides (Alberts y col., 1996).

#### 2.3.4. Espermiación

Es la liberación de las células germinales maduras hacia la luz de los túbulos seminíferos (Garner y Hafez, 1996). Las espermátides alargadas que se orientan perpendicularmente a la pared tubular, sobresalen poco a poco hacia la luz del túbulo (Garner y Hafez, 1996).

La extrusión de los componentes espermáticos continúa, hasta que solo un delgado tallo de citoplasma conecta el cuello de la espermátide con el cuerpo residual (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996). Con la rotura del tallo se forma la inclusión citoplasmática en la región del cuello de los espermatozoides liberados y se retienen los cuerpos residuales interconectados (Fawcett, 1989; Garner y Hafez, 1996). Después de la liberación de los espermatozoides, los cuerpos residuales son eliminados por las células de Sertoli, quienes no solo los fagocitan, sino que también eliminan cantidades considerables de células germinales degeneradas que no llegan a convertirse en espermatozoides (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996).

#### 2.4. Ciclo del epitelio seminífero

La comprensión del desarrollo de las células germinales se relaciona directamente con el ciclo del epitelio seminífero. La cinética de la espermatogénesis se caracteriza por 3 fenómenos esenciales:

- En cualquier segmento del túbulo seminífero, las células del tallo germinal inician una serie de divisiones mitóticas que preceden a la meiosis en intervalos extremadamente regulares.
- Una vez que las células del tallo germinal han iniciado el proceso de multiplicación y diferenciación, cada paso de la espermatogénesis tiene una duración fija y constante.
- En cualquier área del epitelio seminífero, antes de que la producción haya logrado la formación de espermatozoides, varias series nuevas de células del tallo germinal inician su desarrollo; el cual ocurre simultáneamente (Monesi, 1982).

Estos factores explican la típica alineación de las células germinales, a lo largo del epitelio seminífero (Monesi, 1982).

Se llama **ciclo del epitelio seminífero** al intervalo de tiempo que transcurre entre 2 apariciones sucesivas de la misma fase de desarrollo dentro de cada generación celular en cualquier área del

túbulo seminífero (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996). Es decir, es la serie de cambios que tienen lugar en un área determinada del epitelio entre 2 apariciones de la misma asociación celular (Fawcett, 1989). Las etapas del ciclo del epitelio seminífero cambian no solo con el tiempo sino también a lo largo del asa tubular (Foote, 1972; Garner y Hafez, 1996).

Se conoce como **onda del epitelio seminífero** a cada serie completa de segmentos adyacentes que contienen las asociaciones celulares típicas del ciclo (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996). Es decir, es la distancia entre 2 asociaciones celulares idénticas sucesivas (Fawcett, 1989).

El examen a lo largo de un asa del túbulo seminífero, también revela que en la onda participa una secuencia de etapas, que comienzan con las menos avanzadas a la mitad del asa y continúan con etapas progresivamente más avanzadas cerca de la red testicular (Garner y Hafez, 1996).

En el perro, la duración de un ciclo del epitelio seminífero es de 13-14 días y está dividido en 8 estadios. Todo el ciclo incluyendo el tiempo de maduración del espermatozoide en el epidídimo hasta ser eyaculado, tiene una duración de 54-60 días (Foote, 1972).

La duración del ciclo, es decir la tasa de desarrollo de las células germinales, es una constante para cualquier especie y no se ve afectada por cambios en las condiciones fisiológicas tales como la elevación de la temperatura, la hipofisectomía o la exposición a rayos X (Monesi, 1982). Estos factores influirán en la eficiencia de la espermatogénesis por medio de una degeneración celular, pero no afectarán la tasa de espermatogénesis (Monesi, 1982). Esto pudiera deberse a que las células germinales del epitelio seminífero (espermatogonias, espermatocitos y espermátides) son muy sensibles a enfermedades infecciosas, deficiencias alimenticias, inflamación local y exposición a rayos X, induciendo cambios degenerativos (Monesi, 1982). En cambio, las células de Sertoli de un testículo sexualmente maduro difícilmente se dividen y son asombrosamente resistentes a varios agentes dañinos incluyendo las radiaciones X (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992).

## **2.5. Control endocrino de la espermatogénesis**

Para el funcionamiento testicular normal, se requiere del estímulo hormonal de las gonadotropinas, quienes son controladas por la secreción pulsátil del factor liberador de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo (Austin, 1982; Garner y Hafez, 1996; Amory y Bremner, 2002). El GnRH estimula a la adenohipófisis para que secrete Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH); glicoproteínas que actúan sobre las células de Sertoli y de Leydig respectivamente (Austin, 1982; Russell, 1990; Páramo, y col. 1993; Purswell y Freeman, 1993; Ellington, 1994; Garner y Hafez, 1996; Bazer y col., 1996; Amory y Bremner, 2002).

Las células de Leydig tienen en su superficie receptores para LH y responden a su estimulación produciendo y liberando testosterona (Russell, 1990).

En animales adultos la LH es la hormona más importante, ya que influye en varios sitios diferentes de la espermatogénesis. Esta tiene un efecto directo en el epitelio germinal, sobre las células de Sertoli y quizá controle la tasa de liberación de espermatozoides inmaduros a la luz de los túbulos (Austin, 1982). Tiene también, un efecto indirecto sobre la testosterona producida por las células de Leydig, estimulando su secreción en forma pulsátil, (Austin, 1982; Fawcett, 1989; Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996; Amory y Bremner, 2002). Aunque mucha testosterona escapa por las venas espermáticas y por los vasos linfáticos para llegar hasta la circulación general, una gran cantidad probablemente se filtra y pasa a la luz de los túbulos testiculares en donde puede tener una acción local en el epitelio seminífero (Austin, 1982).

Por otro lado, muchos autores reportan que la FSH y la testosterona son las hormonas más importantes para la espermatogénesis (Russell, 1990; Spiteri-Grech y Nieschlag, 1993), pues la célula de Sertoli tiene receptores para ambas hormonas (Russell, 1990) y es quien mantiene el ambiente intratesticular óptimo (Spiteri-Grech y Nieschlag, 1993). La FSH puede ser un pre-requisito para la acción de la testosterona, actuando como el detonador que desencadena la cascada de los eventos esenciales de la división y diferenciación celular (Russell, 1990).

Otras investigaciones, cuestionan la importancia de la FSH en el mantenimiento de la espermatogénesis en el animal adulto, pues se considera que esta hormona tiene mayor importancia en la etapa prepupal, para el desarrollo de las gónadas y en la iniciación de la espermatogénesis durante la pubertad, que cuando la producción espermática ya se ha establecido (Austin, 1982; Sharpe, 1994), pues cuando esto último sucede, la FSH actúa sinérgicamente con la LH, para que la espermatogénesis se lleve a cabo de manera óptima (Austin, 1982; Fawcett, 1989); siendo la LH quien asume un papel preponderante (Austin, 1982).

La FSH no parece influir en la secreción de esteroides por los testículos, de manera que sus efectos están confinados a una acción directa en el epitelio germinal y en las células de Sertoli (Austin, 1982). Esta hormona actúa de manera directa sobre los túbulos seminíferos, ligándose específicamente a las células de Sertoli quienes reaccionan aumentando la síntesis de la proteína transportadora de andrógenos (ABP) que es necesaria para mantener una concentración elevada de testosterona en el epitelio seminífero (Fawcett, 1989); estimula la producción de inhibina (Purswell y Freeman, 1993; Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez 1996) y favorece la síntesis de otros productos implicados en la función "nodriza" de las células de Sertoli (Fawcett, 1989).

La ABP se secreta a la luz de los túbulos y transporta a la testosterona corriente abajo para mantener una función normal del epitelio que reviste al epidídimo (Fawcett, 1989). Una vez que hay una buena dotación de células germinales en el epitelio seminífero, la célula de Sertoli secreta inhibina, la cual se va liberando continuamente y actúa sobre la hipófisis para suprimir la liberación de FSH (Purswell y Freeman, 1993; Fawcett, 1989).

En todos los mamíferos se ha visto que la espermatogénesis es totalmente dependiente de testosterona, esta hormona es producida por las células de Leydig y actúa sobre las células de Sertoli y las células peritubulares de los túbulos seminíferos (Sharpe, 1987). Una célula de Leydig puede producir unas 10 000 moléculas de testosterona por segundo; la cual se va produciendo a medida que se necesita, pues no existe la formación de vesículas para su almacenamiento (Fawcett, 1989).

Las células de Sertoli también pueden secretar andrógenos y otros esteroides, aunque en cantidades menores que las células de Leydig. Estos esteroides posiblemente son drenados a la luz de los túbulos seminíferos y puedan tener efectos locales importantes en el proceso de espermatogénesis (Austin, 1982).

La mayoría de las hormonas esteroides testiculares son producidas por las células de Leydig (Austin, 1982; Purswell y Freeman, 1993). Los andrógenos producidos, se difunden por a las células de Sertoli adyacentes o se liberan en la sangre, donde ejercen una retroalimentación negativa en el hipotálamo y en la hipófisis para bloquear la liberación de LH (Fawcett, 1989; Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Los andrógenos ejercen su acción sobre las células de Sertoli principalmente y en menor grado sobre las células germinales (Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Sharpe (1992); demostró que, en la rata la testosterona tiene un efecto específico mayor en las proteínas secretadas por el túbulo seminífero durante algunos estados, mientras que en otros no tiene efectos. Posiblemente la actividad de las células mioideas también depende de los andrógenos (Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Las células epiteliales del epidídimo también requieren concentraciones altas de andrógenos para funcionar de manera normal (Stevens y Lowe, 1992; Páramo, y col. 1993; Ellington, 1994, Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996).

## **2.6. Control local de la función testicular**

Se sabe que la función testicular es estimulada por las gonadotropinas secretadas por la hipófisis anterior y que cuando se le priva de estas hormonas el testículo deja de funcionar.

Esta estimulación parece estar mediada a su vez por factores intratesticulares complejos. Sharpe (1983); plantea que existe un control local para la función testicular y que existen varios factores para que este mecanismo se presente, tales como:

- a) La entrada de moléculas al testículo
- b) La interacción entre las células germinales y las células de Sertoli y
- c) La interacción entre las células de Leydig y las células del túbulo seminífero

Estas interacciones son un pre-requisito para la función espermática normal. Este control local garantiza que aun cuando las concentraciones plasmáticas de testosterona sean bajas, en el testículo se mantienen altas para preservar la espermatogénesis Sharpe (1987).

## 2.7. Funciones de las células de Sertoli

Las células de Sertoli tienen funciones de sostén, fagocitosis y secreción (Fawcett, 1989; Russell, 1990; Stevens y Lowe, 1992;). Estas células actúan como "nodrizas" de los espermatozoides en desarrollo (Austin, 1982; Fawcett, 1989), ya que representan un soporte mecánico (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992) y nutren a las células germinales en sus diferentes etapas (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). También intervienen en la reabsorción de los cuerpos residuales, en la liberación de los espermatozoides maduros a la luz del túbulo (Monesi, 1982; Russell, 1990; Stevens y Lowe, 1992) y en la fagocitosis de las células germinales degeneradas, producidas durante el curso normal de la espermatogénesis (Russell, 1990). La estrecha relación que existe entre las células germinales en desarrollo y las prolongaciones de las células de Sertoli, puede significar que su citoplasma, es un medio a través del cual, se difunden las sustancias inductoras que liberan las células germinales, para regular el proceso de la espermatogénesis (Monesi, 1982; Stevens y Lowe, 1992).

La función secretora de las células de Sertoli va cambiando con la madurez sexual y la edad del individuo (Stevens y Lowe, 1992). Como se mencionó anteriormente, en el embrión secretan la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS), (Stevens y Lowe, 1992). En los testículos prepúberes, pueden secretar una sustancia que inhibe la división meiótica de las células germinales (Stevens y Lowe, 1992). En los testículos sexualmente maduros se produce ABP, ésta proteína forma un complejo con los andrógenos (testosterona y  $5\alpha$  dihidrotestosterona) producidos fuera del túbulo seminífero y los conduce hacia el interior de éste (Stevens y Lowe, 1992; Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Posteriormente es transportada junto con los espermatozoides hacia el epidídimo (Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). La producción de ABP, depende de la secreción hipofisaria de FSH. Se sabe que las células de Sertoli tienen receptores tanto para FSH como para testosterona (Russell, 1990; Stevens y Lowe, 1992).

Las células de Sertoli, también pueden transformar los esteroides secretados por las células de Leydig, en otras hormonas activas (Austin 1982, Fawcett, 1989). Parte de la testosterona introducida en los túbulos seminíferos, es transformada en  $5\alpha$  dihidrotestosterona ( $5\alpha$ DHT), por la enzima  $5\alpha$  esteroide reductasa y otra parte es convertida en estrógenos por la enzima aromatas (Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996).

Otra de las funciones más importante de las células de Sertoli, es que integran la barrera hemato-testicular, establecida por la presencia de complejos de unión especiales entre las células de Sertoli vecinas (Fawcett, 1989; Russell, 1990). Estas uniones ocluyentes, están situadas en la interfase que existe entre las prolongaciones de las células de Sertoli, que se unen en arco justo por encima de las espermatogonias (Fawcett, 1989; Russell, 1990). De este modo, dividen al

epitelio en un compartimento basal, que contiene las espermatogonias y los espermatocitos preleptoténicos y un compartimento adluminal, que contiene las fases más avanzadas de las células germinales en diferenciación. Las sustancias de los espacios extracelulares del intersticio tienen acceso sin dificultad al compartimento basal, pero se les impide penetrar más profundamente en el interior del epitelio, gracias a las uniones especializadas de las células de Sertoli (Fawcett, 1989; Russell, 1990). Existe además un compartimento intermedio, formado durante la transición de células en leptoteno del compartimento basal y del compartimento adluminal, que involucra la sucesiva formación y ruptura de las uniones. La presencia de este compartimento asegura, que la barrera hemato-testicular se mantenga, durante el tránsito de las células del compartimento basal al adluminal (Russell, 1990).

Las células de Sertoli establecen también uniones tipo GAP (comunicantes) entre ellas y las células germinales; estas uniones, permiten la intercomunicación y el abastecimiento de los mismos nutrientes producidos por las células de Sertoli a todas las células germinales. Adicionalmente, este tipo de uniones se presenta para sincronizar los eventos de la espermatogénesis. Las células de Sertoli también tienen la función de actuar como una barrera inmunológica para prevenir, que el sistema inmune reconozca como auto-antígenos a los espermatozoides que se encuentran desarrollándose sobre ellas.

La espermiación, es otro de los complejos procesos, en donde las células de Sertoli están involucradas activamente, ya que contribuyen a separar a la espermátide de su superficie y las células que no son liberadas las fagocitan (Russell, 1990).

## **2.8. Maduración espermática**

Después de abandonar el epitelio seminífero, los espermatozoides son transportados lentamente a los conductillos seminíferos rectos y a la red testicular, después transitan por los conductos eferentes hasta llegar al epidídimo (Courot, 1981; Monesi, 1982; Palacios y col., 1993; Eddy, 1993; Purswell y Freeman, 1993). Este órgano es un conducto altamente contorneado, dividido en tres regiones: cabeza, cuerpo y cauda. Durante el tránsito de los espermatozoides por este órgano, experimentan un proceso de maduración en el que adquieren movimiento progresivo, capacidad para fecundar (Courot, 1981; Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Palacios y col., 1993; Eddy, 1994; Garner y Hafez, 1996), se aprovisionan de inmovilina, aumentan la estabilidad de la cromatina, pierden la gota citoplasmática, sufren algunas modificaciones en el acrosoma, modifican su patrón metabólico, aumenta la estabilidad estructural del citoesqueleto del flagelo y también presentan cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática (Monesi, 1982; Palacios y col., 1993; Eddy, 1994; Garner y Hafez, 1996).

