UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFECTO DEL COUMESTROL COMO UN PRODUCTO ALTERNO PARA EL CONTROL DE LA POBLACIÓN CANINA

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JUAN JOSÉ PÉREZ RIVERO CRUZ Y CELIS

TUTOR
JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA

COMITÉ TUTORAL

JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN

HÉCTOR SERRANO

México D.F. 2008

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Dedicatorias

Dedico este trabajo de tesis a mi esposa **Maritza** mi amiga y compañera quien me alienta con su ejemplo a seguir luchando sin cansancio para ser cada día mejor, a mis hijos **Juan José** quien me ha apoyado de manera incondicional en el desarrollo de este trabajo y del cual estoy orgulloso**, Alejandro** del cual soy su guía y modelo a seguir, lo cual me honra y me llena de alegría **y Pablo** ese pequeñín inquieto y amoroso que me mueve el día con sus detalles y actitudes el cual me tiene fascinado. Ustedes son quienes me han apoyado, han aguantado ausencias y desencantos, me han alentado para concluir mi formación Doctoral, ustedes son mí ¿Por qué? , para ser cada día mejor esposo, padre, amigo, compañero y profesional, gracias por su apoyo, los amo.

A mi madre Teresa Cruz y Celis Ovando (†) Aunque ya no estas con nosotros físicamente, sí lo estas de manera espiritual, tú me enseñaste a ser responsable y honesto, lo cual me ha permitido estar en este momento tan importante en mi vida, jamás te olvidare, te amo, Mil gracias por todo.

A mi hermano **Miguel Javier** Que quieres que te diga!!! Estamos siempre juntos en las buenas y en las malas, nos apoyamos todo lo que podemos, se que estas feliz en este momento tanto como yo lo estoy. Gracias.

A **Luís** por su valiosa amistad, apoyo incondicional y su interés en el desarrollo de este trabajo, pocos amigos como tú. Gracias.

A **Héctor y Loli** por su amistad y ayuda en todo momento, no tengo palabras para agradecerles, seguro que nuestra amistas durara muchos años.

A **Charo, Beto, Betito, Pepis, y a mi Padrino** por estar presentes en las buenas y las malas y por su amistad. Gracias

A mis suegros, la tía Pi, mis cuñados, concuñas y Ricardo, con mucho cariño por el hecho de estar siempre presentes y apoyando en todo momento. Gracias

Agradecimientos

Al **Dr. José Juan Martínez Maya**, por su confianza, amistad, conocimientos y apoyo, ha sido una pieza fundamental para mi formación como Doctor, mil gracias por todo.

Al **Dr. Álvaro Aguilar Setién**, por brindarme su tiempo, conocimientos, apoyo y amistad, mil gracias.

Al **Dr. Héctor Serrano** por su amistad, apoyo y enseñanzas, las cuales me guiaron hacia la superación constante, tú presencia realzo mi formación Doctoral. Mil gracias.

Al **Dr. Mario Pérez Martínez** por su amistad, ayuda incondicional y conocimientos, los cuales han permitido que mi formación sea sólida y que este trabajo se culmine de manera exitosa. Mil gracias por todo.

Al **Dr. Alejandro Villa Godoy** quien a través de los años de honrarme con su amistad me ha dado el ejemplo de trabajo arduo y honesto. Gracias Maestro.

Al **Dr. Arturo Salame Méndez** por su amistad, ayuda y valiosas sugerencias. Gracias por todo.

A mi **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por permitirme acceder a este postgrado de excelencia. Mil Gracias

Al mis profesores, compañeros y amigos del **Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM** por su apoyo. Gracias

A **Josefina González Polo (Nina) y a la Reserva para la Protección de la Flora y Fauna Silvestre y del Medio Ambiente A.C.** por su Confianza y Amistad, su apoyo incondicional fue fundamental para el desarrollo de este trabajo encaminado al bienestar animal. Gracias

A **Cecilia Vega** por su amistad y apoyo incondicional en la difusión internacional de este trabajo.

A **CONACYT** por haber tenido confianza en mi, otorgadome la beca para poder completar mi formación como Doctor en Ciencias. Gracias por su apoyo.

INDICE

Resumen……I
Abstract…….II

1.0 Introducción……1
- **1.1** Problemas asociados a los perros no controlados
- **1.2** Transmisión de enfermedades zoonóticas
  - **1.2.1** Rabia
  - **1.2.2** Otras zoonosis
- **1.3** Medidas de control de la población canina
  - **1.3.1** Técnicas letales de control de poblaciones
    - **1.3.1.1** Técnicas letales, su ineficiencia y alternativas no letales de control

2.0 El control reproductivo en perros.....6
- **2.1** Esterilización quirúrgica
- **2.2** Esterilización no quirúrgica
  - **2.2.1** Hormonas, agonistas y antagonistas
    - **2.2.1.1** Derivados de la Progesterona
    - **2.2.1.2** Andrógenos
    - **2.2.1.3** Agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)
    - **2.2.1.4** Antagonistas de la GnRH.
  - **2.2.2** Inmunoesterilización
    - **2.2.2.1** Inmunización contra GnRH
    - **2.2.2.2** Inmunización contra Zona Pellucida
  - **2.2.3** Sustancias de aplicación local
  - **2.2.4** Sustancias de administración oral
  - **2.2.5** Fitoestrógenos

3.0 Los Receptores estrogénicos……..12

4.0 Hipótesis……..….13

5.0 Objetivo general…….….13

5.1 Objetivos específicos

6.0 Justificación……14

7.0 Material y Métodos……15
- **7.1** Animales
- **7.2** Preparación y administración del coumestrol
- **7.3** Obtención de eyaculado de semen
  - **7.3.1** Evaluación del eyaculado de semen
- **7.4** Evaluación del comportamiento
- **7.5** Histología y Morfometria
- **7.6** Inmuno histoquímica para detectar receptores estrogénicos
- **7.7** Detección por fluorescencia de coumestrol unido al receptor
- **7.8** Detección de los niveles séricos de testosterona
- **7.9** Análisis de la información

8.0 Resultados……22

9.0 Discusión……..25

10.0 Literatura Citada……34

11.0 Cuadros y Figuras……..…..42

12.0 Anexos……70

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Principales causas por la que los perros son abandonados. **p. 45**

Cuadro 2. Agresiones por perro en diferentes países. **p. 46**

Cuadro 3. Principales técnicas quirúrgicas empleadas en la esterilización masiva de perros y sus complicaciones. **p. 47**

Cuadro 4.- Color del eyaculado se semen. **p. 48**

Cuadro 5.- Alteraciones en la morfología espermática. **p. 49**

Cuadro 6.-Morfometria testicular. **p.50**

Cuadro 7.- Área del epitelio germinal de los túbulos seminíferos y epidídimo. **p. 51**

Cuadro 8.-Detección de receptores estrogénicos en testículo de perro. **p. 52**

Lista de Figuras

Figura 1.- Color del eyaculado de semen de los perros tratados con coumestrol. **p. 53**

Figura 2.- Motilidad espermática de los perros tratados con coumestrol. **p.54**

Figura 3.-Volumen del eyaculado de semen de los perros tratados con coumestrol. **p.55**

Figura 4.- Espermatozoides eyaculados y su concentración de los perros tratados con coumestrol. **p.56**

Figura 5.- Diferentes alteraciones en la morfología espermática en perros tratados con coumestrol. **p.57**

Figura 6.- Concentración espermática total, sin y con alteraciones morfológicas en perros tratados con coumestrol. **p.58**

Figura 7.- Frecuencia de exploración olfatoria de perros tratados con coumestrol. **p.59**

Figura 8.- Latencia de respuesta olfatoria de perros tratados con coumestrol a secreciones vaginales de perras en estro. **p.60**

Figura 9.- Morfometria testicular de los perros testigo y tratados con coumestrol. **p. 61**

Figura 10.- Morfología de túbulos seminíferos de los animales testigo y tratados con coumestrol. **p.62**

Figura 11.-Morfología del epidídimo de animales control y tratados con coumestrol. **P.63**