Posiblemente todos estos cambios estén favorecidos por el tipo de células que revisten al epidídimo, ya que desarrollan diferentes funciones, dependiendo de la región a la que pertenezcan, así por ejemplo:

- Las células de la cabeza se encargan de la absorción de líquido, aunque en realidad este proceso se inicia desde los conductillos eferentes (Courot, 1981; Stevens y Lowe, 1992; Palacios y col., 1993).
- En el cuerpo se lleva cabo la secreción y la síntesis de glucoproteínas, ácido siálico y glicerilfosforilcolina, así como la fagocitosis y digestión de los espermatozoides degenerados y de los cuerpos residuales. En esta región existen altas concentraciones de testosterona e inhibina
- En la región de la cauda no hay presencia de inhibina (Stevens y Lowe, 1992; Palacios y col., 1993).

#### 2.8.1. Formación de los dominios de la membrana plasmática

Una característica única de la membrana plasmática del espermatozoide, es que está subdividida en regiones o dominio bien delimitados, las cuales le confieren una función especializada. Durante la vida de la célula los dominios son dinámicos y sufren cambios en su organización y composición. Los principales dominios de la membrana plasmática del espermatozoide son: el de la región acrosomal, que se encuentra en el acrosoma propiamente dicho; el ecuatorial que se localiza en la región ecuatorial del acrosoma; el postacrosomal, localizado en la misma región; el de la pieza media, que se encuentra en ésta región del flagelo y; el de la pieza terminal.

La mayoría de los dominios de la superficie espermática, probablemente se establecen durante la espermatogénesis; sin embargo el espermatozoide sufre un cambio adicional en su superficie durante la maduración epididimal y la capacitación, por lo que algunos dominios adquieren una localización y composición final durante estas etapas, siendo los más afectados los que se encuentran en la cabeza del espermatozoide.

Los procesos morfogénéticos que establecen la forma y organización del espermatozoide determinan principalmente la localización de los dominios. Los componentes del citoesqueleto (actina, miocina y espectrina) posiblemente estén involucrados en la en la formación de los diferentes dominios.

La célula de Sertoli influye principalmente en el establecimiento de los dominios que se encuentran en la cabeza del espermatozoide, por medio de las especializaciones ectocitoplasmáticas, que son asociaciones que se establecen entre estas 2 células y que se mantienen hasta el momento de la liberación del espermatozoide. Tienen entre otras funciones, la de ayudar a darle forma a la cabeza del espermatozoide y la de mantener la polaridad necesaria para la formación de sus dominios. Sin embargo tal y como se mencionó anteriormente, es en el epidídimo donde la cabeza del

espermatozoide se refina, por lo que se sugiere que las células de Sertoli no participan en la forma final y composición del dominio.

El mantenimiento de los dominios ocurre por la inmovilidad de sus componentes membranales al interactuar con moléculas internas o externas a la membrana (Eddy, 1994)

### 2.8.2. Mecanismo de transporte

El paso de los espermatozoides por el epidídimo depende de las contracciones locales de los músculos de sus paredes (Courot, 1981; Garner y Hafez, 1996). Estas contracciones avanzan en una dirección, a una frecuencia de 3 por minuto y parece ser que son estimuladas por prostaglandinas (Garner y Hafez, 1996), sin embargo existen contracciones de mayor intensidad, en la región de la cabeza, las cuales van declinando a nivel del cuerpo y se hacen más lentas en la región de la cauda, a menos que exista un estímulo nervioso como la eyaculación (Courot, 1981). El tiempo de tránsito de los espermatozoides de perro por el epidídimo, es de aproximadamente 10-12 días (Courot, 1981; Garner y Hafez, 1996); no obstante, este tiempo puede ser reducido en un 10-20% debido a un aumento en la frecuencia de los eyaculados (Garner y Hafez, 1996).

Por otra parte, los elementos contráctiles de las distintas regiones del epidídimo presentan diferencias, ya que la cantidad de células musculares aumenta de manera progresiva de la cauda del epidídimo hacia el conducto deferente (Garner y Hafez, 1996).

### 2.8.3. Almacenamiento

El principal sitio de almacenamiento de los espermatozoides dentro del aparato reproductor masculino es la cauda del epidídimo, que contiene cerca del 70% de la cantidad de gametos, mientras que el conducto deferente contiene solo el 2% (Garner y Hafez, 1996).

## 2.9. Morfología del espermatozoide

Los espermatozoides maduros son células alargadas, que constan de una cabeza aplanada portadora del núcleo y un flagelo, que contiene la maquinaria necesaria para la motilidad celular (Fawcett, 1989; Garner y Hafez, 1996). La célula espermática está cubierta en su totalidad por la membrana plasmática (Garner y Hafez, 1996). El acrosoma es una estructura de doble pared situada en la porción anterior del núcleo (Garner y Hafez, 1996). El cuello une la cabeza del espermatozoide con el flagelo, este último se subdivide en el segmento medio, el principal y el caudal (Monesi, 1982; Garner y Hafez, 1996).



### 2.9.1. Cabeza

La cabeza del espermatozoide contiene un núcleo alargado y oval, constituido por cromatina muy compacta (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996). La cromatina condensada consiste en un complejo formado por DNA y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas (Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). El contenido de DNA nuclear es haploide (Monesi, 1982; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996), es decir, que posee un solo juego del número de cromosomas que las células somáticas (Garner y Hafez, 1996). La naturaleza haploide de los espermatozoides, se debe a las divisiones celulares meioticas que ocurren durante su formación (Garner y Hafez, 1996).

### 2.9.2. Acrosoma

El extremo apical de la cabeza del espermatozoide está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa, este se adhiere estrechamente al núcleo durante las últimas etapas de formación del espermatozoide (Garner y Hafez, 1996). Esta estructura en forma de casquete (Alberts y col., 1996; Garner y Alberts, 1996) cubre aproximadamente los 2/3 anteriores de la cabeza (Monesi, 1982; Fawcett, 1989) y contiene varias enzimas como la proacrosina, hialuronidasas, esterases, acidohidrolasas, proteasas, fosfatasa ácida, neuroaminidasas, 17 aminoácidos, 6 carbohidratos y ácido siálico (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Varios de estos componentes participan en el proceso de fecundación (Monesi, 1982; Fawcett, 1989; Alberts y col., 1996; Hafez, 1996). El contenido de carbohidratos de varios tipos es responsable de su tinción tan intensa con PAS (Monesi, 1982; Fawcett, 1989).

### 2.9.3 Flagelo

El flagelo espermático está formado por el cuello y los segmentos medio, principal y terminal (Fawcett, 1989; Garner y Hafez, 1996). El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en la superficie posterior de la cabeza (Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996) y juega un papel importante en la iniciación y crecimiento del axonema (Stevens y Lowe, 1992; Darnell, y col. 1993). La placa basal del cuello es continua en sentido posterior y tiene 9 fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a lo largo de la mayor parte del flagelo (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Darnell, y col. 1993; Alberts y col., 1996; Hafez, 1996).

La región del flagelo comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio (Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996). El centro de este segmento, junto con toda la longitud del flagelo contiene el axonema (Stevens y Lowe, 1992; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Este se compone de 9 pares de microtúbulos (dobletes) dispuestos radialmente, alrededor de 2 microtúbulos centrales (singletes) (Darnell, y col. 1993; Alberts y col., 1996; Garner

y Hafez, 1996). Los singletes están rodeados por una estructura llamada vaina interna, que posiblemente regule la forma de batir el flagelo (Darnell, y col. 1993).

En el segmento medio, esta disposición de 9+2 de los microtúbulos, está rodeada por 9 fibras densas, que al parecer están asociadas a los 9 dobletes del axonema (Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). Esta región está rodeada por numerosas mitocondrias (vaina mitocondrial) (Fawcett, 1989; Stevens y Lowe, 1992; Alberts y col., 1996; Garner y Hafez, 1996), que se encuentran estratégicamente en este lugar, debido a que desde ahí pueden alimentar al flagelo con mayor eficiencia (Alberts y col., 1996). La disposición de las mitocondrias es poco habitual y resulta de la fusión de las mitocondrias individuales durante la diferenciación de la espermátide (Alberts y col., 1996); esta vaina mitocondrial termina en el anillo citoplasmático (Fawcett, 1989; Garner y Hafez, 1996).

El segmento principal, que se continúa en sentido posterior desde el anillo citoplasmático hasta casi la punta del flagelo, está formado por el axonema en el centro y sus 9 fibras gruesas asociadas (Stevens y Lowe, 1992; Garner y Hafez, 1996), envueltas a su vez por numerosas fibras externas de orientación circular (Stevens y Lowe, 1992). Se cree que esa vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles del flagelo (Garner y Hafez, 1996).

El segmento terminal, contiene solo el axonema cubierto por la membrana plasmática (Garner y Hafez, 1996).

Aunque se le considera anormal, el citoplasma residual (gota citoplasmática) puede retenerse en la región del cuello, llamándosele inclusión proximal, o bien ser retenida, cerca del anillo citoplasmático donde se le denomina inclusión distal (Garner y Hafez, 1996).

## **2.10. Generalidades del semen canino**

### **2.10.1. Obtención**

La técnica más utilizada para la obtención del semen es la manual, con la ayuda de un cono de látex (Seager y col., 1977; Andersen, 1980). La técnica se inicia con un suave masaje sobre el prepucio, a nivel del bulbo, hasta que éste último comienza a aumentar de tamaño. En ese momento de desliza el prepucio hasta detrás del bulbo y se coloca el cono de látex conectado a un tubo de ensayo, se sigue dando masaje hasta que se completa la erección y cesan los movimientos pélvicos (Seager y col., 1977; Andersen, 1980; Oettlé y Soley, 1988; Tsutsui, y col. 1988; Feldman, 1996; England, 2000; Sorribas, 2000; Jonhston, 2001). Una vez concluidos estos movimientos, se rota el pene 180° hacia atrás para simular el abotonamiento; mientras tanto, se ejercen estímulos pulsátiles suaves alrededor y por detrás del bulbo (Tsutsui, y col. 1988; England, 2000; Jonhston, 2001), simulando las contracciones vaginales que se presentan durante la monta natural. En la parte ventral del bulbo penéano, se pueden sentir las pulsaciones eyaculatorias (Seager y col., 1977).

### 2.10.2. Características

El eyaculado del perro se compone de 3 fracciones (Seager y col., 1977; Andersen, 1980; Tsutsui y col., 1988; Seed y col., 1996; England, 2000; Fastard, 2000; Sorribas, 2000; Jonhston, 2001). La primera es transparente, proviene de próstata y no contienen espermatozoides, sirve para lavar la uretra y su emisión dura de 30-50 seg. La segunda fracción es la que contiene los espermatozoides, proviene del epidídimo y es de color blanco lechoso y su emisión dura 50-80 seg. (Andersen, 1980; Tsutsui, y col. 1988; Feldman, 1996; England, 2000; Sorribas, 2000). La tercera es transparente, proviene de próstata y tampoco contiene espermatozoides, esta fracción le confiere motilidad a los mismos, es la más abundante y puede ser eyaculada durante 3-30 minutos (Andersen, 1980; Tsutsui y col., 1988; England, 2000; Jonhston, 2001). El volumen normal del semen canino oscila entre los rangos de 1 a 30 ml, dependiendo del tamaño del perro, la raza, la efectividad del estímulo, etc. Este parámetro no está correlacionado con la calidad (Seager, y col. 1977; England y Allen, 1989; Jonhston, 1991; Olson, 1994).

El color del eyaculado es blanquecino, un tanto translúcido, sin embargo, un eyaculado azoospermico tiene un color totalmente transparente (Seager y col., 1977; Jonhston, 1991; Seed y col., 1996).

La concentración varía desde 300 hasta 2000 millones de espermatozoides por eyaculado (Jonhston, 1991) y de 50 a 300 millones por mililitro (Sorensen, 1984; England y Allen, 1989; Jonhston, 1991).

Un semen de buena calidad no debe de exceder de 20% de anomalidades primarias y secundarias (Jonhston, 1991; Oettlé, 1995).

### 2.10.3. Evaluación

La evaluación del semen debe realizarse tanto macroscópica como microscópicamente.

Macroscópicamente se observan las características físicas como son: volumen y color. También se puede medir el pH. Microscópicamente al semen se le debe evaluar la motilidad, la concentración y la morfología. Para esta última, la clasificación más utilizada de las anomalidades de los espermatozoides del perro es la siguiente:

**Anormalidades primarias:** Son alteraciones que influyen en la función del espermatozoide y suelen presentarse durante la espermatogénesis; es decir que tienden a ocurrir durante la formación del espermatozoide (Oettlé, 1995).

- **Acrosómicas:** Quistes acrosómicos, acrosomas labiados, acrosomas en pezón, (Oettlé y Soley, 1988; Páramo y col., 1993; Oettlé, 1995) y presencia de halos en la cabeza del espermatozoide (Oettlé y Soley, 1988; Jonhston, 1991; Páramo y col., 1993). Está comprobado que las anomalidades del acrosoma son causa de esterilidad. (Oettlé, 1995).

- Cabeza: Macrocéfalos, cabezas deformes, microcéfalos y cabezas dobles (Fawcett, 1989; Oettlé y Soley, 1988; Oettlé, 1995; Chacón, 2000). Al igual que las del acrosoma, estas anomalías se asocian con infertilidad (Oettlé, 1995).
- Pieza media: Gotas citoplasmáticas retenidas en la región del cuello, que suelen asociarse a falta de maduración o mal funcionamiento del epidídimo, piezas medias rotas, que son manifestaciones de daño y desorganización mitocondrial y pieza media doble (Chacón, 2000). Las anomalías de esta parte del flagelo suelen acompañarse de infertilidad (Oettlé, 1995).
- Flagelo: Doble flagelo (Oettlé y Soley, 1988; Fawcett, 1989; Jonhston, 1991; Oettlé, 1995), flagelo "deshilachado" (Jonhston, 1991), retención de la gota citoplasmática proximal (Oettlé y Soley, 1988; Jonhston, 1991, Oettlé, 1995; Chacón, 2000) y retención de la gota citoplasmática distal, (Oettlé y Soley, 1988; Oettlé, 1995).

*Anormalidades secundarias:* Se trata de alteraciones que se originan después de que el espermatozoide sale del testículo; esto es durante su maduración en el epidídimo o bien a las originadas por traumatismos, cambios de temperatura, medio ambiente y envejecimiento. (Oettlé, 1995).

- Acrosoma: Reacción acrosomal prematura (Oettlé y Soley, 1988; Oettlé, 1995, Jonhston, 1991; Chacón, 2000). Esta alteración regularmente ocurre solo cuando el espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida o bien por envejecimiento (Oettlé, 1995).
- Cabeza: Cabezas sueltas, que generalmente se relacionan con envejecimiento y en consecuencia pueden mostrar acrosomas degenerados o ausentes (Oettlé, 1995).
- Pieza media: Gota citoplasmática proximal y distal. Para diferenciarla de un defecto primario es necesario dar un descanso reproductivo al perro y volver a hacer la evaluación, ya que cuando es un defecto secundario, desaparecen (Oettlé, 1995).
- Flagelo: Enrollamiento del flagelo en grado variable (Oettlé y Soley, 1988; Jonhston, 1991; Oettlé, 1995).

### 2.11. Efecto de los progestágenos como anticonceptivos en el macho

Los progestágenos como método anticonceptivo en el macho, se han utilizado por sus efectos antiandrogénicos (Wright y col., 1970; Meyer, 1985; Amory y Bremner, 2002). Los estudios más numerosos se han realizado en el hombre (Bain, 1980; Handelsman, 1996; Meriggiola, 1997; Wu y col., 1999; Meriggiola, 2002). En animales como el perro (England, 1996; England, 1997; Hewitt, 2000; Jonhston, 2001) la rata (Lobl y col. 1983) y el conejo (Aribarg, 1983), las investigaciones son

más escasas, a pesar de que por la posibilidad de realizar la castración, se pudieran obtener datos acerca de su efecto en el tejido testicular y epididimal.

### 2.11.1. Metabolismo

Antes de elegir el fármaco a utilizar, es importante considerar aspectos como su absorción, metabolismo, excreción, facilidad de dosificación, frecuencia de aplicación, reversibilidad, porcentaje de eficacia, efectos colaterales, disponibilidad del medicamento en el mercado y costo-beneficio (Schaffenburg y col., 1981; Burke, 1986; Knuth y Nieschlag, 1987; Wu, 1988; Olson y col., 1989; Lincoln, 1992).

La mayoría de los esteroides son metabolizados en el hígado y se excretan por los riñones, formando conjugados hidrosolubles de ácido sulfúrico y glucurónico (Austin, 1982; y col. 1996). La progesterona natural tiene una vida media de unos cuantos minutos, en cambio sus derivados los progestágenos, por ser menos susceptibles al metabolismo hepático pueden tener una vida media más prolongada y por ende sus conjugados se eliminan más lentamente del torrente sanguíneo (Williams y Stanal, 1996).

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) difiere de la progesterona, por la presencia de un grupo metilo en la posición 6  $\alpha$  y por tener un grupo acetoxílico en la posición 17 $\alpha$ , ésta estructura le confiere su acción prolongada cuando se aplica por vía parenteral (Rosenstein, 1988; Williams y Stanal, 1996)

### 2.11.2. Establecimiento de la dosis

En la mujer se cuenta con dosis anticonceptivas de MPA bien establecidas; donde se utiliza una inyección IM de 150 mg/kg cada tres meses<sup>1</sup> (Agencia de los EE UU para el desarrollo internacional, 1995).

En el macho (varón y animales), aún no se cuenta con dosis de progestágenos definidas en las que se establezca su efectividad como anticonceptivo. De acuerdo a las investigaciones en las que se ha utilizado MPA sola (Wright y col., 1979; Meyer, 1985; Bamberg-Thalén, 1992; Páramo, 1993; England, 1997), los esquemas de tratamiento son sumamente variados, en la frecuencia e intervalo de aplicación, en las dosis (20 a 1000 mg) y en la vía de administración (oral, IM o SC) (Faundes y col., 1981; Danner y col., 1982; Guerin y Rollet, 1988; Wu y Aitken 1989; Handelsman y col., 1996; Wu y col., 1999; Amory y Bremner, 2002).

En la mayoría de los casos, los progestágenos se usan en combinación con andrógenos (Paulsen y col., 1982; Guerin y Rollet, 1988; Wu y Aitken, 1989; Meriggiola y col., 2002); pues se refiere, que

---

<sup>1</sup> Información médica aportada por el laboratorio PHARMACIA®; y en las siguientes direcciones electrónicas: [www.depoprovera.com/consumer/about-depo/index.htm](http://www.depoprovera.com/consumer/about-depo/index.htm); [www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/202758.html](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/202758.html)

estas asociaciones tienen un efecto aditivo como método anticonceptivo (Handelsman y col., 1996; England, 1997; Meriggiola, 1997; Wu y col., 1999), además de que se reduce la dosis utilizada, y se atenúan los efectos colaterales causados por la aplicación de cantidades altas de progestágenos (diabetes mellitus, aumento de la presión sanguínea y aumento de peso) (Meyer y col., 1985). Sin embargo, en las combinaciones empleadas, las dosis de andrógenos resultan ser también muy diversas (50 a 200 mg) dependiendo del fármaco utilizado (Faundes y col., 1981; Danner y col., 1982; Guerin y Rollet, 1988; Wu y Aitken 1989; World Health Organization, 1993; Handelsman y col., 1996; Wu y col., 1999; Amory y Bremner, 2002).

En relación con los perros, la posología es todavía más diversa, esto debido a que el MPA tiene varias indicaciones de uso. Por ejemplo, se recomiendan dosis bajas (1.1-4.8 mg/kg) (Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg, 1992; Klausner y col., 1995; England, 1996) para los problemas de comportamiento agresivo o de hiperplasia prostática benigna (Gerber y col., 1973; Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg, 1992).

La mayoría de las investigaciones que se han realizado, tanto en el hombre como en los animales, informan que cuando se aplica MPA en dosis bajas, no se observan efectos detrimentales en la calidad del semen (Wright, 1979; Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg, 1982; Meyer y col., 1985; England, 1996; England, 1997). En cambio, su uso en cantidades altas (mayores a 10 mg/kg), sí puede causar alteraciones en esa característica (Lobl, y col. 1983; , 1992; Páramo y col., 1993; England, 1996; Rosenstein, 1996; England, 1997).

Basándose en las diversas investigaciones sobre este fármaco, existen diferentes protocolos de aplicación de MPA en el macho. Por ejemplo, Páramo y col., (1993); en el perro, aplican 2 tratamientos, a) 75 mg de MPA, cada mes durante, 2 ocasiones y b) 50 mg de MPA cada 14 días, un mes, seguido de 100 mg cada 14 días durante 2 meses; Jonhston y col. (2001) aplican una dosis única de 20 mg/kg; England (1997), utilizó la misma dosis sola o en combinación con 4 mg/kg acetato de melengestrol (MGA) por siete días, esto último con la finalidad de obtener un efecto más rápido, eficaz y duradero. Lobl, y col. (1983) en la rata, emplean 10 mg/kg de MPA, cada 24 hrs por 10 o por 50 días. Se recomienda que la vía de administración sea la subcutánea (SC). El intervalo de tratamiento puede ser de hasta 6 meses, por considerársele un progestágeno de depósito (Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg, 1992; England, 1996; England 1997).

### 2.11.3. Efecto del MPA sobre los niveles hormonales

El efecto principal de la aplicación de progestágenos en el macho, es la inhibición de las gonadotropinas (FSH y LH), debido a que ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis (Johnson, y col. 1970; Austin, 1982; Guerin y Rollet, 1988; Wu, 1988; Wu y Aitken, 1989; England, 1996; Rosenstein, 1996; Meriggiola y Bremner, 1997; Amory y Bremner, 2002). Sin embargo, la alteración de estas hormonas no siempre es proporcional (Austin, 1982;

Meyer, 1985; Guerin y Rollet, 1988; England, 1996). Esto se debe tal vez a un factor adicional, la inhibina, que suprime la secreción de FSH independientemente de la LH (England, 1996; Hewitt, 2000).

Otro de los efectos de la aplicación de MPA en el macho, debido a la disminución de las gonadotropinas, es la caída de las concentraciones plasmáticas de testosterona, (Lobl y col., 1983; England, 1996; Handelsman, 1996; Hewitt, 2000). La concentración plasmática normal de testosterona en el perro adulto y sin castrar es de 1 a 6 ng/ml (Tsutsi, 1987; Sorribas, 1999; Hewitt, 2000; Johnston y col. 2000). La baja en la concentración de testosterona ocasiona un soporte insuficiente para la función normal de las células de Sertoli (Meriggiola y col. 1982; Paulsen y col., 1982; Lobl, y col. 1983), induciéndose así efectos antiespermatogénicos (Johnson, y col. 1970; Burguer, 1987; England, 1996).

Por otro lado, algunos autores que han realizado investigaciones tanto en el ser humano como en otras especies, postulan que la aplicación de MPA, posiblemente tenga un efecto directo sobre la maduración espermática en el epidídimo y no necesariamente estar relacionada con las alteraciones en la secreción de gonadotropinas (Wu y Aitken, 1989; England, 1997), pues se sabe que el epidídimo también requiere de altas concentraciones de testosterona para que se lleve a cabo la adecuada maduración de los espermatozoides (Prasad y Rajalakshmi 1976; Paulsen y col., 1982; Sharpe, 1987; Palacios y col., 1993; Garner y Hafez, 1996; England, 1997), además de ser más sensible a la testosterona que los túbulos seminíferos, (Garner y Hafez, 1996; England, 1997). No se descarta la posibilidad de que al disminuir la producción de gonadotropinas hipofisarias se reduzca también el transporte de testosterona al epidídimo (Páramo y col., 1993).

#### 2.11.4. Efecto en el testículo y el epidídimo

Se ha investigado que la aplicación de MPA provoca una disminución en el tamaño y peso del testículo y del epidídimo, las explicaciones para tales eventos pueden ser las siguientes:

La biosíntesis y secreción de ABP parece estar regulada por la FSH y los andrógenos, por lo tanto, si las concentraciones de estas hormonas se ven disminuidos postratamiento, los niveles de ABP también decrecerán en el testículo y en el epidídimo, influyendo de manera negativa en la espermatogénesis. Además, si la producción de LH disminuye por largos periodos, las células de Leydig pueden sufrir atrofia. (Lobl y col., 1983). Ellos mismos, observaron que un tratamiento prolongado con 10 mg/kg de MPA, por vía SC en ratas, disminuye la concentración de ABP del testículo y del epidídimo de manera progresiva y de forma paralela con la disminución del peso de estos órganos. No obstante, la reducción del peso testicular fue más lenta que la del epidídimo. Además, los niveles séricos de ABP, que normalmente son bajos se incrementaron. Esta respuesta podría deberse a una involución del epidídimo o a un efecto específico del progestágeno, sobre las células de Sertoli para que liberen la ABP directamente en sangre. En cuanto a la morfología del

testículo, la aplicación de MPA durante largos periodos provocó que las células germinales se transformaran en menor tiempo del normal, observándose "adelantadas" (Lobl, y col. 1983; Linde-Forsberg y col., 1993).

Páramo, y col. (1993), observaron en la cabeza del epidídimo, una reducción del diámetro de sus conductos, una disminución del contenido de espermatozoides y la presencia de células germinales inmaduras en su luz (Lobl, y col. 1983).

#### 2.11.5. Efecto en el eyaculado

Las alteraciones observadas en el eyaculado por la administración de dosis altas de MPA consisten en grados variables de oligozoospermia, azoospermia (Aribarg, 1983; Guerin y Rollet, 1988; Wu y Aitken, 1989; England, 1997) teratozoospermia (Meyer 1985; Olson, 1991; Páramo, y col. 1993; England, 1997; Jonhston, 2001) y una disminución de la capacidad fecundante del espermatozoide, independiente de la oligozoospermia (Wu y Aitken, 1989; World Health Organization 1993). Estos efectos pueden ser inducidos de manera más rápida y sostenida cuando se adicionan andrógenos en cantidades altas (Danner y col., 1982; Knuth y Nieschlag, 1987; Olson, 1991; Handelsman y col., 1996; England, 1997; Wu y col., 1999; Amory y Bremner, 2002; Meriggiola y col., 2002).

Dentro de la teratozoospermia, uno de los cambios morfológicos observados en el perro, se presenta en el acrosoma. Este normalmente se encuentra bien adherido a la cabeza del espermatozoide, sin embargo, en los perros tratados con MPA se observó que la región acrosomal presentó una proyección en forma de abanico, lo cual pudiera indicar un desprendimiento de esta estructura de la cabeza del espermatozoide. Estas alteraciones se observaron sobre todo en los espermatozoides recuperados de la cabeza del epidídimo, ya que los que fueron obtenidos del cuerpo y la cauda presentaron una morfología aparentemente normal; no obstante, al prolongar el tratamiento esto se observó también en el eyaculado (Páramo, y col. 1993).

Se sugiere que el efecto del MPA a nivel del epidídimo, es debido a un decremento en el aporte de testosterona (England, 1997), ocasionando anomalías de tipo secundario (Lobl, y col. 1983, England 1997; Jonhston, 2001).

En el presente trabajo de investigación, se pretendió observar si la aplicación parenteral de MPA puede producir disminución en los niveles plasmáticos de testosterona, alteraciones histológicas en el testículo y el epidídimo, variación en las características físicas del eyaculado y cambios morfológicos en el espermatozoide del perro.

Adicionalmente, un estudio más riguroso de estos acontecimientos reproductivos abre la oportunidad de crear nuevas líneas de investigación para encontrar métodos anticonceptivos más eficaces y seguros.



## *III HIPOTESIS*

---

La aplicación parenteral de una sola dosis elevada (20mg/kg) de MPA en el perro produce disminución en la concentración plasmática de testosterona y en la calidad del eyaculado, así como alteraciones morfológicas en la cabeza del espermatozoide e histológicas en testículo y epidídimo.

## *IV* OBJETIVOS

---

- 4.1. Evaluar el efecto de la aplicación parenteral de 20 mg/kg de MPA en la concentración plasmática de testosterona
- 4.2. Determinar si la aplicación de esta dosis de MPA induce disminución de la calidad del eyaculado
- 4.3. Valorar los cambios morfológicos en el espermatozoide
- 4.4. Identificar los cambios histológicos que se produzcan en el testículo y en el epidídimo

# V MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 5.1. Ubicación de la muestra experimental

Los perros fueron alojados en la sección de Enseñanza Quirúrgica del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la FMVZ UNAM. Su alimentación fue a base de alimento comercial (ProPlan® de Purina).

## 5.2. Animales

Se utilizaron 12 perros adultos (1-4 años de edad) de talla mediana (9-14 kg), procedentes de las donaciones que hacen los centros antirrábicos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. A cada perro se le realizó un examen físico general y un examen reproductivo para corroborar que tuvieron sus 2 testículos y que producían espermatozoides. Fueron desparasitados con Mebendazol y vacunados contra parvovirus, moquillo, hepatitis, leptospira y rabia.

## 5.3. Tratamiento

Los perros se dividieron en 2 grupos experimentales de 6 animales cada uno. Al grupo control se le aplicó una sola dosis de 1 ml de solución salina fisiológica, por vía subcutánea (SC) y a los del grupo tratado 20 mg/kg de MPA ("Depo- provera" de Upjhon®) por la misma vía, por única ocasión.

## 5.4. Muestreo sanguíneo y medición de testosterona

Para medir la concentración plasmática de testosterona, se realizaron muestreos sanguíneos, un mes antes y tres meses después del tratamiento, aproximadamente una vez por semana.

La toma de muestras se realizó por punción de la vena radial, se colectaron aproximadamente 3 ml de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA. Para obtener el plasma, cada una de las muestras se centrifugó a 3000 RPM y éste fue congelado de forma individual a -20°C.

Las pruebas para la medición de testosterona plasmática se realizaron en el Departamento de Reproducción Animal de la FMVZ UNAM.

Los niveles de testosterona se determinaron por medio de la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida, empleando el kit comercial Coat-A-Count Total Testosterone®. Este kit hace una medición cuantitativa de la testosterona plasmática o serológica, por medio de la inmovilización de anticuerpos específicos a testosterona en un tubo que contiene polipropileno. La testosterona de la prueba compete en tiempo fijo con la de la muestra<sup>2</sup>. Los resultados fueron expresados en ng/dl.

### 5.5. Colección y evaluación de semen

La obtención de semen se realizó de manera simultánea al muestreo sanguíneo. La técnica de colección fue de forma manual (Seager y Platz, 1977; Andersen, 1980; Oettlé y Soley, 1988; Tsutsui, y col. 1988; Feldman, 1996; England, 2000; Sorribas, 2000; Jonhston, 2001).

Las pruebas de evaluación de semen se realizaron en el Departamento de Reproducción Animal de la FMVZ UNAM.

Los eyaculados obtenidos fueron sometidos a los siguientes análisis:

1. Pruebas macroscópicas: Se observó el color, y se midió el volumen (Jonhston, 1991, Chacón, 2000, Bearden, 1985).

2. Pruebas microscópicas: Se valoró la concentración, la morfología y el porcentaje de mortalidad. Para determinar la concentración se utilizó un hemocitómetro de Spencer (Becton-Dickson, Rutherford, NJ. Proveedor Científico S. A) y como diluyente, formalina al 10% con eosina, obteniéndose una dilución 1:100. Para hacer el conteo espermático se empleó una cámara de Neubauer (Becton-Dickson, Rutherford, NJ. Proveedor Científico S. A), que fue llenada con la dilución del hemocitómetro (Seager y Platz, 1977; Jonhston, 1991), enseguida se contaron los espermatozoides que aparecieron en las 4 cuadrículas de las esquinas y los de la cuadrícula central de cada cámara, se promediaron y se multiplicaron por 5 (Sorensen, 1984). El resultado obtenido se expresó en  $1 \times 10^6$  espermatozoides /ml (millones / ml) (Jonhston, 1991).

El porcentaje de mortalidad espermática se determinó con la ayuda de la triple tinción (T) (Talbot y Chacon, 1981; Kawakami y col., 1993; Guerra y col., 1997; Pereira y col., 1997), (ver anexo). Para lo cual, se contabilizaron 100 células de los frotis de cada uno de los eyaculados obtenidos (Seager y Platz, 1977; Bearden, 1985; Oettlé y Soley, 1988; Fawcett, 1989; Jonhston, 1991; Talbot y Chacon, 1991; Páramo y col., 1993; Oettlé, 1995; Chacón, 2000). De manera similar se determinó el porcentaje de anomalías, con la diferencia de que las muestras fueron teñidas, de forma alternada con Spermac® (S) (Oettlé, 1986; Oettlé 1993) y con la Triple tinción. Cada

---

<sup>2</sup> Datos técnicos proporcionados por el fabricante del Kit.

laminilla se observó al microscopio óptico (Nikon ECLIPSE E200), con el objetivo de inmersión 100x.