Figura12.- Morfometria de túbulos seminíferos del grupo control y tratado con coumestrol. **p.64**

Figura 12.- Morfometria de túbulos seminíferos del grupo control y tratado con coumestrol. **p.65**

Figura 14.- Epitelio de los túbulos aferentes de un perro del grupo testigo y uno del grupo tratado. **p.66**

Figura 15.- Detección de receptores estrogénicos en testículo de perro mediante inmuno histoquímica. **p.67**

Figura 16.- Detección de receptores estrogénicos mediante inmunohistoquímica en epidídimo y conductos aferentes. **p.68**

Figura 17.- Intensidad de señal fluorescente en testículos de perros tratados y no con coumestrol. **p.69**

Figura 18.- Detección de receptores estrogénicos unidos a coumestrol en túbulos seminíferos y epidídimo de perro mediante auto fluorescencia. **p.70**

Figura 19.- Detección de receptores estrogénicos unidos a coumestrol mediante auto fluorescencia en conducto aferente de perros tratados con coumestrol. **p.71**

Figura 20.- Valores de testosterona sérica de los animales del grupo tratado con coumestrol. **p.72**

Resumen

El problema de la sobrepoblación canina es grave, es necesario mantener bajo control y vigilancia a los cánidos no domiciliados para evitar que deambulen libremente, ya que pueden ser fuente de agresiones e infecciones hacia el humano, las cuales son de consecuencias graves. Existen diversos métodos para controlar la sobrepoblación canina, el principal es el letal, su uso en muchas sociedades es controversial. Las alternativas de control de poblaciones se han enfocado al control de su reproducción ya sea por técnicas quirúrgicas o no quirúrgicas todas tienen en común el requisito de captura y manejo de los animales y en ocasiones de tratamientos repetidos. En este trabajo se exploro una metodología base de coumestrol (300µg/kg) administrado en el alimento por vía oral una vez por semana durante cuatro semanas para producir esterilidad en los perros machos, se utilizaron 11 animales sanos los cuales fueron evaluados cada semana en su concentración y morfología espermática, niveles de testosterona serica y comportamiento sexual al ser expuesto a secreciones vaginales de hembras en estro, a la quinta semana se evaluaron la morfometria testicular y la unión del coumestrol a receptores estrogénicos. Los resultados muestran cambios en la concentración espermática ($p<0.001$), alteraciones en la morfología espermática ($P<0.001$), disminución de la frecuencia de olfateo de las secreciones vaginales ($P<0.01$), disminución de la frecuencia de marcado de territorio con orina ($P<0.005$).Se detectaron receptores estrogénicos en testículo y la unión del coumestrol a estos por fluorescencia, el epitelio germinal se redujo en espesor y el diámetro de los conductos aferentes se incremento en los animales del grupo tratado con coumestrol ($P<0.01$) , los valores de testosterona no mostraron cambios significativos. Se concluye que el tratamiento con coumestrol en perros induce cambios en el semen, testículo y el comportamiento sexual debido al efecto antagónico del coumestrol sobre los receptores estrogénicos.

PALABRAS CLAVE Coumestrol, sobrepoblación canina, receptores estrogénicos, testículo, fluorescencia

Abstract

Dog overpopulation is serious problem, is necessary to maintain under control and monitoring to no domiciliate dogs to avoid that they free roaming dogs, since they can be source of aggressions and infections towards the human, which are of serious consequences. Diverse methods exist to control canine overpopulation, the main one is the lethal, and their use in many societies is controversial. Alternatives of population control have focused to the control of their reproduction by surgical or no surgical techniques all have common the requirement of dog capture and handling and repeated treatments. In this work I explore a coumestrol (300µg/kg) based methodology of administered by oral route once per week during four weeks to produce sterility in the male dogs. 11 healthy animal were used which were evaluated every week in their concentration and sperm morphology, levels of serum testosterone and sexual behavior to exposed being to vaginal secretions of estrum females, to the fifth week they evaluated testicular morphometry and coumestrol union to estrogen receptors. The results show changes in sperm concentration ($P<0.001$), diminution of the frequency of sniffing of vaginal secretions ($P<0.01$) and the marked frequency of territory with urine ($P<0.005$). Estrogen receptors were detected in testis and complex coumestrol-estrogen receptor by fluorescence. Germinal epithelium was reduced in thickness and the diameter of the afferent tubule was increase in the animals of the group treated with coumestrol ($P<0.01$), the testosterone values did not show significant changes.

Treatment with coumestrol in dogs induces changes in the sperm quality, testis morphology and sexual behavior due to the antagonistic effect of coumestrol on the estrogen receptors.

KEY WORDS Coumestrol, dog overpopulation, estrogen receptor, testis, fluorescence.

1.0 Introducción

El perro ha sido un compañero útil al hombre desde la edad mas remota y de hecho a la fecha se han creado y mejorado las diversas razas, las cuales han sido adaptadas a las necesidades y gustos del hombre (Blank 1974).

Es necesario mantener bajo control y vigilancia a los cánidos no domiciliados, entre otras cosas para evitar que deambulen por la vía pública o por el campo, debido a que pueden ser fuente de agresiones o infecciones hacia el humano o producirle lesiones, las cuales en ocasiones son de consecuencias graves, así como afectación de la economía.

A los perros que se mantienen en dichas condiciones los podemos clasificar en tres diferentes tipos (Slater 2001).

1.- Perros que tienen en apariencia dueño y este les permite deambular libremente por la calle, o perros que tuvieron alguna vez dueño y se perdieron o simplemente fueron abandonados por ya no ser deseados como se muestra en el Cuadro 1 (Slater 2001; Scarlet et al. 1999). En todos los casos son perros que deambulan sin control por las ciudades, reproduciéndose y pudiendo ocasionar accidentes viales, son animales que pueden o no estar vacunados contra la rabia (Slater 2001).

2.- Perros sin dueño específico que no son domiciliados: estos son representados por los perros de la "cuadra", calle o barrio, todos estos animales tienen diferentes grados de interacción con el humano, pueden o no permitir el manejo y presentan diferentes grados de agresividad, estos perros se reproducen sin control, por lo general no están vacunados contra rabia (Slater 2001).

3.- Perros ferales que habitan en zonas suburbanas: los cuales generalmente provienen de padres ferales, no son sociables con el hombre, se agrupan en manadas siendo generalmente agresivos con perros de otras manadas y con el hombre, de manera similar con los anteriores su reproducción es libre y sin control, no están vacunados contra rabia (Slater 2001).

Aunque se dice que estos se reproducen y alimentan sin la intervención del hombre, también es cierto que estos animales se pueden alimentar de basura, o de animales silvestres y domésticos que cazan, de fruta y ocasionalmente de carroña (Green and Gipson 1994; Butler et al. 2000).

1.1 Problemas asociados a los perros no controlados

La agresión de perros hacia los humanos es un problema de gran relevancia sobre todo por su impacto desde el punto de vista de salud pública (Manteca 2003).

Se ha visto que las principales causas que generan la agresión son: el miedo a personas desconocidas, socialización inadecuada, dolor, aprendizaje, entrenamiento, protección territorial e instintos maternos (Pal 2005; Landsberg 1991).

No es poco frecuente que los dueños de perros lleguen a ser atacados por sus mascotas ya sea durante el juego o tratando de separarlos durante una pelea (CHIRP 1996). Los perros que presentan conductas agresivas hacia los miembros de una familia así como a personas conocidas son la principal razón por lo que un perro es desechado por su dueño o ser remitido a consulta con el etólogo veterinario (Guy et al. 2001).

Aun cuando la frecuencia de agresiones es muy alta, la poca notificación de casos de personas mordidas en Estados Unidos y México es elevado, esto debido a que únicamente los lesionados que requieren atención hospitalaria reportan la agresión a las autoridades, siendo estos el menor numero de los agredidos, los demás prefieren atenderse en casa, con el medico familiar y los que fueron atacados por su propio perro no desean informarlo. Los niños son las victimas mas frecuentes de agresiones, como se muestra en la Cuadro 2 (Patronek and Rowan 1995; Sacks et al. 1996).