#### **5.6. Histología**

Tres meses después del tratamiento, se procedió a la castración quirúrgica de los animales de ambos grupos, con la finalidad de valorar los cambios histológicos en testículo, cabeza, cuerpo y cauda del epidídimo.

El epidídimo fue seccionado en sus tres diferentes regiones; para lo cual se tomó como referencia al testículo y se consideró que la región de la cabeza se encuentra en la porción craneomedial, el cuerpo rodea dorsomedialmente al testículo y se continúa con la cauda que está situada en la región posterior de éste (Purswell y Freeman, 1993). Los cortes histológicos, observación y fotografías de las muestras se realizaron en el Departamento de Morfología de la FMVZ UNAM.

Los órganos fueron fijados en el medio de Bouin's (Russell, y col. 1991) e incluidos en parafina, se realizaron 3 cortes de cada testículo y de cada región del epidídimo, con un grosor de 6 micras. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H-E), PAS-Hematoxilina (PAS-H) y Pentacrómica de Whip (PW). La observación, análisis y fotografías de los cortes se realizaron con un microscopio "Labor Lux O" con adaptador para una cámara Wild Leitz MPS S2.

#### **5.7. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de las variables de respuesta se realizó por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas. El modelo utilizado fue: Y= Tratamiento, individuo anidado dentro del tratamiento, tiempo, y la interacción tratamiento por tiempo. Los resultados son expresados en medias cuadradas mínimas  $\pm$  Error Estándar. Las diferencias significativas se consideraron cuando  $p < 0.05$ .

# VI RESULTADOS

---

## 6.1. Efecto de la aplicación parenteral de MPA en la concentración plasmática de testosterona

Para la evaluación de esta variable se examinaron un total de 14 muestras de sangre por perro, 4 antes del tratamiento y 10 posteriores a éste (CUADRO 1).

En el CUADRO 2 se muestran los promedios de testosterona plasmática (ng/ml) del grupo tratado y control respectivamente, obtenidos a partir de un total de 166 muestras, donde se observa que hubo diferencias estadísticamente significativas en dos periodos ( $p < 0.05$ ). El primero comprendido entre el día 23 ( $1.27 \text{ ng/ml} \pm 0.36$  y  $3.70 \text{ ng/ml} \pm 0.36$ ) y el día 37 ( $0.90 \text{ ng/ml} \pm 0.36$  y  $2.84 \text{ ng/ml} \pm 0.36$ ). El segundo periodo comprendido entre el día 47 ( $2.31 \text{ ng/ml} \pm 0.36$  y  $3.70 \text{ ng/ml} \pm 0.36$ ), el día 61 ( $1.61 \text{ ng/ml} \pm 0.36$  y  $3.06 \text{ ng/ml} \pm 0.36$ ) y el día 68 ( $1.15 \text{ ng/ml} \pm 0.36$  y  $2.79 \text{ ng/ml} \pm 0.36$ ). Estos datos se pueden observar gráficamente en la Fig. 1.

## 6.2. Efecto en el testículo y en el epidídimo

### 6.2.1. Testículo

Se realizaron 3 cortes histológicos de cada uno de los testículos obtenidos, haciendo un total de 72 cortes (36 por grupo). Del total, 48 se tiñeron con H-E y 24 con PAS-H; esto último con el propósito de evidenciar el desarrollo y evolución del acrosoma *in situ*.

Al analizar los detalles histológicos de los testículos de ambos grupos, se observaron alteraciones morfológicas en 6 de los cortes (16.6%) pertenecientes a uno de los testículos de 2 perros del grupo control. Sin embargo, estos cambios fueron atribuibles a las mordeduras en los testículos que sufrieron dichos animales, por sus demás compañeros. En las 30 muestras restantes (83.4%) de ambos grupos, no se advirtieron cambios ni en el número de estratos celulares de los túbulos seminíferos, ni en las células intersticiales (Fig. 6 y 7).

En ambos grupos, se observaron algunas regiones de los túbulos seminíferos con pocas capas de células germinales, además el citoplasma de la célula de dichas regiones se encontraba vacuolado y no había espermátides ni espermatozoides en su luz (no se muestran datos). Los cortes histológicos que fueron teñidos con PAS-H, para contrastar el núcleo y el acrosoma, tampoco mostraron alteraciones (no se muestran datos).

#### 6.2.2. Cabeza del epidídimo

Se realizaron 3 cortes histológicos de cada cabeza del epidídimo obtenida, haciendo un total de 72 cortes (36 por grupo). Todos fueron teñidos con H-E. Solamente 6 muestras (16.6 %) pertenecientes a 1 de los epidídimos de 2 perros del grupo control que fueron mordidos, exhibieron cambios, los cuales se atribuyeron a dicho problema. Las 30 muestras restantes (83.4 %) no mostraron ninguna alteración morfológica aparente.

Ambos grupos presentaron los túbulos del epidídimo grandes revestidos con un epitelio pseudoestratificado, las células presentaron sus núcleos en la parte basal y estereocilios largos en la parte apical. Todas las muestras observadas mostraron la presencia de espermatozoides en la luz de los túbulos.

En el área peritubular de esta región del epidídimo, los conductos se encontraron rodeados de una sola capa de músculo liso circular, tejido conjuntivo y fibroblastos (Fig 8 y 9.).

#### 6.2.3. Cuerpo del epidídimo

Se realizaron 3 cortes histológicos de cada cuerpo del epidídimo obtenido, haciendo un total de 72 cortes (36 por grupo), todos fueron teñidos con H-E. De los cortes observados, 6 (16.6 %) nuevamente pertenecientes a 2 de los perros mordidos del grupo control, exhibieron cambios morfológicos aparentes. Las 30 muestras restantes (83.4 %) mantuvieron una morfología normal (Fig. 10 y 11).

El epitelio y los estereocilios de esta región se observaron menos altos en comparación con los de la cabeza del epidídimo. La luz de los túbulos fue más pequeña y la presencia de espermatozoides fue en mayor cantidad que la de la región de la cabeza. También se pudo observar material de exfoliación.

La capa muscular externa del túbulo se observó incompleta, con algunos cordones de células musculares lisas con disposición longitudinal y oblicua.

#### 6.2.4. Cauda del epidídimo

Se realizaron 3 cortes histológicos de cada cauda del epidídimo obtenida, haciendo un total de 72 cortes (36 por grupo). Todos se tiñeron con H-E. Únicamente 6 de las muestras observadas (16.6 %) pertenecientes a los perros agredidos antes mencionados, mostraron alteraciones en la

morfología, sin que éstas se puedan atribuir al tratamiento. Los cortes restantes (83.4 %), no presentaron cambios morfológicos entre grupos. Se observó un epitelio de tipo cuboidal, con estereocilios pequeños, en forma de borde de cepillo (Fig. 12 y 13). Al igual que en la región del cuerpo del epidídimo, en ambos grupos se presentó la exfoliación de células hacia la luz, lo cual es parte normal de la renovación celular de este órgano. Se observó también, la presencia de grandes cantidades de espermatozoides en la luz de esta región.

El área peritubular de la cola del epidídimo estuvo constituida por 3 capas musculares; 1 longitudinal interna, 1 circular y 1 longitudinal externa. Estas observaciones fueron verificadas con la obtención de 6 cortes histológicos más, los cuales fueron teñidos con PWV, pues esta tinción tiene la particularidad de colorear de azul el tejido intersticial y de rojo el muscular (Steven y Lowe, 1989).

### **6.3. Efecto en el eyaculado**

#### **6.3.1. Volumen de eyaculado**

Para evaluar esta variable se obtuvieron un total de 20 eyaculados por perro, 8 antes del tratamiento y 12 posteriores a este. En el CUADRO 3 se presentan los valores promedio del volumen de los 12 eyaculados obtenidos por cada día de muestreo (240 muestras en total). En la Fig. 2 se presentan gráficamente los mismos datos. Estadísticamente, a pesar de observarse una disminución en el volumen del eyaculado de los perros tratados con 20 mg/kg de MPA esta variable no presentó diferencia significativa entre grupos ( $p > 0.05$ ).

#### **6.3.2. Concentración espermática**

Para evaluar esta variable se analizaron un total de 20 eyaculados por perro, 8 antes del tratamiento y 12 posteriores a este. En el CUADRO 4 se presentan los valores promedio de la concentración espermática estimada a partir de los 12 eyaculados obtenidos por cada día de muestreo (240 muestras en total). En la Fig. 3 se observan de manera gráfica, los mismos datos. A pesar de que en el grupo que recibió tratamiento, se apreció una disminución de esta variable a partir del día 9, ésta no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) al ser comparada con el grupo testigo.

#### **6.3.3. Mortalidad espermática**

Para evaluar esta variable se obtuvieron un total de 9 eyaculados por perro, 3 antes del tratamiento y 6 posteriores a este. En el CUADRO 5 se presentan los valores promedio de la mortalidad espermática, obtenidos a partir de 12 eyaculados colectados por cada día de muestreo (108 muestras en total). En la Fig. 4 se observan gráficamente estos valores. No obstante, de acuerdo a la evaluación estadística de este parámetro no se presentó ninguna significancia ( $p > 0.05$ ).



#### **6.4. Efecto en la morfología espermática**

Para evaluar esta variable se obtuvieron un total de 20 eyaculados por perro, 8 antes del tratamiento y 12 posteriores a este. En el CUADRO 6, se presentan los valores promedio de las anomalías espermáticas observadas y estimadas a partir de los 12 eyaculados obtenidos por cada día de muestreo (240 muestras en total). Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ). En el CUADRO 7 se puede observar el porcentaje de las anomalías más frecuentes en cada uno de los perros de ambos grupos, resaltando que los que recibieron el tratamiento, tuvieron un mayor número de flagelos enroscados y de irregularidades acrosomales. En las Figs. 14, 15, 16 y 17 se pueden apreciar las diferentes anomalías espermáticas de los eyaculados de ambos grupos.

## VII DISCUSIÓN

---

La dosis de MPA aplicada en los animales, varía de 1.1 mg/kg a 20 mg/kg (Bamberg-Thalén y Linde Forsberg, 1992; Páramo y col. 1993; Klausner y col., 1995; England, 1996; Jonhston y col. 2001). En el ser humano la variación es de 20 a 1000 mg/individuo (Faundes y col. 1981; Guerin y Rollet, 1988; Wu y Aitken, 1989; World Health Organization, 1993; Rosenstein, 1996). Presentándose además en ambos casos, una gran divergencia en la periodicidad de su aplicación, la vía de administración empleada y las posibles combinaciones de esta hormona con otros fármacos (Lobl y col., 1983, Klausner y col., 1995; England 1996; Rosenstein, 1996; Jonhston y col. 2001).

En este trabajo, el empleo de una dosis de 20 mg/kg de MPA, se fundamentó en los resultados obtenidos por otros autores, en donde informan que los efectos detriminentales observados en la calidad del eyaculado y en la morfología del testículo y del epidídimo se observan utilizando dosis por arriba de los 10 mg/kg (Lobl y col., 1983; Linde Forsberg y col., 1992; England 1996; Jonhston y col. 2001).

La aplicación de una sola dosis se realizó tomando en consideración que el MPA es un medicamento de liberación lenta y con una vida media de hasta tres meses (Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg, 1992; Agencia de los EE UU para el desarrollo internacional, 1995).

La determinación de seguir muestreando a los animales hasta 3 meses después del tratamiento, se estableció a partir de lo investigado por Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg (1992), quienes al aplicar una dosis de 4 mg/kg de MPA por vía SC y medir las concentraciones plasmáticas de este compuesto, observaron que los niveles plasmáticos máximos se alcanzaron aproximadamente a los 14 días después de su aplicación y que a partir de ese momento dichos niveles fueron descendiendo paulatinamente hasta ser bajos en el día 117 después de su aplicación. Este periodo

de tiempo es similar al observado en las mujeres, por lo que su aplicación es trimestral<sup>3</sup>. Además, en el caso del perro, el proceso de espermatogénesis tiene una duración de 54 días aproximadamente, que incluyen el ciclo del epitelio seminífero y la maduración espermática en el epididimo (Sharpe 1994); por lo que el periodo de muestreo que se estableció fue adecuado para permitir observar el efecto del medicamento sobre los primeros estadios de desarrollo de las espermatogonias y hasta que estas se convierten en espermatozoides y fueron expulsados en el eyaculado.

#### **7.1. Efecto de la aplicación de MPA en la concentración plasmática de testosterona**

El MPA en el macho, se ha utilizado con el fin de producir un efecto anticonceptivo. Algunos investigadores señalan que es suficiente utilizar dosis bajas (4mg/kg) de MPA para producir decremento en los niveles plasmáticos de testosterona (Wright 1979; Bain 1980; Aribarg 1983 y Linde-Forsberg y col., 1993). Con el propósito de garantizar este efecto, en el presente trabajo se utilizó una dosis mayor (20mg/kg). Los resultados obtenidos mostraron que efectivamente, la concentración plasmática de testosterona disminuyó en el grupo que recibió el tratamiento. Sin embargo, esto no fue constante en el periodo de muestreo. En promedio, la testosterona plasmática del grupo control fue de  $2.8 \pm 0.36$  ng/ml y de  $2.0 \pm 0.36$  ng/ml en el grupo tratado; observándose una reducción del 28.6%; sin embargo, esta disminución únicamente fue significativa ( $p < 0.05$ ), en los periodos de tratamiento comprendidos entre los días 23 al 37 y los días 61 al 68.

La disminución de la testosterona plasmática, coincide con los resultados obtenidos por Jonhson, (1970); Austin, (1982); Lobl y col., (1983); Meyer (1985); Wu y Aitken, (1989); Rosenstein, (1996); Wu y col., (1999); quienes observaron que la aplicación de progestágenos provoca un desequilibrio en la producción de GnRH en el hipotálamo o bien de las gonadotropinas (FSH y LH) en la hipófisis; que se manifiesta en una disminución de las mismas. Cabe señalar que estos investigadores no informan si el descenso es continuo o en intervalos como sucedió en esta investigación.

El descenso de testosterona observado en el primer periodo comprendido entre los días 23 a 37, quizá se debió a que la concentración de MPA plasmática se encontraba en sus niveles máximos, lo cual concuerda con el trabajo de Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg (1992). Estos investigadores al aplicar una sola dosis de 4 mg/kg de MPA por vía SC observaron que los niveles plasmáticos máximos de este fármaco se alcanzaron aproximadamente a los 14 días después y que estos fueron disminuyendo rápidamente hasta el día 35, para decrecer de manera paulatina hasta el día

<sup>3</sup> Información médica aportada por el laboratorio PHARMACIA®; y en las siguientes direcciones electrónicas: [www.decpovera.com/consumer/about-depo/index.htm](http://www.decpovera.com/consumer/about-depo/index.htm); [www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/202758.html](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/202758.html)

91. Sin embargo, la declinación de esta hormona en el segundo período no tiene una explicación clara.

Las investigaciones realizadas por Lobl y col. (1983) en ratas mostraron que un descenso de la testosterona plasmática provoca una disminución de la concentración de ABP en el testículo y en el epidídimo, lo que posiblemente ocasione que aumenten sus niveles de concentración en la sangre. También mencionan que el decremento de la concentración de ABP, posiblemente se debe a una disminución en la producción de FSH y testosterona, propiciándose un soporte insuficiente para el buen funcionamiento de las células de Sertoli. Por lo anterior, sería muy conveniente valorar si en el perro se presenta este mismo comportamiento.