Además del daño físico, debe considerarse el impacto psíquico y emocional (De Keuster et al. 2005; Acha and Cifres 2003) derivado de la propia agresión así como el sufrimiento y la ansiedad de las personas mordidas ante el temor de contraer la rabia u otras enfermedades, es otro aspecto a tomar en consideración, así como el daño económico por las horas hombre perdidas en los tratamientos médicos y profilácticos antirrábicos (Acha and Cifres 2003).

1.2 Transmisión de enfermedades zoonóticas

La estrecha relación hombre-perro ha permitido que varios de los agentes productores de enfermedad se transmitan entre ellos.

1.2.1 Rabia

Se han determinado dos ciclos epidemiológicos, el aéreo en donde el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* es el principal transmisor silvestre de la rabia en el ganado y ocasionalmente al humano, y el terrestre en donde el perro es el principal transmisor hacia el humano (Loza-Rubio et al. 1999).

En los Estados Unidos de Norte América se reporta a nivel nacional un incremento del 19% entre los casos de rabia canina presentados del 2002 al 2003 (Krebs et al. 2003).

En México los casos de rabia humana transmitida por perro habían disminuido de manera constante hasta 2005, sin embargo se incremento en el número de casos de rabia canina de 36 notificados en 2004 a 103 en 2005, teniendo como resultado de este incremento 2 casos de rabia humana en 2006 (Pan American Health Organization 2006).

Es necesario recordar que la importancia de la rabia no radica en el numero reducido de casos, si no en la letalidad del 100% que tiene (Acha and Cifres 2003).

El estimar los costos en el control la rabia animal es difícil y poco confiable, esto se debe a que en el control de esta enfermedad fatal intervienen diferentes instancias de gobierno y privadas (Meltzer and Rupprecht 1998).

Los programas preventivos post exposición, así como los de la atención medica hacia las personas agredidas son un gasto importante que hay que tener en cuenta, así como las medidas de prevención que inician con la educación de los habitantes, la vacunación de los perros y su esterilización (Meltzer and Rupprecht 1998).

Para reducir la incidencia de esta zoonosis, teóricamente se debe de vacunar entre el 60 y el 70% de los perros para que la diseminación de la rabia se detenga entre estos animales. Aun así la presencia de un alto porcentaje de perros callejeros en donde no es posible la vacunación incrementa el riesgo de transmisión (Coleman and Dye 1996).

1.2.2 Otras zoonosis

Los perros también son el principal reservorio de la enfermedad zoonotica viceral denominada Leishmaniasis (*Leishmania donovani*), la cual es un importante problema de salud publica en América tropical (Moreira et al.2004).

El *Toxocara canis* un ascarido presente en el intestino delgado de los perros es el principal causante en el humano del síndrome denominado Larva Migrans Visceral y Toxocarosis ocular (Castillo et al. 2001; Rubel and Wisnivesky 2005). En la Ciudad de México se ha detectado contaminación por huevecillos de *Toxacara canis* en el 14.6% como media de los suelos estudiados en las delegaciones políticas Iztapalapa, Coyoacán, Tlalpan, Xochimilco, Tláhuac y Milpa Alta (Rubel and Wisnivesky 2005; Martinez-Barbabosa et al 1998).

El perro es considerado la segunda fuente de infección hacia el humano de la leptospirosis principalmente por *Leptospira interrogans* serotipo *canicola* e *icterohemorrágica* (Brod et al 2005; Aslantaş et al. 2005).

Además de estas se menciona que puede participar en la transmisión de hidatidosis (*Echinococus granulosus, E.multilocularis, E.oligarthus, E. Vogeli*), sarna zoonotica (*Sarcoptes scabei* var *canis*), brucelosis (*Brucella canis*), dermatofitosis (*Microsporum canis*) entre otras mas (Acha and Cifres 2003).

1.3 Medidas de control de la población canina

La elaboración de estrategias de control de los perros no domiciliados y los ferales requiere del conocimiento de su distribución, sus patrones de comportamiento y de metodologías combinadas para lograr el control con éxito.

La población de perros en Norte América y Europa esta calculada aproximadamente entre el 9 y 14% de la población humana en la zona, en Asia, África y Latino América es del 12.5% (Meltzer and Rupprecht 1998).

El control de poblaciones caninas va encaminado a reducir su número y con ello la posibilidad de agresión al humano, así como minimizar la posibilidad de contagio de enfermedades zoonoticas, y la afectación de la economía por tratamientos preventivos contra la rabia y por el ataque y muerte por parte de los perros ferales al ganado.

A pesar de que el 63% de los cachorros nacidos en un área mueren por diferentes causas como accidentes viales y enfermedades infecciosas, el problema de la sobrepoblación canina es grave (Pal 2005).

Existen diferentes tipos de control canino, que van desde las técnicas letales, la esterilización quirúrgica, la hormonal la inmunológica y la química.

1.3.1 Técnicas letales de control de poblaciones

En México por Norma Oficial Mexicana diversos métodos son utilizados para el control letal de poblaciones de perros, como lo son la electro insensibilización y la sobredosis de barbitúricos por vía endovenosa en perros mayores de 4 meses y en cachorros menores de esta edad previa tranquilización profunda se utiliza la sobre dosis de barbitúricos por vía intracardiaca (NOM-033-ZOO-1995) su uso en muchas sociedades es muy controversial y no es aceptada por motivos humanitarios, culturales, éticos y religiosos (Meltzer and Rupprecht 1998).

1.3.1.1 Técnicas letales, su ineficiencia y alternativas no letales de control.

Según el comité de expertos en rabia de la organización Mundial de la Salud (OMS) no se encontró evidencia que la eliminación de perros de una zona determinada, afectara la

densidad poblacional del área, y tampoco impactara la propagación de la rabia (Meltzer and Rupprecht 1998; Aslantaş et al. 2005).

De la misma manera, los programas de control de la Leishmaniasis en Brasil que incluyen la eliminación en masa de los perros seropositivos no han sido suficientes para reducir el número de casos en humanos. Adicionalmente la eliminación de los animales ha sido ineficaz debido a que los perros eliminados son rápidamente remplazados por cachorros susceptibles que nacen y por perros infectados que ocupan el nicho que quedo vacío por la eliminación de los perros (Moreira el al 2004;Leney 2002; Courtenay 2002). En comparación el tratamiento no letal empleando piretrinas tópicas para controlar al vector ha dado mejores resultados en el control de la leishmaniasis (Reithinger et al. 2001). Otro ejemplo es la eliminación del 76% de los perros ferales en la zona rural de Australia, la cual también ha fallado ya que el número de estos perros retorno a las cantidades previas al programa de eliminación durante el primer año (Reece 2005).

Debido a la problemática que representan los perros ferales se han utilizado diferentes métodos para su control, como lo son los implementos acústicos y visuales, también se han empleado con éxito en el control zonal de estos perros, los burros (*Equus asinus)* y llamas *(Llama glama)* los cuales son útiles para cuidar al ganado del ataque de perros ferales. El uso de sustancias químicas como el methyl nonyl cetona utilizado como repelente para los perros domésticos se ha utilizado para repeler a perros ferales , así como el uso de tóxicos como el M-44 (Cianuro de sodio) y 1080 (monofluoracetato de sodio) en collares para uso en ganado, los cuales se rompen , intoxican y matan al animal agresor al momento de que este ataque al animal domestico (Green and Gipson 1994), sin embargo la alta toxicidad para especies no blanco impide que sea una solución ecológicamente aceptable para el control de fauna nociva (Glen and Dickman 2003) y en muchos lugares esta prohibido o reglamentado su uso.

El empleo de trampas es de utilidad para capturar cachorros y ocasionalmente adultos, uno de los métodos mas efectivos utilizados en Alaska es el de capturar a un par de animales previamente identificados con el daño a fauna doméstica, a los que se les coloca un radiotransmisor, para después liberarlos y así poder localizar a la manada para posteriormente controlar la población (Green and Gipson 1994).