## **7.2. Efecto de la aplicación de MPA en la histología del testículo y del epidídimo**

En diversos estudios realizados al respecto, se ha publicado que las aplicaciones repetidas de MPA reducen el peso del testículo y del epidídimo (Lobl, y col. 1983), lo cual se manifiesta en cambios en la morfología de estos órganos, tales como la reducción del diámetro de los túbulos seminíferos, el adelanto en el desarrollo de algunos estadios de las células germinales, oligozoospermia y la presencia de células germinales inmaduras en su luz (Lobl, y col. 1983; Páramo 1993).

En este trabajo, no se observaron cambios histológicos aparentes en el testículo ni en el epidídimo de los perros tratados. Probablemente la aplicación de MPA en dosis única no es suficiente como para provocar alguna alteración, pues los investigadores que han empleado dosis múltiples reportan cambios morfológicos en estos dos órganos (Lobl, y col. 1983; Páramo 1993).

Los hallazgos histológicos del testículo, encontrados en este trabajo como la presencia de escasas células germinales, la vacuolización del epitelio y la ausencia de espermátides y de espermatozoides en varios de los cortes de testículo observados, concuerda con los informes de Lesson y col. (1987), quien considera que éstas son regiones de transición entre el tejido testicular y epididimal y no se pueden atribuir al tratamiento dado que, dichas alteraciones también fueron encontradas en los cortes histológicos de testículo de los perros del grupo control.

En los cortes histológicos de la región del cuerpo del epidídimo, se observaron numerosos espermatozoides en la luz de sus túbulos, lo cual coincide con lo indicado por Fawcett (1989). Sin embargo, Orsi (1983) refiere que en esta región, la cantidad de espermatozoides en la luz debe de ser baja, no obstante, estos resultados pueden estar influenciados por el tipo de corte y el área observada.

Las células epiteliales exfoliadas en la luz resultan de la renovación celular de este órgano, (Orsi, 1983; Fawcett, 1989).

### **7.3. Efecto de la aplicación de MPA en el eyaculado**

#### **7.3.1. Volumen de eyaculado**

Existen muy pocos datos que aporten información a este respecto. Diversos investigadores como Wu y Aitken (1989); The World Health Organization (1993) y Wu y col. (1999); no encontraron alteraciones en este parámetro al valorar el efecto de la aplicación de progestágenos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, pues si bien se llegó a percibir una ligera disminución del volumen del eyaculado en los perros que recibieron 20 mg/kg de MPA, esta no fue significativa ( $p > 0.05$ ).

Por otra parte, la escasa información con que se cuenta, proviene de investigaciones que se han realizado en el ser humano; por lo que resultaría de gran relevancia hacer más estudios en el perro, pues en esta especie los únicos datos son los que se tienen sobre la aplicación de MPA para controlar la hiperplasia prostática benigna. En esta patología la aplicación de dosis bajas de MPA disminuye el tamaño y peso de la próstata (Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg, 1992; Olson y col., 1989b; England 2000) al disminuir los niveles de testosterona. La próstata aporta el volumen de eyaculado en el perro, por lo que pudiera sospecharse que al disminuir el tamaño y el peso de ésta, posiblemente el volumen pudiera verse afectado (Cowan y Barsanti, 1991; Bamberg-Thalén y Linde-Forsberg, 1992), pero desafortunadamente no se cuenta con datos precisos en lo referente a este tema, por lo que sería muy conveniente tomar en consideración este órgano en un futuro.

#### **7.3.2. Concentración espermática**

La mayoría de las investigaciones informan que la concentración espermática disminuye con el uso de dosis mayores a 10 mg/kg de MPA (Lobl y col., 1983; England, 1997; Jonhston, 2001). En varias de estas investigaciones se ha producido oligozoospermia en grado variable e incluso azoospermia (Lobl y col., 1983; Wu y Aitken, 1989; Olson, 1991; Páramo y col., 1993; World Health Organization, 1993; England 1995; England, 1997; Jonhston, 2001). En los animales del grupo tratado evaluados en el presente trabajo, se observó oligozoospermia a partir del día 9, sin embargo, estadísticamente esta no resultó significativa. La azoospermia no se presentó en ninguno de los animales de experimentación.

Para el mantenimiento adecuado de la espermatogénesis, se requiere que la concentración intratesticular de testosterona sea de 25-45% más alta que la del plasma (Sharpe, 1987; Sharpe, 1989; Russell, 1990; Ellington, 1994; Bazer y col., 1996; Garner y Hafez, 1996). En el testículo existe un control "local" que permite mantener la espermatogénesis; este mecanismo, puede aportar los niveles suficientemente adecuados de dicha hormona al interior del testículo (Sharpe, 1983; Sharpe y col., 1988; Sharpe y col., 1992); debido a que las células de Leydig mantienen niveles más altos de testosterona a su alrededor.

Ahora bien, a partir de los datos antes mencionados, surge el siguiente cuestionamiento ¿Hasta cuándo comienza a descender el nivel de testosterona intratesticular como para interrumpir la espermatogénesis? De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, se pudo observar que la aplicación de 20 mg/kg de MPA no fue suficiente para provocar una disminución significativa en la concentración espermática, lo cual parece indicar que posiblemente la testosterona intratesticular no se vio afectada durante los 3 meses en que se evaluó este tratamiento.

Por lo antes mencionado, sería interesante que en estudios consecutivos se aplicaran dosis mayores de MPA y en forma repetida, se alargara el periodo de muestreo postratamiento y se midiera la concentración de testosterona intratesticular y plasmática; todo ello con la finalidad de investigar el mecanismo del control "local" que permite mantener la espermatogénesis en el perro.

#### **7.3.3. Mortalidad espermática**

Hasta la fecha no existen investigaciones suficientes que sustenten que la aplicación de MPA pueda influir en la mortalidad espermática. En este trabajo, no se observaron diferencias estadísticas entre los resultados promedio de los perros tratados y de los controles. No obstante, cabe mencionar que se advirtió un aumento drástico de la mortalidad espermática en el grupo control en los días 20, 37 y 50, lo cual posiblemente fue debido a alguna falla en el manejo de esas muestras durante el desarrollo de la técnica de la triple tinción. Una de las desventajas de esta técnica, es que se requiere de tiempos muy prolongados para su realización en donde se tiene que cuidar que no se produzcan cambios drásticos de temperatura y del medio ambiente (Kawakami y col., 1993).

#### **7.4. Efecto en la morfología espermática**

En este trabajo, al emplear una dosis única de 20 mg/kg de MPA no se obtuvieron cambios significativos en el porcentaje de las anormalidades espermáticas observadas. Algunos autores postulan que la aplicación de este progestágeno en dosis elevadas provoca un aumento de la teratozoospermia (Olson, 1989b y Olson, 1991), la cual se relaciona con una baja fertilidad (Oettlé y Soley; 1988; Wu y Aitken, 1989; World Health Organization, 1993; Páramo y col., 1993; England, 1995; Oettlé, 1995; Johnston, 2001).

Posiblemente una sola dosis de MPA no haya sido suficiente como para provocar teratozoospermia, pues en muchas de las investigaciones se aplicaron dosis repetidas de MPA (Meyer 1985; Páramo y col., 1993) o se utilizaron en combinación con andrógenos (Wu y Aitken 1989; England 1997). En el presente trabajo se pudo comprobar que como método anticonceptivo la dosis única de MPA no es capaz de producir teratozoospermia. Como se sabe uno de los factores que influyen al momento de elegir algún método anticonceptivo es la frecuencia de aplicación (Schaffenburg y col., 1981; Burke, 1986; Knuth y Nieschlag, 1987; Wu, 1988; Olson y

col., 1989; Lincoln, 1992), por lo tanto el empleo de MPA solo y en una sola aplicación no resulta ser eficaz.

Las anomalías que se presentaron con mayor frecuencia en el grupo tratado, fueron las de enrollamiento del flagelo (en grado variable) y las de abombamiento e irregularidad del acrosoma. Ambas corresponden a las anomalías de tipo secundario (Oettlé y Soley, 1988; Johnston, 1991). Cambios drásticos de la temperatura o del medio ambiente que rodea al espermatozoide aumentan el porcentaje de células con flagelo enrollado (Oettlé, 1995), en este trabajo la evaluación de la morfología espermática fue empleando la triple tinción, que como se mencionó anteriormente presenta un tiempo prolongado de procesamiento. Por otra parte, un aporte insuficiente al epidídimo de ABP y de testosterona provoca una maduración inadecuada del espermatozoide durante su viaje por este órgano; una de las estructuras que completa su maduración es el acrosoma. La aplicación de MPA produce que ambas moléculas disminuyan en el epidídimo (Lobl y col. 1983; Wu y Aitken 1989; England 1997). Posiblemente el abombamiento e irregularidades acrosomales observadas en esta investigación pudieran deberse al uso de este compuesto, aún cuando fue aplicado en una sola ocasión. Oettlé (1995), reportó la presencia de esta anomalía en perros que no recibieron ningún tratamiento. Los espermatozoides inmaduros pertenecientes a la etapa V del ciclo del túbulo seminífero (penúltimo tipo celular de esta asociación que presenta este abombamiento) normalmente se están desprendiendo del epitelio seminífero de en este estadio (Russell 1990). Sin embargo, en esta investigación aún cuando no hubo diferencias estadísticas, dicha alteración se presentó con mayor frecuencia en el eyaculado de los perros que recibieron el tratamiento, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Páramo y col., (1993); quienes observaron la presencia de este abombamiento acrosomal en los espermatozoides colectados de la cabeza del epidídimo de perros tratados con dosis altas y repetidas de MPA y tiempo después estas alteraciones también fueron observadas en el eyaculado de dichos perros.

Investigaciones posteriores deberían ser realizadas con la finalidad de medir la capacidad fecundante de los espermatozoides de los perros tratados con MPA.

Se requieren estudios adicionales para determinar si aplicaciones repetidas de este fármaco son capaces de inducir alteraciones en la calidad del semen y en la morfología del testículo y epidídimo; así como para verificar cuál sería la vía de administración y el intervalo de aplicación más adecuado.

## VIII CONCLUSIONES

---

En este estudio el tratamiento único de acetato de medroxiprogesterona (MPA) por vía subcutánea pudo disminuir la concentración plasmática de testosterona de 2.7 a 2.0 ng/kg. Sin embargo, esta disminución no produjo cambios aparentes en la calidad del semen, ni tampoco alteraciones histológicas en testículo y en epidídimo durante los tres meses que se evaluó. Por lo que se concluye que la aplicación de 20mg/kg de MPA por vía SC no es eficiente como un método anticonceptivo en el perro.



# ABREVIATURAS

---

ABP	Proteína transportadora de andrógenos
CGP	Células Germinales Primordiales
DHT	Dihidrotestosterona
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
H-E	Hematoxilina y Eosina
IM	Intramuscular
LH	Hormona luteinizante
MIS	Sustancia inhibidora de los conductos de müller
MGA	Acetato de melengestrol
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
PAS	Ácido peryódico-Schiff
PAS-H	Ácido peryódico-Schiff-Hematoxilina
S	Spermac
SC	Subcutánea
TT	Triple tinción
WP	Pentacrómica de Whip

## IX REFERENCIAS

---

---

Wu CWF. Male contraception: Current status y future prospects. Clin Endocrinol 1988; 29:443-465.

Agencia de los EE UU para el desarrollo internacional. Population Reports. Una nueva era para los inyectables. Agencia de los EE UU para el desarrollo internacional. Serie K; 5:1-32; 1995.

Rosenstein SE. Diccionario de especialidades farmacéuticas 42a ed. México: Ediciones PLM México 1996.

Schaffenburg AC, Gregoire TA y Gueriguan LJ. Guidelines for the clinical testing of male contraceptive drugs. J Androl 1981; 2:225-228.

Wu CWF and Aitken JR. Suppression of sperm function by depot medroxyprogesterone acetate and testosterone enanthate in steroid male contraception. Fert. Sterility 1989; 51:691-698.

Foresta C, Rosatto M, Mioni R ND Zorzi M. Progesterone induces capacitation in human spermatozoa. Andrologia 1992; 24:33-35.

Lincoln WD. Human contraception: development of new scientific opportunities J Reprod Fert 1992; Suppl 45:175-192.

England GCW. The effects of progestagens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in the dog. Therigenology 1995; 40:1073-1081.

Carter C. Pet population control: Another decade without solutions? J Am Vet Med Assoc 1990; 197:192-195.

Slater RM. The role of veterinary epidemiology in the study of free-roaming dogs and cats. Prev Vet Med 2001; 48:273-286.

Faulkner CL. Dimensions of the pet population problem. J Am Anim Hos Assoc 1975;166:477-478.

Méndez ARE. Diversos métodos utilizados en perros para controlar la natalidad canina. Revisión bibliográfica. (Tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1986.

Jöchle W. Pet population control in Europe?. J Am Vet Med Assoc 1991;7:1225-1229.

Matter CH, Wandeler IA, Neuenschwander EB, Harischandra PAI, Meslin XF. Study of the dog population and the rabies control activities in the Mirigama area of Sri Lanka. Acta Trop 2000; 75: 95-108.

Olson NP, Nel MT, Bowen AR, Amann PR, Sawyer RH, Gorell AT, Niswender DG, Pickett WB, Plemister DR. Current methods of sterilizing pets. Vet Technician 1989a; 10:56-60.

Olson NP, Nel MT, Bowen AR, Amann PR, Sawyer RH, Gorell AT, Niswender DG, Pickett WB, Plemister DR. Potential methods of contraception for dog and cats. Vet Technician 1989b; 10:132-138.

Garza MV. Control del ciclo reproductivo de la perra: Estudio recapitulativo. (Tesis licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1996.

Christiansen JI. Reproducción en el perro y en el gato. Buenos Aires: Intervet, Argentina 1989:3-41.

Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson, PN. Canine and Feline Theriogenology. Saunders Co. London 2001.

England GCW. Control farmacológico de la reproducción en el perro. In: Simpson GM, England GCW, Harvey MJ: Manual de reproducción y neonatología. México: Hancurt. 2000: 125-138.

Páramo RM, Renton JP, Ferguson JM, Concannon, PW. Effects of Medroxyprogesterone acetate or Gonadotrophin-releasing hormone agonist on suppression of spermatogenesis in the dog. J Reprod Fertil 1993; 47:387-397.

Baker TG. Células germinales primordiales. In: Austin RC, Short VR. Células germinales y fertilización. México: La prensa médica mexicana, 1982:1-14.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K, Watson JD. Biología molecular de la célula. 3a ed. Barcelona: Omega, 1996.

Bysson GA. Primordial germ cells and regulation of meiosis. In Austin RC, Short VR.: Germ cell and fertilization. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990: 1-16.

Garner DL y Hafez ESE. Espermatozoides y plasma seminal In: Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6<sup>º</sup> ed. México: Interamericana, 1996: 158-179.

Stevens A y Lowe J: Texto y atlas de histología. México: Mosby/Doyma Libros. México, DF 1992. 304-314.

Fawcett WD. Tratado de histología. 11a ed. México: Interamericana. México, D F. 1989, 802-856.

Lesson CR, Lesson TS, Paparo AA Histología. 5a ed. Interamericana. México, D. F. 1987:512-139.

Foot HR, Swierstra EE, Hunt WL. Spermatogenesis in the dog. Anat Rec 1972; 173:341-352.

Monesi V. Espermatogénesis y espermatozoides. In: Austin CR, Short RV. Células germinales y fertilización; México: La prensa médica mexicana, 1982:49-106.

Rusell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED: Histological and histopathological evaluation of the testis. EE UU: Cache River Press, 1990.

Garner DL y Hafez ESE. Espermatozoides y plasma seminal In: Hafez ESE. Reproducción e inseminación Artificial en animales 7<sup>º</sup> ed. México: Mc Graw Hill, 2000: 98-112.

Orsi MA. Regional histology of the epididymis of the dog. A light microscope study. Anat Anz Jena 1983; 153:441-445.

Palacios J, Regadera J, Paniagua R, Gamallo C, Nistal M. Inmunohistochemistry of the human ducts epididymis. Anat Rec 1993; 235:560-566.

Austin CR. Papel de las hormonas en los ciclos sexuales In: Austin CR y Short RV. Hormonas en la reproducción. México: La prensa médica mexicana, 1982: 41-50.

Rosenstein SE. Diccionario de especialidades farmacéuticas 35a ed. México: Ediciones PLM México 1988.