Preservar la salud humana evitando que las enfermedades zoonóticas sean contagiadas y evitar las agresiones como las mordidas que los perros infieren hacia los humanos, son una prioridad para los médicos veterinarios, los cuales deben de participar de manera activa en el control de las poblaciones de perros, de una manera humanitaria.

Antecedentes

2.0 El control reproductivo en perros

El control de la sobrepoblación de perros sin duda es un reto en cada área donde este problema es identificado, siendo la solución de este diferente en cada locación debido principalmente del medio ambiente, idiosincrasia de la población y recursos para llevarla a cabo, diversos métodos de control poblacional de tipo reproductivo se están investigando y puestos en marcha en diferentes partes del mundo (Miller et al. 2003; Wang 2002).

2.1 Esterilización quirúrgica

La esterilización temprana mediante cirugía en perros y gatos se realiza en cachorros antes de la pubertad la cual se presenta de manera variable en las perras entre los 6 y 24 meses de edad y en los perros entre los 6 y 12 meses, siendo realizada en las hembras entre los 3 y 6 meses y en los machos antes de los 4 meses de vida, debiendo de tener consideraciones especiales en el manejo de los tejidos, los cuales son mas delicados comparados con los tejidos de los perros adultos (Howe 2006 ; Preston and Bloomberg 1995). Este es un procedimiento definitivo que requiere de instalaciones, equipo y personal capacitado para realizarlo (Preston and Bloomberg 1995).

De la misma manera la esterilización de los adultos requiere técnicas quirúrgicas y asépticas apropiadas para garantizar buenos resultados de manera permanente (Preston and Bloomberg 1995).

Las técnicas quirúrgicas disponibles para la esterilización masiva de perros, requieren del manejo de los animales y cuidados especiales trans y post operatorios, estas técnicas se resumen en la Cuadro 3.

2.2 Esterilización no quirúrgica

2.2.1 Hormonas, agonistas y antagonistas

Se ha reportado que la administración exógena de hormonas esteroidales, suprime de manera indirecta la fertilidad, mediante la inhibición de la secreción de gonadotropinas (Kutzler 2006).

2.2.1.1 Derivados de la Progesterona

El acetato de megestrol, se ha utilizado en las hembras como supresor del estro en dosis de 2.2mg/kg de peso durante 8 días, se han reportado efectos secundarios con la administración prolongada de este producto, como lo son incremento de apetito y de peso, letárgica, neoplasias en las glándulas mamarias (Burke and Reynolds 1975).

En machos con dosis de 2 mg/kg de peso durante 7 días no produce cambios en la calidad del semen, sin embargo dosis de 4 mg/kg solo induce cambios en la morfología de origen epididimario en los espermatozoides (Kutzler 2006).

La medroxiprogesterona (MPA) se utiliza como supresor del celo en las hembras, siendo su uso limitado por los efectos secundarios que produce como supresión adreno cortical y lesiones uterinas (Kutzler 2006).

En machos la MPA a dosis de 20mg/kg reduce la motilidad y altera la morfología espermática en 3 días post inyección (England 1975).

2.2.1.2 Andrógenos

El propionato de testosterona administrado por vía intramuscular en dosis de 110 mg ha demostrado su efectividad en la prevención del estro en las perras, de igual manera la administración oral de 25-50mg de metil testosterona dos veces a la semana inhibe el estro en las perras (Johnston et al. 2001).

En las perras el mibolerone, un andrógeno sintético comercializado para la supresión del estro al ser administrado a una dosis promedio de 70µg/kg al día por via oral 30 días antes de iniciar del pro estro puede alcanzar efectos hasta por 2 años si la administración es continua, al descontinuarse el tratamiento el estro retorna en un tiempo de 70 días como promedio (Kutzler 2006).

En los machos la administración subcutánea de 5mg/kg de testosterona produce una disminución de la motilidad espermática 3 semana después del tratamiento, la cual persiste durante 3 meses, la administración continua de 50mg de metiltestosterona por vía oral durante 90 días reduce la producción diaria de espermatozoides (Freshman et al. 1990), de la misma manera la administración crónica de danazol un derivado sintético del 17α-etinil testosterona, induce azoospermia, la cual es reversible 60 días después del tratamiento (Kutzler 2006).

2.2.1.3 Agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

Como es bien conocido la GnRH regula la liberación por parte de la hipófisis de hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH).

En los machos la LH regula la síntesis de testosterona necesaria para la espermatogénesis y para el desarrollo de la conducta sexual y caracteres sexuales secundarios, mientras que la FSH es necesaria para la iniciación y mantenimiento de la espermatogenesis. En hembras tanto la FSH, como la LH son necesarias para el desarrollo folicular y la ovulación (Kutzler 2006).

De manera similar al efecto de la GnRH nativa, los agonistas sintéticos como la etilamina (Dubé et al 1987), nafarelin, leuprolide, deslorelin, buserelin y goserelin, estimulan la producción y liberación de gonadotropinas, sin embargo estos productos a dosis sostenidas inhiben el eje hipófisis-gonadal después de un periodo inicial de estimulación, la inhibición se produce por la regulación a la baja de los receptores para GnRH en la hipófisis anterior (Gobello 2006).

La aplicación por vía subcutánea de un implante de liberación lenta de deslorelin suprime el estro hasta por 27 semanas en perras. En machos la aplicación de un implante de liberación prolongada de 6mg de deslorelin reduce las concentraciones de LH y testosterona en plasma durante las 4 primeras semanas del tratamiento, causando infertilidad dentro de las 6 semanas post implante , los perros regresan a la normalidad 60 semanas después de la aplicación del implante (Kutzler 2006).

2.2.1.4 Antagonistas de la GnRH

Los antagonistas bloquean de manera competitiva los receptores para GnRH en la hipófisis anterior, la principal ventaja del uso de este tipo de productos sobre los agonistas, es el bloqueo inmediato del eje gonadal sin la presencia del efecto estimulante inicial que se presenta con el empleo de agonistas (Valiente et al. 2007).

En hembras el empleo de acyline 110µg/kg por vía subcutánea en los primeros tres días del pro estro, induce un estro corto y anovulatorio, retornando la hembra a pro estro en un periodo de tres semanas post administración (Kutzler 2006).

En machos la administración subcutánea de 300µg/kg de acyline induce una disminución de la calidad del semen, como defectos primarios los cuales los mas característicos fueron la presencia de gotas proximales, así con los defectos secundarios como colas dobladas y

gotas dístales , sin haberse observado efectos secundarios sistémicos en los perros (Valiente et al 2007).

2.2.2 Inmunoesterilización

2.2.2.1 Inmunización contra GnRH

El desarrollo de vacunas contra la GnRH ha presentado diversos problemas, estos son derivados básicamente a que la GnRH no es inmunológica debido a que es una pequeña hormona decapeptida la cual es bien conservada entre los diferentes mamíferos, siendo en condiciones normales reconocida como hormona propia en el organismo y por consiguiente no produce el animal anticuerpos contra ella. Sin embargo cuando se altera la GnRH con sustancias capaces de generar respuesta inmune mediada por IgG tal es el caso del inmunogeno formado por de la unión de las proteínas de GnRH y el adyuvante T P35 derivado de la proteína F del virus del moquillo canino el cual es capaz de generar la formación de anticuerpos capaces de producir perdida de la función testicular en perros (Jung et al. 2005).

De manera similar cuando se conjuga la GnRH con el toxoide tetanico se observan los mismos resultados, con la disminución de los anticuerpos circulantes (Kutzler 2006).

Cuando se conjuga la GnRH con una proteína antiviral citotóxica (Pokeweed protein) la cual actúa sobre los receptores de la GnRH en los gonadotropos, produce en el perro una disminución de la LH y testosterona sericas, de manera adicional el volumen testicular también disminuye, el efecto persiste por 12 semanas posteriores a la segunda aplicación (Sabeur et al. 2003).