Williams LC y Stanal MG. Estrógenos y progestágenos In: Goodman GA editor. Las bases farmacológicas de la terapéutica 9a ed. México: Interamericana-Mc Graw Hill, 1996: 1497-1529.

Amory KJ, Bremner W. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. *Moll Cell Endocrinol* 2001; 186:205-209.

Purswell BJ, Freeman LE. Reproduction in the canine male: Anatomy, Endocrinology and spermatogenesis. *Canine Practice* 1993; 18:8-14.

Elligton JE. Diagnosis, treatment and management of poor fertility in stud dog. *Small Anim* 1994; 9: 46-53.

Speteri-Grech J and Niechlag E. Paracrine factors relevant of the regulation of spermatogenesis- a review. *J Reprod Fert* 1993; 98:1-14.

Sharpe MR. Regulation of spermatogenesis. In: Knobill E and Neill JD editors. *The physiology of reproduction* 2<sup>nd</sup> ed. Ltd, New York:Raven Press, 1994:1363-1433.

Sharpe MR. Testosterone and spermatogenesis. *J Endrocr* 1987; 113:1-2.

Courot M. Transport and maturation on spermatozoa in the epididymis of mammals. *Prog Reprod Biol* 1981;8:67-69.

Eddy ME, O'Brien AD. The spermatozoon. In: Knobill E and Neill DJ editors. *The physiology of reproduction*, Vol. II. 2<sup>nd</sup> ed. Ltd, New York:Raven Press, 1994: 30-36.

Nagdas KS, Skudlarek DM, Orgebin-Crist M-C, Tulsiani PR. Biochemical alterations in the proacrosin-acrosin system during epididymal maturation of the rat spermatozoa. *J androl* 1992; 13:36-43.

Darnell J, Lodush H, Baltimmore D.: *Biología celular y molecular*. 2a ed. Barcelona: Omega, 1993.

Seager WJS, Platz CC. Collection and evaluation of canine semen. *Vet clin N Am Small Anim* 1977; 4:765-773.

Andersen K. Artificial Insemination and storage canine semen. In: Morrow W D. *Current Therapy in Theriogenology, Philadelphia, Saunders W. B* 1980: 661-666.

Oettlé EE and Soley TJ. Sperm abnormalities in the dog: A light and electron microscopic study. *J Vet Med Rev* 1988;59:28-70.

Tsutsui T, Tezuka T, Shimisu T, Murau I, Kawakami E, Ogasa, A. Artificial insemination with fresh semen in Beagle Bitch. *Jap J Sci* 1988.50:193-198.

Feldman EC y Nelson RW. *Endocrinología y reproducción en perros y gatos. 2a ed. México: Mc Graw Hill-Interamericana, 1996.*

Farstad W. Cubrición e inseminación artificial en el perro. In: Simpson G M, England G C W, Harvey M J. *Manual de reproducción y neonatología. México: Hancurt, 2000:125-138.*

Sorribas, C E: *Reproducción en los animales pequeños. 2a ed. Buenos Aires: Intermédica. Argentina, 2000:67-72.*

Seed J, Chapln ER, Clegg DE, Dostal AI, Foote HR, Hurtt EM, Klinefelter RG, Makris LS, Perreault DS, Schrader S, Sëller D, Sprando R, Treinen AK, Veeramachaneni RND and Wise DL. Methods for assessing sperm motility, morphology and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol* 1996; 10:237-244.

England ECG and Allen EW. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec* 1989; 125:399.

Olson P. Recolección y evaluación del semen canino In: Kirk WR y Bonagura BJ. *Terapéutica veterinaria de pequeños animales 11a ed. México:McGraw Hill Interamericana, 1994:1039-1044.*

Johnston S D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin N Am* 1991; 21:545-551.

Sorensen G A. *Reproducción animal. 6a ed. México: Mc Graw Hill, 1984.*

Oettlé EE. Anormalidades de los espermatozoos y fecundidad en el perro In: Kirk WR y Bonagura BJ, editores. *Terapéutica veterinaria de pequeños animales* 12a ed. México: McGraw Hill Interamericana, 1995:1141-1151.

Chacón J. Breeding soundness evaluation of zebu bulls (tesis de doctorado). Costa Rica (Uppsala). Swedish University of Agricultural Science, 2000.

Wright JP, Stelmasiak T, Black D, Sykes D. Medoxyprogesterone acetate and reproductive processes in male dogs. *Aust Vet J* 1979; 55:437-438.

Meyer WJ, Walter PA, Emory LE, Smith ER. Physical, metabolic, and hormonal effects on men of long-term therapy with medroxyprogesterone. *Fertil Steril* 1985; 43: 102-109.

Bain J, Rachlis V, Robert E, Khait Z. The combined use of oral medroxyprogesterone acetate and methyltestosterone in a male contraceptive trial program. *Contraception* 1980; 21:365-379.

Handesman DJ, Conwat AJ, Hove CJ, Turner L, Mackey M-A. Establishing the minimum effective dose and additive effects of depot progestin in suppression of human spermatogenesis by a testosterone depot. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:4113-4121.

Meriggiola MC, Bremner WJ. Progestin-androgen combination regimens for male contraception. *J Androl* 1997; 18:240-244.

Wu CWF, Balasubramanian R, Mulders MTT, Coelingh-Bennink JTH. Oral progestogen combined with testosterone as a potential male contraceptive: additive effects between desogestrel and testosterone enanthate in suppression of spermatogenesis, pituitary-testicular axis, and lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:112-122.

Meriggiola MC, Costantino A, Cerpolini S. Recent advances in hormonal male contraception. *Contraception* 2002; 65:269-272.

England GCW. Reproductive biology in the dog. *The Vet Ann* 1996;36:187-201.

England GCW. Effect of progestagens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. *J Reprod Fert* 1997; Supl 51:123-138.

Hewitt D. Fisiología y endocrinología del macho in: Simpson GM; England GCW; Harvey MJ, editors. Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales. México D F: Hancourt, 2000:79-90.

Tsutsui T, Tsuji J, Kawakami E, Yamada Y, Amano T, Yamauchi M. Peripheral plasma androgen levels in the male dog from birth to sexual maturity. *Jpn J Vet Sci* 1987; 49:177-179.

Lobl JT, Musto AN, Gunsalud LG, Bardin WC. Medroxiprogesterone acetate has opposite effects on the androgen binding protein concentrations in serum and epididymis. *Biol Reprod* 1983;29:697-712.

Aribarg A. Fertility of male rabbits during oligozoospermia induced by injections of medroxiprogesterone acetate and testosterone ananthate. *Andrologia* 1983; 15: 578-583.

Burke TJ, Population control in the bitch. Morrow DA, Editor. In: *Current Therapy in Theriogenology* U.S.A: W. B. Saunders Co. 1986:528-531.

Knuth U, Nieschlag E. Endocrine approaches to male fertility control. In: Burger HG, editor. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*. Mexico city:Baillière Tindall, 1987:115-131.

Olson PN and Nett TM. Small animal contraceptives. In: Ettinger SJ, editor. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Vol. II, U. S. A: W. B. Saunders Co., 1989:1725-1731.

Bamberg-Thalén B, Linde-Forsberg C. The effects of medroxiprogesterone acetate and ethinylestradiol on hemogram, prostate, testes, and semen quality in normal dogs. *J Vet Med* 1992;39:264-260.

England GC. Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. *J Reprod Fertil* 1997; 51: 123-38.

Faundes A, Brache V, Leon P, Schmid F, Alvares-Sanchez F. Sperm suppression with monthly injections of medroxiprogesterone acetate combined with testosterone enanthate at a high dose (500mg). *J Androl* 1981; Suppl 2:235-245.



- Danner C, Frick J, Kunut G, Joos H, Kohle R. Spermatogenesis in men treated with injections of medroxiprogesterone acetate combines with testosterone enanthate. 1982; 5:246-252.
- Guerin JF, Rollet J. Inhibition of spermatogenesis in men using various combinations of oral progestagens and percutaneous or oral androgens. J androl 1988; 3:187-199.
- Gerber AH, Jöchle W, Sulman GF. Control of reproduction and of undesirable social and sexual behaviour in dogs and cats. J small Anim Pract 1973; 14: 151-158.
- Paulsen AC, Bremner JW, Leonard MJ. Male contraception: Clinical trials. Adv Fert Res 1982; 157-170.
- Klausner SJ, Johnston DS, Bell WF. Trastornos prostáticos caninos. In: Kirk WR y Bonagura BJ, editores. Terapéutica veterinaria de pequeños animales 11a ed. México:McGraw Hill Interamericana, 1995:1187-1193.
- World Health Organization. Comparison of two androgens plus depot-Medroxiprogesterone acetate for suppression to azoospermia in Indonesian men. Fert Steril 1993; 6:1062-1068.
- Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL. The testis. In: Gomes WR. Chemical suffocating testicular function New York and London: Academic Press. 1970:483-545.
- Prasad MR, Rajalakshmi M. Target sites for suppressing fertility in the male. Adv sex Horm Res 1976; 2: 263-287.
- Linde-Forsberg C, Ström B, Bamberg-Thalén B. Effects of Medroxiprogesterone acetate on semen quality of the dog. Therigenology 1993; 40:1073-1080.
- Cowan LA and Barsanti JA. Effects of castration on chronic bacterial prostates. J Am Vet Med Assoc 1991; 199:346-349.
- Olson NP. Clinical approach to evaluating dogs with azoospermia or aspermia. Vet clin N Am Small Anim 1991; 21:591-608.
- Bearden H J y Jun W. Reproducción animal aplicada. Manual Moderno. México 1985.

Oettlé EE. Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet Med* 1986; 81: 263-266.

Oettlé EE. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil* 1993; Suppl.47: 257-269.

Talbot P, Chacon R. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J exp Zool* 1981; 215: 201-208.

Kawakami E, Vandervoort AC, Mahi-Brown AC, Tollner LT, Overstreet WJ. Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. *J exp Zool* 1993; 265:599-603.

Guerra MMP, Pereira RJTA, Oliveira MAL, Marques Jr AP, Lima PF e Baltar AES. Using of Trypan blue/giemsa to evaluate two methods of sperm recovery of goat semen. *Rev Bras Reprod Anim* 1997; 21:64-66.

Sharpe MR. Local control of testicular function Quarterly. *J Exp Physiol* 1983; 60:265-287.

Sharpe MR, Donachie K and Cooper I. Re-evaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat. *J Endocr* 1988; 117: 19-26.

Sharpe MR, Maddocks S, Millar M, Kerr BJ, Saunders KTP and McKinnell C. Testosterone and spermatogenesis. Identification of state-specific, androgens-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. *J Androl* 1992; 13:172-184.

Bazer FW, Geisert RD, Zavy MT. Fecundación, escisión e implantación. In: Hafez ESE. *Reproducción e inseminación artificial en animales* 6a ed. México: Interamericana, 1996: 180-202.

Rodríguez-Martínez H. Evaluación de semen congelado: Métodos actuales y de actualidad 2000 Junio. [http://www.ivis.org/advances/Repro\\_Chenoweth/Rodriguez\\_Martinez\\_es/chapter\\_frm.asp](http://www.ivis.org/advances/Repro_Chenoweth/Rodriguez_Martinez_es/chapter_frm.asp).

# X ANEXO

---

## 10.1. PROTOCOLO PARA LA TINCIÓN DE SPERMAC®

### 10.1.2. Características

Spermac® es uno de los colorantes de elección para evaluar la morfología del espermatozoide, esto debido a su facilidad de aplicación, rapidez y cualidades diferenciales, además de no requerir de equipo especializado (Oetllé y Soley, 1986; Oetllé 1993). Con esta tinción se obtiene una valoración cuantitativa de las diferentes estructuras del espermatozoide como son, acrosoma, región ecuatorial, núcleo, pieza media y flagelo; debido a que provee una buena definición y contraste (metacromacia) del espermatozoide (Oetllé y Soley, 1986). Al tener la capacidad de teñir el acrosoma debido a que los colorantes tienen afinidad por el contenido acrosomal y los componentes de su membrana, posibilita valorar su integridad (Oetllé y Soley, 1986; Oetllé 1993). Los daños en esta región aumentan la intensidad del colorante verde del Kit (Oetllé y Soley, 1986). Foote (1975) y Oetllé (1995); afirman que la integridad del acrosoma, es un parámetro que se relaciona con la fecundidad, por lo que resulta importante obtener datos al respecto.

### 10.1.2. Procedimiento

Esta tinción es un kit comercial que consta de 4 reactivos.

Se realiza un frotis delgado y uniforme con semen fresco, se deja secar al aire durante 5 minutos, se fija durante 5 minutos en el reactivo 1, se lava 5-6 veces con agua destilada, se tiñe durante 1-2 minutos con el reactivo 2, se vuelve a lavar 5-6 veces con agua destilada, se tiñe durante 1 minuto con el reactivo 3, se lava nuevamente 5-6 veces con agua destilada, se tiñe durante 1 minuto con el reactivo 4 y por último se lava nuevamente 5-6 veces con agua destilada.

Las muestras se observaron al microscopio con el objetivo de 100x y aceite de inmersión (Oetllé, 1986).

### 10.1.3. Interpretación

De acuerdo a los reactivos de esta tinción las estructuras espermáticas se tiñen de la siguiente manera:

Acrosoma de color verde

Núcleo de color rojo

Región ecuatorial de color verde pálido

Pieza media y flagelo de color verde (Oettlé y Soley, 1986).

## 10.2. PROTOCOLO PARA LA "TRIPLE TINCIÓN"

### 10.2.1. Características

Esta tinción consta de 3 colorantes, el azul tripán que puede aportar datos acerca de la viabilidad de los espermatozoides (Talbot y Chacon, 1981; Pereira y col., 1997; Guerra y col., 1997), debido a que en las células muertas hay pérdida de la integridad de la membrana permitiendo el acceso del colorante a dicha célula; el Rosa de Bengala que ayuda a la valoración de la integridad del acrosoma y el café Bismark que tiñe la región posacrosomal (Talbot y Chacon, 1981). Sin embargo una de sus desventajas, es que por tener un tiempo de procesamiento tan largo, puede provocar alteraciones en el espermatozoide (Talbot y Chacon, 1981; Kawakami y col., 1993), sobre todo las debidas a cambios bruscos de temperatura.

### 10.2.2. Reactivos

Azul tripán al 2% en PBS

Glutraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato al 0.1M a pH 7.4 {ácido cacodilato (sal de sodio) PM=214.03, 1.67 g de cacodilato / 50 ml de agua}

TRIS PM=121.4, 0.6 g / 50ml (0.1M)

Café Bismark al 0.8% en agua desionizada con un pH = 1.8 con HCl2N

Rosa de bengala 0.8% en buffer TRIS al 0.1M con pH 5.3 (Talbot y Chacon, 1981; Rodríguez - Martínez, 2000).

### 10.2.3. Procedimiento

Primeramente se lavan los espermatozoides, para lo cual se toma una pequeña muestra de aproximadamente 0.5 ml del eyaculado fresco y homogenizado, se coloca en una alícuota de 1ml y se introduce en una centrifuga (Fisher Cientific, Centrific Centrifuge) a 1500 RPM durante 5 minutos, se retira el sobre nadante y a los espermatozoides que quedaron suspendidos en el fondo se les añade 0.5ml de SSF, y se vuelve a centrifugar, este procedimiento se repite 2-3 veces. Posteriormente la muestra se diluye con un volumen igual de azul tripán y se incuba a 37°C durante 15 minutos, se centrifuga durante 5-10 min. a 1200 RPM, se retira el sobrenadante, se

adiciona PBS, hasta que se observa un azul claro. La muestra se fija con glutaraldehído al 3%, durante 60 minutos a 37°C, se centrifuga durante 5-10 minutos a 1200 RPM, se lava 2 veces con agua desionizada, se realiza un frotis y se deja secar al aire. Posteriormente, se tiñe con café Bismark a 37-40°C durante 5 minutos y se deja secar al aire. Por último se tiñe con Rosa de Bengala a 37°C durante 1 minuto, se lava, se deja secar al aire y se observa al microscopio con 100x y aceite de inmersión (Talbot y Chacon, 1981, modificada)

#### 10.2.4. Interpretación

Cabeza rosa-azul = Espermatozoide muerto con acrosoma intacto

Cabeza blanco-azul = Espermatozoide muerto sin acrosoma

Cabeza rosa-café = Espermatozoide vivo con acrosoma intacto

Cabeza blanco-café = Espermatozoide vivo con reacción acrosomal (Talbot y Chacon, 1981).