2.2.2.2 Inmunización contra Zona Pellucida

La Zona Pellucida (ZP) es una capa acelular de origen proteinaceo la cual cubre la parte exterior del ovulo en los mamíferos, la cual es importante para el proceso de fertilización, ya que el espermatozoide se une a al receptor de la ZP3, para de manera posterior tener la reacción acrosomal resultando en la liberación de enzimas las cuales digieren a la ZP para que el espermatozoide penetre al ovulo. Los anticuerpos contra ZP bloquean los receptores ZP3 los cuales son el blanco ideal para la inmuno contracepción (Dumbar et al. 2002). La destrucción del complejo ovocito-granulosa y la infiltración linfocitaria del ovario son las alteraciones morfológicas más observadas (Serrano and García-Suárez 2001).

Sin embargo las proteínas de ZP de la misma especie son inefectivas para lograr la producción de anticuerpos, se deben de utilizar la ZP3 de origen porcino debido a que es

muy similar a la de origen canino y los anticuerpos producidos son eficaces en los perros (Serrano and García-Suárez 2001; Fayrer-Hosken et al. 2000).

La vacunación contra ZP3 en perras produce infertilidad en aproximadamente 75% de las hembras vacunadas, induciendo quistes foliculares en el 64% de los animales inmunizados (Kutzler 2006). Se requiere más de una aplicación del inmunogeno para observar los efectos, los cuales son temporales al disminuir los anticuerpos circulantes (Serrano and García-Suárez 2001).

2.2.3 Sustancias de aplicación local

El uso de sustancias de aplicación local para producir esterilidad esta siendo empleado en los perros machos, los cuales son inyectados dependiendo de la sustancia en el testículo, epidídimo o en los conductos eferentes (Kutzler 2006).

El metil ciano acrilato aplicado en la cola del epidídimo induce necrosis de la cola del epidídimo y azospermia 30 días posteriores a la aplicación (Esparza 1987).

Otro agente utilizado de manera reciente en campañas masivas de esterilización de perros machos es el gluconato de zink y arginina el cual se aplica intratesticular induciendo atrofia testicular y azospermia 90 días posteriores a su administración (Fahim et al. 1993).

La inyección intratesticular de cloruro de calcio en dosis de 10 a 20 mg por testículo, provoca necrosis total de las gónadas en 45 días post tratamiento (Kuladip and Prabhat 2007).

De manera general el uso de sedación conjuntamente con el procedimiento de inyección es recomendado para la correcta aplicación de la sustancia y minimizar las molestias por el procedimiento, independientemente de la adición en la formula de agentes anestésicos locales (Fahim et al. 1993; Kuladip and Prabhat 2007).

Estas técnicas no están libres de efectos secundarios como lo son la ulceración escrotal y dermatitis, auto mutilación, vomito, letárgia, anorexia entre otras (Kutzler 2006,53).

2.2.4 Sustancias de administración oral

El empleo de plantas como la *Embelia ribes* la cual es utilizada en Asia para prevenir la gestación ha sido utilizada en perros machos por vía oral a dosis de 80 mg/kg en días alternos durante 100 días, produciendo disminución del peso testicular y un grado variable de disfunción en la gónada, principalmente una disminución de los espermatocitos en

etapa de post meiosis, la cual regresa a la normalidad 8 meses posteriores al termino de la ingestión de la planta (Kutzler 2006).

2.2.5 Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son compuestos de origen vegetal con actividad similar a los estrogenos, a pesar de que su estructura química es bastante diferente.

Existen tres grupos de estos compuestos, las isoflavonas, los coumestanos y los lignanos cuyos principales representantes son la Genisteina, el Coumestrol y la Enterolactona respectivamente (Whitten y Patisaul, 2001; Whitten et al. 2002).

Una planta puede tener mas de una clase de fitoestrógenos, por ejemplo las semillas de soya *Glycine sp* son ricas en isoflavonas, mientras que su germen es rico en coumestanos (Murkies et al. 1998), de manera similar el coumestrol también se encuentra en la alfalfa *medicago sativa* (Jacob et al. 2001).

La importancia de los fitoestrogenos radica principalmente en que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos (Whitten et al. 2002) ya que al igual que los estrogenos ejercen su influencia en tejidos donde existen receptores para estrogenos tanto en el macho como en la hembra (Rosselli et al. 2002).

Miller y Fagerstone (2000), mencionan la posibilidad de utilizar fitoestrógenos para inducir infertilidad en animales. El coumestrol (100μg / g) en la dieta altera el desarrollo neuroendocrino en ratas lactantes de ambos sexos. Los efectos aditivos de coumestrol se observan por vía oral y no por la vía parenteral, esto a consecuencia de la vida media prolongada de eliminación de este fitoestrógeno administrado por esta vía; en machos se reporta una disminución importante de peso y de la libido (Whiten et al, 1994).

El empleo de fitoestrogenos administrados por vía oral ha sido descrito como un método de inducir alteraciones de tipo reproductivo en el vampiro común (Desmodus rotundus), a los cuales se les administro coumestrol 200μg en 15 ml de sangre de bovino desfibrinada durante 30 días, induciendo perdida del epitelio germinativo del testículo y disminución de las células de Leydig (Serrano et al. 2007).

Es necesario investigar la efectividad del uso de fitoestrogenos, los cuales son sustancias de origen natural, que se pueden administrar por vía oral, y pueden ser de utilidad para el control reproductivo de perros que por sus características no es posible su esterilización química o quirúrgica como lo son los no domiciliados y ferales.

3.0 Los Receptores estrogénicos

El papel que juegan las hormonas esteroidales en la regulación de la fisiología reproductiva y conductual de un individuo , es a través de sus receptores, estos pertenecen a la súper familia de receptores nucleares, la cual esta conformada por los receptores a andrógenos (AR), a estrógenos (ER), a progesterona (PG), a glucocorticoides (GR), a hormonas tiroideas (TR), para el ácido retinoico (RXR) y los receptores para vitamina D3 (VDR), y otros más agrupados y conocidos como receptores huérfanos(OR) para denotar que se desconoce el ligando al cual responden. (Robinson-Rechavi et al. 2003).

Los miembros de esta súper familia se encuentran en forma inactiva en el citoplasma celular, unidos a las proteínas de choque térmico hsp70 y hsp90 que actúan como chaperonas. Estas proteínas se disocian del receptor cuando este se une a su ligando; la interacción del ligando, junto con la separación de las chaperonas permite que el receptor cambie su conformación. Al haber un cambio en la morfología, quedan disponibles para interactuar regiones del receptor que no lo estaban; una de ellas es la secuencia de aminoácidos ácidos conocida como secuencia de localización nuclear (SLN) que le permite ser transportado hacia el núcleo para unirse al elemento de respuesta a la hormona (ERH) e iniciar la transcripción (Hughes et al. 2001).

Los AR, al igual que otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, tiene dos sitios de activación el TAF1 localizado en la región A/B y TAF 2 en la región E. Dependiendo de la naturaleza del ligando, ya sea agonista o antagonista, determina la conformación del TAF2 como coactivador o correpresor (Wilson, 2003)

Existen dos subtipos de ER el alfa (ERα) y el beta (ERβ), ambos presentan seis dominios funcionales (A-F), de los cuales el dominio C corresponde al de unión al DNA (DBD) siendo el dominio E el que se une al ligando (LBD) ambos receptores tiene una homología del 97% con respecto al sitio de unión al DBD y solo el 60 % en el LBD, esta característica les confiere variaciones en la afinidad a los diferentes tipos de ligando a los cuales se unen y el efecto biológico que producen en cada tejido (cuadro 2) (Hewitt, 2003). Como ejemplo tenemos a los estrógenos los cuales en presencia de ERα producen proliferación tisular, sin embargo en presencia de ERß inhiben la proliferación dando ejemplo que una sola hormona presenta dos efectos contrarios (Immamov et al. 2005).

4.0 Hipótesis

Existen Evidencias experimentales recientes que informan sobre la capacidad del coumestrol para inducir alteraciones reproductivas en diferentes mamíferos como los bovinos, ovinos, vampiro común y roedores por su capacidad de unirse a los receptores estrogénicos. Esta característica puede ser utilizada para inducir alteraciones reproductivas en el perro (C*anis familiaris)* macho y ser utilizada para su control poblacional.