## *CUADROS Y GRÁFICAS*

**CUADRO 1. Concentración plasmática de testosterona (ng/ml) observada en cada uno de los perros del grupo tratado con MPA (20 mg/kg) y del grupo control**

**GRUPO TRATADO**

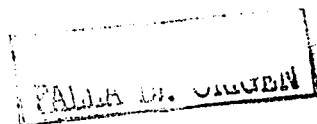
No. perro	Antes del tratamiento				Después del tratamiento									
	-29	-26	-16	-1	6	9	20	23	37	42	47	61	68	82
1	3.04	2.34	3.57	4.0	3.17	0.36	4.00	2.18	0.60	1.43	4.00	2.36	2.83	2.42
2	2.92	2.11	4.00	2.15	2.45	2.82	3.03	0.66	1.91	1.88	3.55	2.97	1.32	3.05
3	2.67	1.6	2.40	1.21	1.74	1.93	3.28	2.03	1.05	2.01	2.80	1.37	0.76	1.79
4	2.54	1.31	2.98	3.37	2.12	0.40	1.87	1.49	0.91	0.54	0.90	0.88	0.51	1.52
5	3.43	2.08	3.07	2.69	3.04	1.32	1.25	0.33	1.07	0.66	1.47	0.59	1.32	1.67
6	2.53	2.41	2.34	3.00	2.03	2.65	1.31	0.92	0.37	1.19	1.16	1.51	0.15	2.75

**GRUPO CONTROL**

No. perro	Antes del tratamiento				Después del tratamiento									
	-29	-26	-16	-1	6	9	20	23	37	42	47	61	68	82
7	4.00	3.04	2.76	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	2.47	4.00	2.78	4.00	3.65
8			1.92	1.28	0.41	2.36	0.32	4.00	3.16	1.23	3.84	4.00	0.64	2.07
9	0.64	0.08	19.7	3.60	2.17	4.00	4.00	4.00	1.97	1.39	4.00	4.00	3.78	4.00
10	1.59	1.23	2.11	4.00	3.29	1.46	4.00	4.00	0.96	2.39	2.40	2.03	3.21	3.19
11	1.7	1.45	3.24	2.51	1.77	2.17	2.89	2.23	4.00	3.77	4.00	2.71	3.19	1.87
12	2.30	1.75	4.00	3.84	2.89	0.96	1.33	4.00	2.95	1.96	4.00	2.88	1.95	4.00

Los números negativos indican los días de muestreo realizados antes del tratamiento.

Los valores marcados en negritas son los que se encuentran por arriba de 3.00ng/ml.

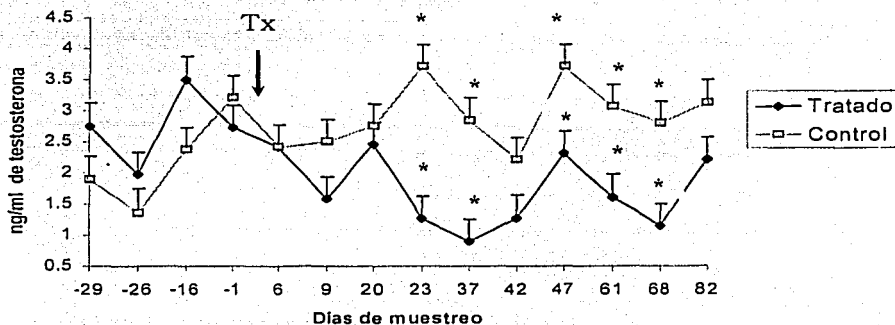


**CUADRO 2. Concentración plasmática de testosterona (ng/ml) en los perros tratados con MPA (20mg/kg) y en los controles**

Días de muestreo	Grupo tratado		Grupo control	
	Promedio	EEM	Promedio	EEM
-29	2.76	0.36	1.89	0.39
-26	1.98	0.36	1.35	0.39
-16	3.51	0.36	2.37	0.36
-1	2.73	0.36	3.20	0.36
6	2.42	0.36	2.42	0.36
9	1.58	0.36	2.49	0.36
20	2.45	0.36	2.75	0.36
23*	1.27	0.36	3.70	0.36
37*	0.90	0.36	2.84	0.36
42	1.28	0.36	2.20	0.36
47*	2.31	0.36	3.70	0.36
61*	1.61	0.36	3.06	0.36
68*	1.15	0.36	2.79	0.36
82	2.20	0.36	3.13	0.36
<b>Promedio</b>	<b>2.01</b>		<b>2.76</b>	

Los valores negativos indican los días de muestreo realizados antes del tratamiento

\*Días en que la concentración plasmática de testosterona entre grupos (ng/ml) fue significativa ( $p < 0.05$ ).



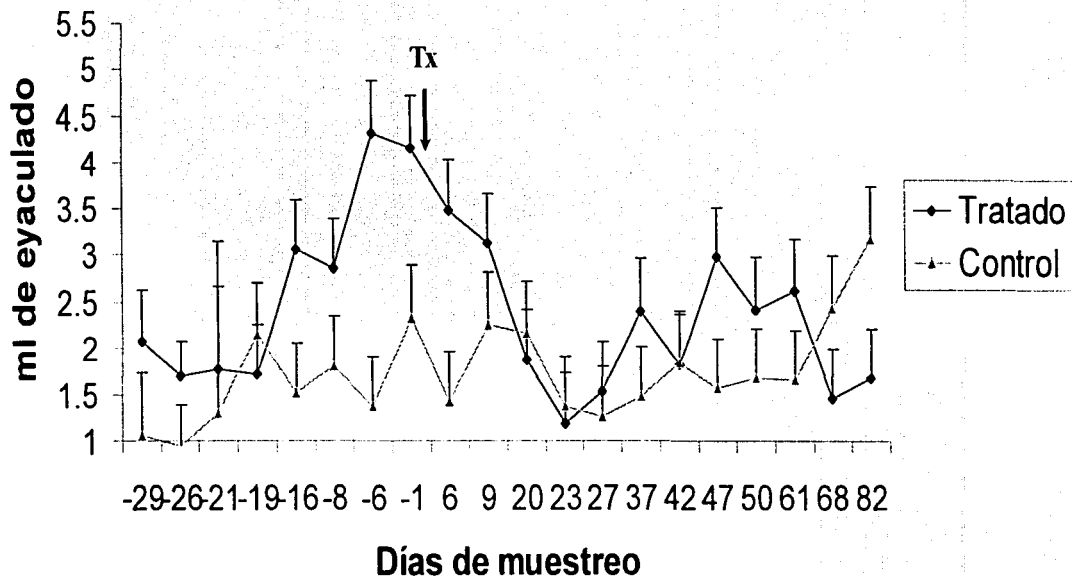
**Fig. 1.** Concentración plasmática de testosterona (ng/ml) en los perros tratados con MPA (20mg/kg) y no tratados antes y después del tratamiento. La flecha indica el momento del tratamiento (Tx). \*Periodos con significancia estadística ( $p < 0.05$ ).



**CUADRO 3.** Volumen de los eyaculados (ml) de los perros tratados con MPA (20 mg/kg) y de los controles

Días de muestreo	Grupo tratado		Grupo control	
	Promedio	EEM	Promedio	EEM
-29	2.08	0.55	1.06	0.68
-26	1.69	0.39	0.95	0.43
-21	1.77	1.37	1.29	1.37
-19	1.72	0.55	2.15	0.55
-16	3.05	0.55	1.52	0.55
-8	2.85	0.55	1.80	0.55
-6	4.33	0.55	1.37	0.55
-1	4.17	0.55	2.33	0.55
6	3.48	0.55	1.42	0.55
9	3.12	0.55	2.27	0.55
20	1.87	0.55	2.17	0.55
23	1.18	0.55	1.37	0.55
27	1.53	0.55	1.25	0.55
37	2.40	0.55	1.47	0.55
42	1.83	0.55	1.85	0.55
47	2.98	0.55	1.57	0.55
50	2.43	0.55	1.67	0.55
61	2.62	0.55	1.65	0.55
68	1.45	0.55	2.45	0.55
82	1.68	0.55	3.17	0.60
Promedio	2.43		1.74	

Los valores negativos indican los días de muestreo antes del tratamiento  
EEM: Error estándar de la media



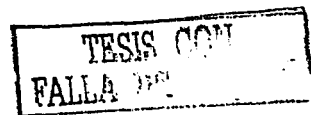
**Figura 2.** Volumen de eyaculado (ml) de los perros tratados con MPA (20 mg/ml) y de los controles antes y después del tratamiento. La flecha indica el inicio de la aplicación del tratamiento (Tx).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**CUADRO 4. Concentración espermática del eyaculado (millones de espermatozoides/ml) de los perros tratados con MPA (20 mg/kg) y de los controles**

Días de muestreo	Grupo tratado		Grupo control	
	Promedio	EEM	Promedio	EEM
-29	93.95	36.22	12.23	51.92
-26	77.91	36.22	38.64	39.88
-21	151.83	90.55	80.88	90.66
-19	95.5	36.22	44.08	36.22
-16	261.66	36.22	46.29	36.22
-8	297.91	36.22	132.25	36.22
-6	272.08	36.22	64.25	36.22
-1	292.5	36.22	120.00	36.22
6	277.08	36.22	66.25	36.22
9	282.79	36.22	135.34	39.88
20	147.95	36.22	195.75	36.22
23	88.58	36.22	123.83	36.22
27	116.87	36.22	86.37	36.22
37	141.79	36.22	101.58	36.22
42	82.66	36.22	144.66	36.22
47	219.95	36.22	115.00	36.22
50	156.08	36.22	78.00	36.22
61	171.25	36.22	85.66	36.22
68	125.33	36.22	70.08	36.22
82	108.25	36.22	80.50	36.22

Los números negativos indican los días de muestreo antes del tratamiento  
EEM: Error estándar de la media



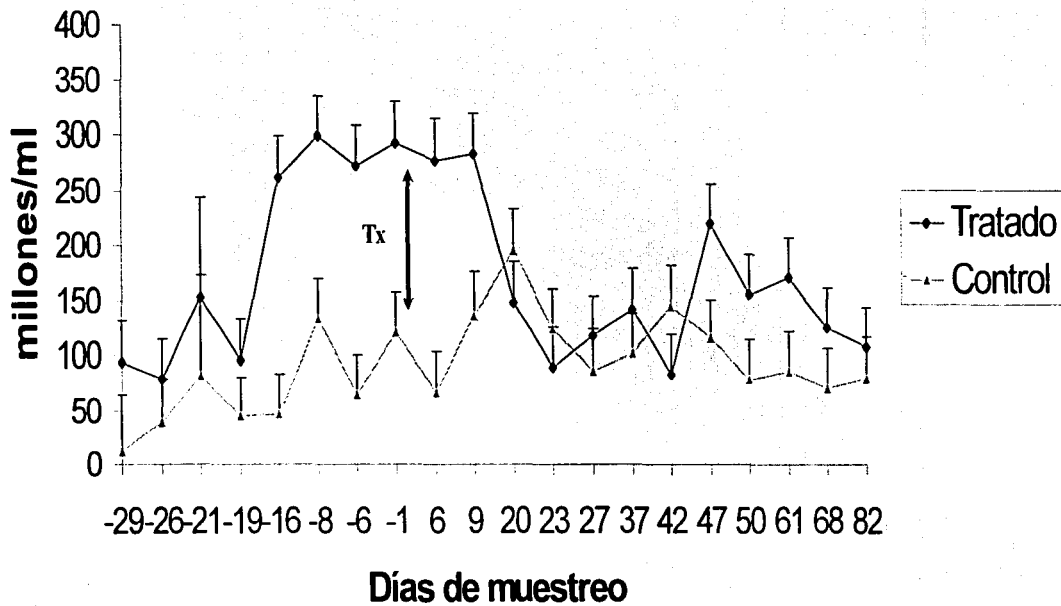


Fig 3. Concentración espermática (millones de espermatozoides/ml) de los perros tratados con MPA (20 mg/kg) y de los controles antes y después del tratamiento. La flecha indica el inicio del tratamiento (Tx).

TESIS CON  
 SELLO DE ORIGEN

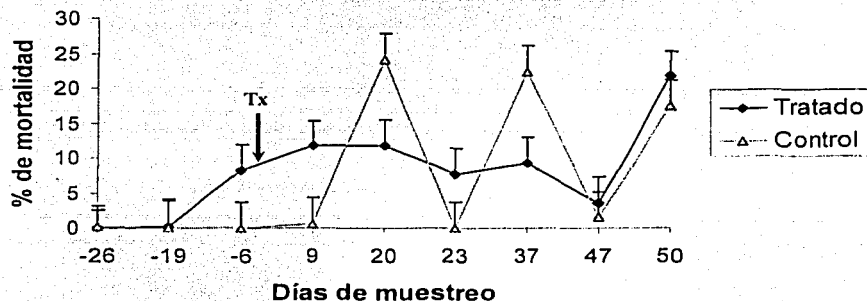
**CUADRO 5.** Porcentaje de la mortalidad espermática en los perros tratados con MPA (20 mg/kg) y en los controles

Días de muestreo	Grupo tratado		Grupo control	
	Promedio	EEM	Promedio	EEM
-26	0.00	2.60	0.24	2.88
-19	0.17	3.68	0.06	4.05
-6	8.33	3.68	0.00	3.68
9	11.67	3.68	0.67	3.68
20	11.83	3.68	24.17	3.68
23	7.67	3.68	0.00	3.68
37	9.17	3.68	22.33	3.68
47	3.50	3.68	1.50	3.68
50	21.67	3.68	17.50	3.68

EEM: Error estándar de la media

Valores obtenidos a partir de los frotis espermáticos teñidos con la triple tinción

Los números negativos indican los muestreos antes del tratamiento



**Fig. 4.** Porcentaje de la mortalidad espermática de los perros tratados con MPA (20mg/kg) y de los controles, antes y después del tratamiento. Valores obtenidos a partir de los frotis teñidos únicamente con triple tinción. La flecha indica el inicio del tratamiento (Tx).