5.0 Objetivo general

Determinar el efecto que tiene el tratamiento con coumestrol administrado por vía oral en el perro sobre la estructura histologica del testículo, la calidad del semen, los niveles de testosterona, la respuesta al olfateo de secreciones vaginales de hembras en estro y la unión del coumestrol al testículo.

5.1 Objetivos específicos

5.1.1 Evaluar el efecto de la administración oral de coumestrol a dosis de 300 µg/Kg. de peso una vez a la semana durante 4 semanas a perros adultos sobre la estructura microscópica del testículo a los 35 días.

5.1.2 Determinar el efecto que tiene el tratamiento con coumestrol sobre las concentraciones sanguíneas de testosterona de los grupos experimentales.

5.1.3 Determinar el efecto del coumestrol administrado sobre las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado de semen (espermatobioscopía) de los grupos experimentales.

5.1.4 Evaluar el comportamiento de los grupos experimentales al ser expuestos a secreciones de moco vaginal de hembras en estro

5.1.5 Determinar por métodos inmunohistoquímicos y de morfología comparativa la unión del coumestrol en testículos de los animales tratados y su correlación con las características del eyaculado.

6.0 Justificación.

En la década de 1960, la investigación en el manejo de fauna nociva se encaminó en diseñar la mejor forma de controlar las poblaciones a través de eliminarlos, aceptando las consecuencias que esto generara, como la eliminación de especies no blanco. Este enfoque se modificó en la década de 1980 con el inicio de la regulación de los plaguicidas. Se empezó a tomar en cuenta los entornos ecológicos y la calidad del medio ambiente; en la década de 1990 y los primeros años del nuevo milenio, se planteó la necesidad de nuevas estrategias de control no letal de la fauna nociva (Curnow, 2001).

Las técnicas que se han empleado en el control poblacional de los perros han sido diversas, van desde la administración de agentes tóxicos en carnadas con estricnina la cual además de poner en peligro al ser humano y en especial a los niños, esta mal vista por la sociedad; las racias efectuadas por los centros antirrábicos las cuales por lo general también son criticadas por el manejo que se les da a los animales y las técnicas de esterilización quirúrgica llevadas a cabo por las autoridades y las asociaciones protectoras de animales con efectos secundarios diversos como lo son realizar únicamente la ligadura del útero, o dejar uno o ambos ovarios en las hembras asociados a la mala preparación del personal.

Dentro del manejo poblacional no quirúrgico en los perros se encuentran actualmente en desarrollo, con resultados inconsistentes en lo referente a las vacunas contra Zona Pellucida y GnRH en donde la formación de fibromas atribuibles al adyuvante empleado en las vacunas, la necesidad de dosis de refuerzo y el manejo necesario para su aplicación genera la necesidad de contar con otras alternativas de control poblacional de fácil acceso y administración, que no afecten especies no blanco y que mantengan estable la población.

7.0 Material y Métodos.

7.1 Animales

Se utilizaron 11 perros (*Canis familiaris)* machos de diferentes razas (6 mestizos, 2 cocker spaniel, 1 yorkshire, 2 maltés) con peso promedio de 10.1 ± 3.3Kg. Los criterios de inclusión para este experimento fueron:

1.- Perros machos de entre 1 y 3 años de edad, determinada por la dentadura según la metodología descrita por (Blank, 1974).

2.- Con ambos testículos escrotados.

3.-Sin problemas de salud ni reproductivos, para lo que se les realizaron un hemograma y una espermatobioscopia inicial, encontrándose los resultados dentro de los parámetros fisiológicos.

4.- Que el escroto fuera suave, no engrosado, que no estuvieran los testículos adheridos al mismo.

5.- Que los testículos fueran de forma ovoide, de tamaño similar con la cola del epidídimo hacia atrás, que uno este ligeramente más adelante que el otro, que se sintieran firmes y turgentes,

6.- Que no tuvieran anticuerpos contra *Brucella canis.*

Manejo general: Todos los perros se mantuvieron en aislamiento por 30 días, tiempo en el que recibieron tratamiento contra endo y ectoparásitos. Se les administro una dosis de vacuna contra rabia, moquillo, hepatitis, parainfluenza y parvovirus y una dosis de bacterina contra la leptospira canicola e icterohemorrágica.

Se alojaron en instalaciones especialmente diseñadas para este fin. La muestra se dividió al azar en dos grupos; el primero con 7 animales, los cuales recibieron el tratamiento y el segundo con 4 perros, los que fueron el grupo testigo. Cada perro se instalo en jaulas individuales, cada una marcada como testigo (t) o tratamiento (TX), todos los perros recibieron el mismo manejo general bajo las mismas condiciones ambientales, el cual consistió en:

1. Identificación de los animales: Con collar, el cual indicó dependiendo de su color a que grupo experimental pertenece el perro; verde para testigos y amarillo para tratados y placas a las cuales se les grabó el número de identificación del perro.
2. Alimentación: Con croquetas comerciales (Purina, México) y agua a libre acceso.
3. Higiene de instalaciones: Lavado con agua y jabón de jaulas y comederos diariamente, desinfección de las mismas con agua clorada cada 5 días.
4. Medio ambiente: cada perro tuvo una jaula individual y se les permitia salir a un asoleadero varias horas diariamente.
5. A todos los perros se les proporcionó un juguete para evitar conductas estereotipadas.

7.2 Preparación y administración del coumestrol

En un micro tubo tipo eppendorff (1ml) se colocaron 50 mg de coumestrol puro (Fluka St Louis, MO) los cuales fueron diluidos en 500µl de Dimetilsulfoxido (DMSO Sigma Chem Co. St Louis, MO) para obtener una concentración final de 100µg/1µl, se colocó la dosis para cada animal en un "premio" para perro (Purina, México) y se ofreció la pieza una vez por semana por 4 semanas al momento de la comida y de manera posterior a cualquier evaluación que se realizara, para permitir de esta manera poder evaluar a los animales la primera vez sin tratamiento alguno y las 4 veces subsecuentes evaluar el efecto que se obtuvo con la administración del tratamiento de la semana anterior.

7.3 Obtención de eyaculado de semen.

Previo a la obtención de semen, se colectaron secreciones vaginales de 5 perras mestizas en estro, previo diagnóstico de su estado fisiológico por citología vaginal exfoliativa (Kustriz,2005, Schute 1967) Para este fin, se colectaron con hisopos estériles las secreciones contenidas en el vestíbulo vaginal de las perras durante tres días. Las puntas de algodón impregnadas se depositaron en frascos viales estériles que se mantuvieron cerrados a una temperatura de -20ºC hasta que fueron usados para el experimento (Goodwin et al. ,1979)

En ausencia de una hembra en celo, que estimulara la conducta de monta del perro, se emplearon las secreciones vaginales colectadas como estimulante de la conducta sexual (Freshman, 2002, Johnston. 2001; Kutzler. 2005) para facilitar la obtención del eyaculado como se describe en el capitulo de "Evaluación del comportamiento".

El intervalo entre cada colección de semen fue de 7 días, debido a que según Freshman (2002) para obtener semen de buena calidad, es necesario la abstinencia sexual de 4 a 5 días, sin pasar de 10 días para evitar la presencia de espermatozoides con anormalidades en su morfología.

Previo a la colección de semen se permitió a los perros salir a caminar para que orinaran, posteriormente se colocó a cada perro en una mesa de exploración amplia, se limpio el prepucio con SSF y se secó totalmente. Mediante manipulación digital se dio masaje de manera vigorosa a la altura del bulbo del pene, cuando este inicio su congestionamiento sanguíneo, se retrajo el prepucio en dirección caudal a manera de que el pene quedara totalmente descubierto, se mantuvo la presión digital a la altura del bulbo, en este momento se cubrió el pene con un cono colector de semen desechable de vinilo con punta cerrada (Kutzler, 2005), se mantuvo la manipulación hasta que el perro presentara erección total que es cuando salta el brazo para producir el bloqueo genital el que de manera fisiológica se presenta cuando se realiza una monta natural con una hembra, en este momento se rota caudalmente el pene del perro 180°, se continua la presión a la altura del bulbo hasta que se obtiene el eyaculado de semen, se colectan únicamente la primera fracción correspondiente a la pre espermática y la segunda fracción rica en espermatozoides (Kutzler. 2005).

Al terminar la colección de la muestra el perro se mantiene en la mesa de exploración, y se vigila que el pene se descongestione y regrese completamente al prepucio, cuidando que el prepucio no quede enrollado en el pene o que pelos del abdomen queden atrapados entre el pene y el prepucio, lo que puede lesionar al pene y producir dolor al perro (Kutzler. 2005). En caso que sucediere lo anterior es necesario lubricar con un gel base agua al pene y colocar el prepucio en su posición normal.

7.3.1 Evaluación del eyaculado de semen

Color: Se determinó por observación directa del cono colector después de terminar la obtención del semen.

Motilidad: Una gota del eyaculado fue tomada del colector con una pipeta pasteur y colocada en un portaobjetos previamente calentado a 37ºC, el cual fue cubierto inmediatamente con un cubreobjetos previamente calentado a la misma temperatura y revisado con un microscopio Olympus de contraste de fases a 200X y 400X para evaluar la motilidad, la cual se determinó por rangos: mayor o igual a 75% de motilidad, mayor o igual a 50%, mayor o igual de 25% y sin motilidad (Freshman, 2002).

Volumen: Se midió la cantidad del eyaculado colectado con una pipeta graduada.

Ph: Se colocó una gota del eyaculado en una tira reactiva para medir PH.

Concentración: Para calcular la concentración se realizó el conteo de los espermatozoides los cuales fueron diluidos 1:20 adicionando 50µl de eyaculado de semen tomado directamente del cono colector en 950µl de una solución fijadora (espermaticida) compuesta por 1 mililitro formaldehído al 35% en 99 mililitros de SSF esteril (Hafez. 1993).

Para realizar el conteo de espermatozoides y poder evaluar su concentración se utilizó un hemocitometro de Neubauer al que se le colocó un cubreobjetos sobre sus dos cámaras, se tomo con una pipeta micrométrica calibrada de 10µl una alícuota de la dilución previamente homogenizada y se llenó con ella el espacio comprendido entre las cámara y el cubreobjetos el cual es de 0.1mm en cada una de las cámaras , se dejó reposar la preparación 30 minutos en una cámara húmeda para que los espermatozoides sedimentaran y se realizó el conteo de las células con un microscopio de cortaste de fases a 400X.

Cada hemocitometro tiene 2 cámaras de conteo con 9 cuadros mayores, dispuestos en tres filas de 3 cuadros cada una, el cuadro central esta a su vez subdividido en 25 cuadros menores, en este es donde se contó el número de espermatozoides en ambas cámaras y se saco la media (Hafez. 1993; Johnston. 2001), esta se multiplicó por el factor de dilución “20” y por el factor de la cámara de neubauer “10,000” (Freshman, 2002).

Espermatozoides eyaculados: Se multiplicó la concentración por el volumen eyaculado.

Morfología de los espermatozoides: se colocó una gota de semen previamente fijado con la solución espermaticida en un portaobjetos, se protegió con un cubreobjetos y se evaluaron 200 espermatozoides al microscopio de contraste de fases a 400X de amplificación total, tomándose nota de las anormalidades detectadas (Hafez. 1993; Johnston. 2001; Freshman 2002).

7.4 Evaluación del comportamiento

Los experimentos se efectuaron en una habitación vacía y limpia de 9 m^2. En ésta se colocaron en el suelo dos frascos de cristal con tapas perforadas a una distancia de 3 metros entre ellos, fijados al piso con cinta adhesiva; uno de los frascos contenía las secreciones vaginales y el otro frasco solo contenía puntas de algodón humedecidas con SSF estéril (Kiddy, 1984).

Una vez por semana cada perro fue colocado en el cuarto de evaluación durante cinco minutos, tiempo en que se observó y se registró con un cronómetro la latencia de

respuesta, la cual se definió como el tiempo que tardó cada perro en manifestar interés por explorar olfatoriamente el contenido de los recipientes y el número de veces que se aproximó a cada uno de los dos frascos por mas de 5 segundos. Además se registró el número de veces en que los perros orinaron en el cuarto levantando la pata después de oler el contenido de alguno de los recipientes. Las evaluaciones individuales eran seguidas de aseo, desinfección con hipoclorito de sodio y ventilación por al menos dos horas antes de hacer la evaluación del siguiente perro.

7.5 Histología y Morfometría

A la quinta semana de tratamiento se realizó la orquiectomía bilateral la cual fue realizada bajo anestesia general inducida con propofol intravenoso (7mg/kg) y mantenida por inhalación a base de una combinación de isofluorano 1.5% y oxigeno 100cc por kg en circuito cerrado con absorción de bióxido de carbono, la técnica quirúrgica consistió en depilación y antisepsia de la zona operatoria, se colocaron campos quirúrgicos y se realizo una insición de tejido celular cutáneo, y extracción de los testículos empleando técnica cerrada, ligadura de paquete vascular y nervioso con PDS 1/0 , hemostasia de la zona y sutura por capas del tejido celular cutáneo a los perros del grupo tratado y grupo testigo (Howe,2006) , los testículos fueron fijados en solución de Bouin por 8 horas, a continuación se colocaron en etanol al 70% hasta su procesado convencional para histología, los tejidos se colocaron en cubos de parafina, se realizaron cortes transversales entre 4 y 5 µ de espesor, se desparafinizaron en xilol, se hidrataron en alcoholes graduales (70% al 40%) y se tiñeron con verde metil pironina para su evaluación histológica.

Para el estudio morfológico, se seleccionaron 2 laminillas por testículo de cada animal, de las cuales se seleccionaron 10 campos de los túbulos seminíferos y del epidídimo, que por su conformación fueran lo mas redondos posible y que entraran completos en el campo seleccionado a 40X. De manera posterior se obtuvieron imágenes digitales con un microscopio Olympus BX50 las cuales fueron evaluadas con el software LSM5 (Zeiss Alemania) (Assinder, 2007), se utilizó el criterio de Johnsen modificado para su uso en perros para cuantificar la espermatogénesis (Peters, 2000). Se midió el diámetro mayor (D), diámetro menor (d), radio mayor (R) y radio menor (r) de los túbulos seminíferos seleccionados, se utilizaron las ecuaciones (A-a/π)R y (A-a/π)r para determinar el área del epitelio germinal mayor y menor respectivamente y así conocer el grosor del epitelio germinal de los túbulos testigos y tratados, así mismo se contó la cantidad de espermatogonias, espermatocitos, espermatides redondas y alargadas, así como los núcleos

de las células de Sertoli en cada túbulo seminífero y las células de Leydig en el espacio intersticial, de manera similar se procedió con los conductos y células epididimales. (Sprando et al., 2000; Gopalkrishnan et al. 1998).

7.6 Inmuno histoquímica para detectar receptores estrogénicos

Con los cubos de parafina que se utilizaron para el análisis histológico se obtuvieron cortes de 5µm, a los cuales se les retiró la parafina. Se utilizo un sistema comercial de detección de receptores estrogénicos HER-2neu Polydetector HRP/DAB (Bio SB Santa Barbara CA) tanto en los túbulos seminíferos como en el epidídimo. Se siguieron las instrucciones del fabricante que se detallan a continuación:

Se colocaron las preparaciones en cajas de Coplin con solución de Inmunoretriever de citratos y se calentaron a 93ºC durante 5 minutos en olla de presión, dejándolas enfriar a temperatura ambiente. A continuación se colocaron las preparaciones por un lapso de 5 minutos en un poli detector bloqueador de peroxidasas, al terminar este tiempo, los tejidos se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo primario HER-2 o con un control negativo según el caso. Cumplido este periodo los tejidos se cubrieron con un marcador Polydetector y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Al terminar el periodo anterior se incubaron por 10 minutos con Poly detector DAB (diaminobencidina), para visualizar la inmunotinción de receptores estrogénicos se tiñó para contraste con hematoxilina por 60 segundos y se evaluaron por microscopia de luz (Parlevliet et al. 2006).