**CUADRO 6.** Porcentaje de anomalías espermáticas de los perros tratados con MPA (20 mg/kg) y de los controles

Días de muestreo	Grupo tratado		Grupo control	
	Promedio	EEM	Promedio	EEM
-29 S	24.67	6.86	14.39	7.55
-26 T	27.17	4.85	29.49	5.37
-21 S	5.00	6.86	7.39	7.55
-19 T	22.00	6.86	61.19	7.55
-16 S	15.83	6.86	14.79	7.55
-8 S	6.00	6.86	7.33	6.86
-6 T	38.00	6.86	46.83	6.86
-1 S	5.67	6.86	10.17	6.86
6 S	4.83	6.86	21.50	6.86
9 T	20.67	6.86	22.17	6.86
20 T	12.83	6.86	47.50	6.86
23 T	9.83	6.86	9.33	6.86
27 S	31.83	6.86	39.67	6.86
37 T	22.67	6.86	42.00	6.86
42 S	8.00	6.86	12.50	6.86
47 T	31.50	6.86	32.33	6.86
50 T	26.33	6.86	46.50	6.86
61 S	8.33	6.86	5.83	6.86
68 S	10.67	6.86	8.17	6.86
82 S	44.67	6.86	8.83	6.86

EEM: Error estándar de la media

S: Spermac, T: Triple tinción

Los valores negativos indican los días de muestreo antes del tratamiento

**CUADRO 7.** Porcentaje promedio de anomalías espermáticas observadas en cada uno de los perros tratados con MPA (20 mg/kg) y de los controles durante toda la fase de muestreo

No. perro	Grupo tratado						
	Macro y microcefalia	Doble cabeza Doble cola	Gota citoplasmática	Cola enroscada	Cola suelta	Acrosoma irregular	Reacción acrosomal
1	17	10	28	371	12	9	26
2	6	0	52	334	9	91	13
3	3	0	30	267	8	21	16
4	4		37	460	9	29	4
5	57	0	16	295	4	30	29
6	9	0	28	402	2	34	15
Promedio	16	1.66	31.8	354.8	7.3	35.6	17.6

No. perro	Grupo control						
	Macro y microcefalia	Doble cabeza Doble cola	Gota citoplasmática	Cola enroscada	Cola suelta	Acrosoma irregular	Reacción acrosomal
7*	5	0	97	798	40	9	54
8	9	0	26	222	8	15	8
9*	8	3	51	336	18	17	20
10	3	0	14	424	10	6	18
11	5	0	16	398	0	32	30
12	7	0	33	206	0	8	6
Promedio	6.1	0.5	39.5	397.3	12.60	14.5	22.6

\*Perros que fueron mordidos por sus compañeros

TESIS CON  
 FALLA DE

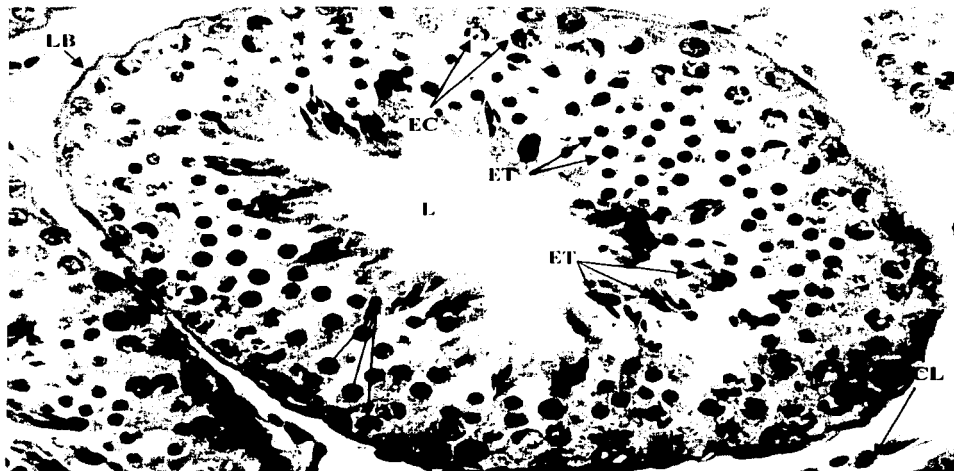


Fig. 6. Corte histológico de un túbulo seminífero del testículo de un perro tratado con MPA (20 mg/kg). Como se puede apreciar los diferentes elementos propios del túbulo se encuentran presentes. CL: célula de Leydig, EC: espermatoцитos, EG: espermatoгонias, ET: espermátides, L: luz, LB: lámina basal del túbulo seminífero. Tinción H-E. (x320).

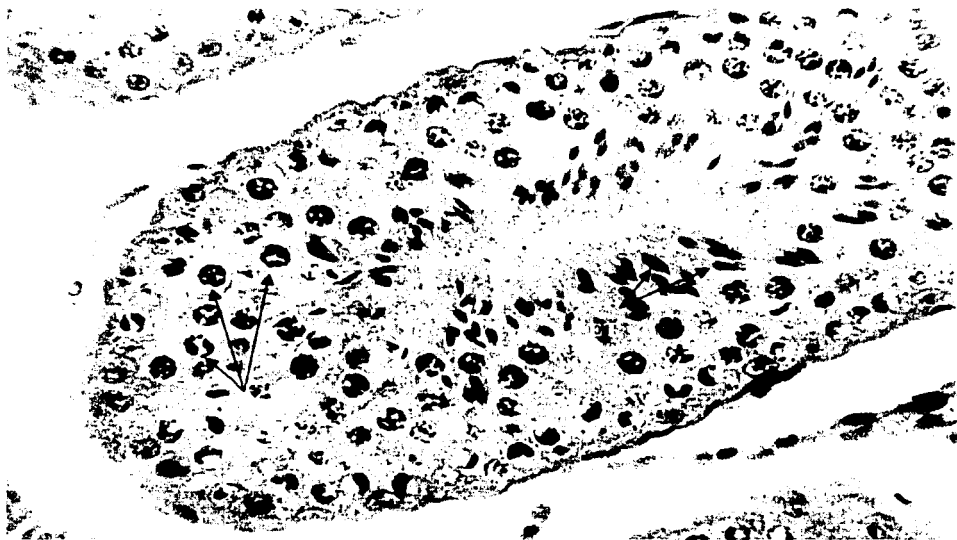


Fig. 7. Corte histológico de un túbulo seminífero del testículo de un perro del grupo control. Se puede apreciar que el epitelio germinativo no presenta alteraciones. EC: espermatoцитos, ET: espermátides. Tinción: H-E (x320).



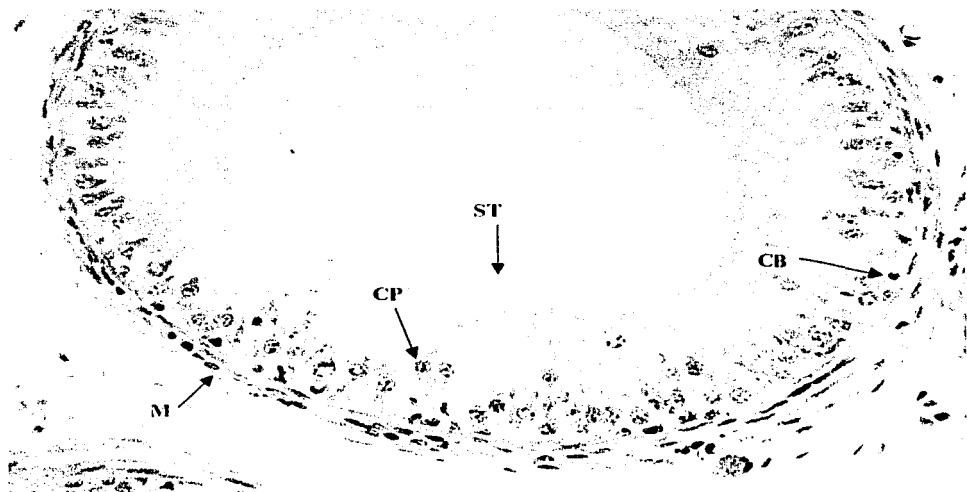


Fig. 8. Corte histológico de la región de la cabeza del epidídimo de un perro tratado con MPA (20mg/kg). Se puede apreciar que histológicamente no presenta alteraciones. CB: células basales, CP: células principales, M: fibras musculares circulares. ST: estereocilios. Tinción: H-E. (x250).

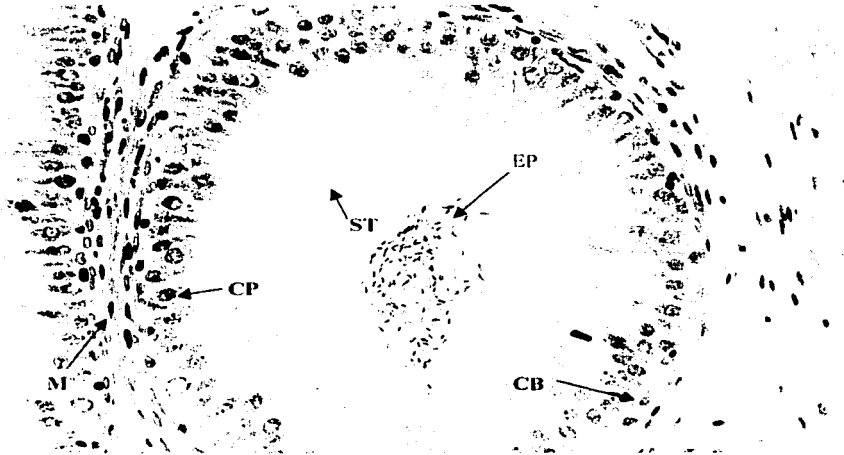


Fig. 9. Corte histológico de la región de cabeza del epidídimo de un perro perteneciente al grupo control. Se puede apreciar que histológicamente no presenta alteraciones. CB: células basales, CP: células principales, EP: espermatozoides, M: fibras musculares circulares, ST: estereocilios. Tinción: H-E. (x250).



Fig. 10 Corte histológico de la región del cuerpo del epididimo de un perro del grupo tratado con MPA (20 mg/kg). Donde se puede apreciar que histológicamente no muestra alteraciones. CB: células basales, CP: células principales, EP: espermatozoides, M: fibras musculares circulares, ST: estereocilios. Tinción: H-E. (x250).



Fig. 11. Corte histológico de la región del cuerpo del epididimo de un perro del grupo control. Se puede apreciar que no presenta alteraciones histológicas. CB: células basales, CP: células principales, EP: espermatozoides, M: fibras musculares circulares, ST: estereocilios. Tinción: H-E. (x250).

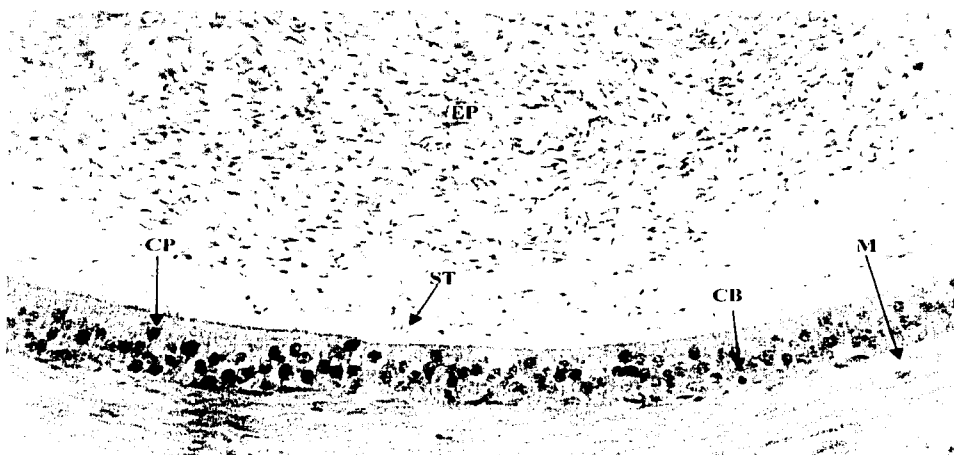


Fig. 12. Corte histológico de la región de la cauda del epididimo de un perro tratado con MPA (20 mg/kg). Se puede observar que histológicamente no presenta alteraciones. CB: células basales, CP: células principales, EP: espermatozoides, M: fibras musculares circulares, ST: estereocilios. Tinción: H-E. (x250).



Fig. 13. Corte histológico de la región de la cauda del epididimo de un perro del grupo control en la que se puede observar que no presenta alteraciones en sus estructuras. CB: células basales, CP: células principales, EP: espermatozoides, M: fibras musculares circulares, ST: estereocilios. Tinción: H-E. (x250).

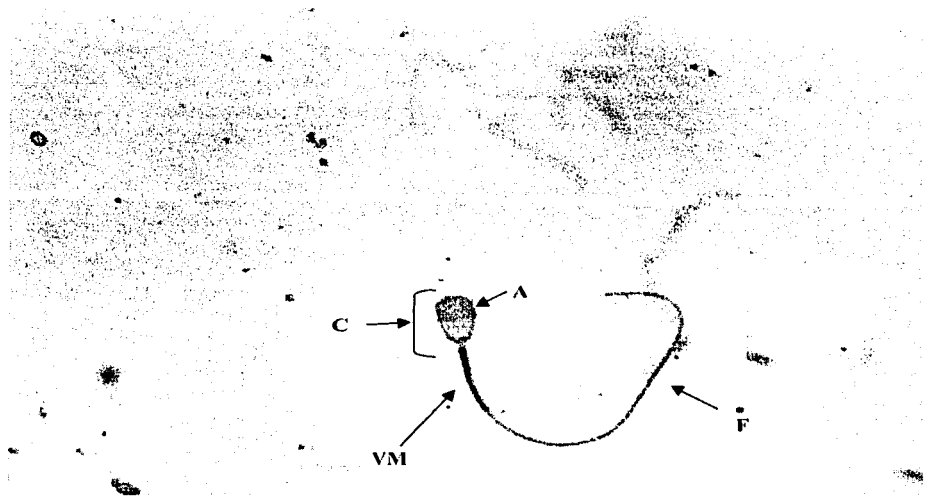


Fig.14. Fotografía que muestra la morfología espermática. Se puede observar un espermatozoide con el flagelo doblado. A: acrosoma, C: cabeza, F: flagelo. VM: vaina mitocondrial. Tinción: Spermac. (x1000).

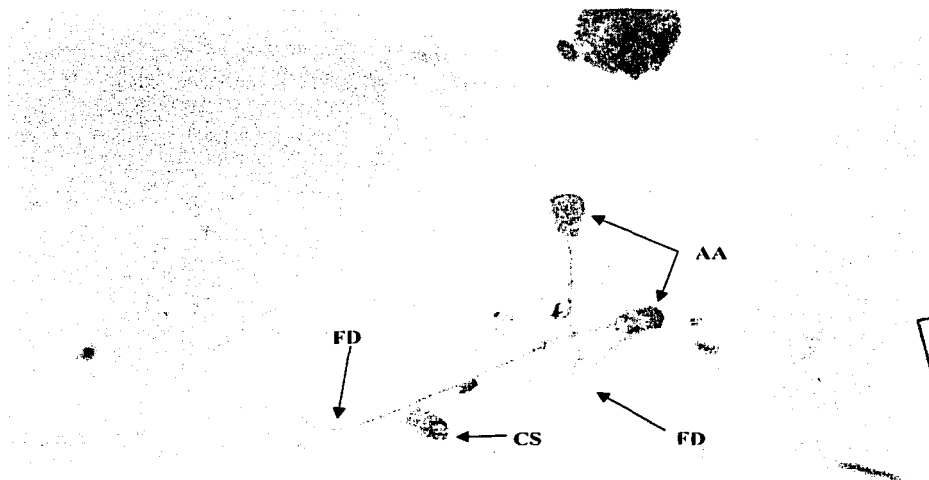


Fig. 15. Fotografía que muestra algunas de las alteraciones espermáticas. AA: acrosoma "abombado", CS: cabeza suelta, FD: flagelo doblado. Tinción de Spermac. (x1000).

TESIS COM  
 FALLA LA COPIA



Fig. 16. Fotografía que muestra algunas anomalías espermáticas observadas en un perro tratado con MPA (20mg/kg). AA: acrosoma "abombado", FE: flagelo enroscado, GC: gota citoplasmática. Triple tinción. (x1000).

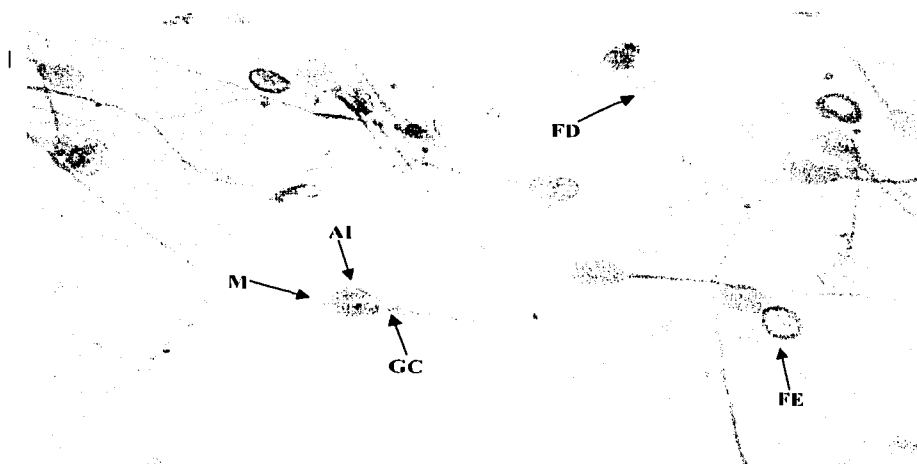


Fig. 17. Fotografía que muestra algunas de las anomalías espermáticas presentadas en un perro tratado con MPA (20mg/kg). AI: acrosoma irregular, FD: flagelo doblado, FE: flagelo enroscado, GC: gota citoplasmática, M: macrocefalia. Triple tinción. (x1000).