7.7 Detección por fluorescencia de coumestrol unido al receptor

Las preparaciones utilizadas para la detección inmunohistoquimica de los receptores estrogénicos fueron observadas en un microscopio Axioplan 2 (Zeiss Alemania) a 10 y 40X con filtros para longitud de onda de 290-390 nm con la finalidad de detectar al complejo coumestrol-receptor el cual emite fuerte señal fluorescente al estar unido a su proteína (Miksieseck, 1993). La intensidad de la fluorescencia expresada en píxeles se comparó entre los grupos experimentales y control por medio del software AxioVision 4.6 (Zeiss Alemania).

7.8 Detección de los niveles séricos de testosterona

Cada semana y antes de colectar el semen de los perros se obtuvo con un equipo vacutainer sangre completa de la vena cefálica, de la cual se obtuvo suero el cual se mantuvo a -20ºC hasta su procesado por el método directo de ELISA.

Se utilizo un kit comercial (Diagnostic Automation Inc. Calabasas CA) siguiendo las instrucciones del fabricante, su sensibilidad para testosterona es de 0.05ng/ml y su especificad es de 100%, presenta pobre reacción cruzada del 0.86% contra otros andrógenos como la dehidrotestosterona y androstenadiona.

7.9 Análisis de la información

Para todas las variables que fueron medidas de manera repetida (espermatobioscopia, comportamiento y testosterona sérica), se utilizo un análisis de varianza de mediciones repetidas de Friedman, para las variables que solo se evaluaron una sola vez (morfometría y fluorescencia) se utilizó una prueba de “t”, para esto se empleo el Statistical Análisis Software (Statistical Análisis System Institute, 1993).

Se utilizó la descripción para la detección de receptores estrogénicos y la unión del coumestrol a los mismos.

8.0 Resultados

8.1 Evaluación del eyaculado de semen.

Color: La valoración del color se llevo a cabo por observación directa ordenando los resultados de mayor a menor turbidez, los resultados se muestran en la Cuadro 4 y figura número 1.

Motilidad: El porcentaje de motilidad se muestra en la figura 2

Volumen: El volumen eyaculado se redujo, paso de 2.2±1.5 ml la semana cero a 1.2±0.7 ml la semana 4 ($P< 0.05$) como se muestra en la figura 3

pH : El pH del eyaculado de semen paso de 6.5±0 a 5.2±0.3 en la semana 4

Concentración: La concentración paso de 305.46±160.28 $X10^6$ la semana "cero" a 65.77±75.39 $X10^6$ ($P<0.001$) la semana 4, ver figura 4

El número total de espermatozoides eyaculados: pasaron de 518.44±215.44 $X10^6$ a 57.67±50.48 $X10^6$ ($P<0.001$) como se puede observar en la figura 4.

Alteraciones en la morfología espermática: En la semana "cero" fue de 14.7±3.3 % la cual se incremento a 64.6±12.7% ($P<0.001$) a la cuarta semana, las alteraciones atribuibles a defectos en la espermatogénesis y en la maduración en el epidídimo significativas se enlistan en la figura 5 y cuadro 5, en la figura 6 se compara la concentración total de células espermáticas eyaculadas y con alteraciones.

8.2 Evaluación del comportamiento

La frecuencia de olfateo del recipiente con las secreciones vaginales disminuyó significativamente de la semana uno a la 4. Estos valores variaron de 2.6 ± 1.95 veces en la semana "0" a 0.6 ± 0.55 en la semana 4 ($P<0.01$), De igual manera, la menor frecuencia de marcado de territorio con orina de los perros se observó en la cuarta semana, iniciando en 2 ± 0.63 veces y culminando en 0.4 ± 0.49 ($P<0.005$).

No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en las respuestas a la SSE durante el período de evaluación como se observa en la figura 7.

El tiempo de latencia de respuesta de los perros hacia las secreciones vaginales aumentó de manera significativa de la semana uno a la 3 y en la semana 4 se mantuvo (Figura 8). De la misma manera aumentó la latencia al marcado con orina estando ésta al inicio en 0.54 ± 0.35 minutos y en la cuarta semana en 2.45 ± 2.35 minutos ($P<0.005$).

8.3 Histología y Morfometría

Los resultados de la morfometría y la estimación del área del epitelio germinal de los túbulos seminíferos, epidídimo y espacio intersticial se muestran en las cuadros 6 y 7 así como en las Figuras 9 a 13

El diámetro de los conductos aferentes se incremento en los animales del grupo tratado con coumestrol 39.1±11.9µm comparado con los animales del grupo testigo 14.8±5.4µm ($P<0.01$) como se muestra en la Figura 14

El criterio de Johnsen (ver características en el anexo 2) paso de 10±0 en los perros del grupo testigo a 7±1 la semana 5 de los animales del grupo tratado con coumestrol ($P<0.001$).

8.4 Inmuno histoquímica para detectar receptores estrogénicos

Al comparar el marcaje para la detección de los receptores estrogénicos en los testículos entre los perros del grupo testigo y los tratados se observa mayor intensidad en estos últimos, la señal se detecta en las células de Leydig , espermatogonias, espermatocítos y espermátides, en las células del epitelio de los conductos aferentes y en el tejido conectivo del epidídimo, como se observa en las Figuras 15 y 16

8.5 Unión del coumestrol al receptor estrogénico

La fluorescencia que emite el coumestrol al estar unido al receptor estrogenito se detecto en el espacio intersticial y células de Leydig del testículo y analizo en intensidad de píxeles para el color verde entre el grupo testigo 58±13 pixeles y el tratado 177±41 pixeles, lo que equivale a 73±17% de intensidad para el color verde (Fluorescencia del coumestrol unido a su proteína) por campo analizado para los animales del grupo tratado contra 24±5 de intensidad para el color verde (fondo del tejido excitado con el microscopio de fluorescencia) para el grupo testigo ($P=0.001$), en el epidídimo se detecto la señal en el tejido del intersticio, la intensidad de píxeles para el color verde fue de 49±15 para los animales testigo y de 200±27 ($P=0.001$) para los animales tratados , como se puede observar en las Figuras 17-19.

En el Cuadro 8 se muestra en resumen la localización de receptores estrogénicos por ambas metodologías en el testículo de perro.

8.6 Niveles séricos de testosterona

Los valores de testosterona no mostraron cambios representativos durante las semanas de tratamiento, los valores pasaron de de 1.5±0.4 ng la semana “0” a 2.2±1.1ng la semana 4 como se muestra en la figura 20 ($P>0.05$).

9.0 Discusión

El testículo de los mamíferos cumple dos funciones primordiales, la síntesis de hormonas esteroides y la producción de espermatozoides. El desarrollo normal del testículo y el mantenimiento de la espermatogenesis es controlado por las gonadotropinas y la testosterona, cuyos efectos son modulados por factores locales, uno de estos factores son los estrógenos, los cuales son esenciales para mantener en funcionamiento el tracto reproductivo en los machos. La exposición a estrogenos exógenos o la inhibición de los estrogenos endógenos ya sea durante el desarrollo o en la vida adulta produce cambios tanto estructurales como funcionales en el aparato reproductivo de los machos (Assinder 2007).

Estos cambios han sido descritos en ratas y consisten en reducción de la concentración espermática (Goyal et al., 2003), incremento de la apoptosis en células germinales (Assinder 2007), disminución de células de Sertoli (Atanassova et al. 2005), distensión de la red testicular y conductos aferentes, infertilidad (Hess et al. 2000 y 2001).

La conversión irreversible de andrógenos en estrógenos es catalizado por la citocromo P450 aromatasa (P450aro) producto del gene denominado Cyp19, los estrógenos son sintetizados en el aparato reproductor del macho por lo menos en las células de Leydig (Abney . 1999), células de Sertoli, el aparato de Golgi de las espermatides redondas, en las espermatides alargadas y en el flagelo de los espermatozoides maduros (Hess et al. 2001, Saunders, 2005, Lambard et al. 2005).

En esos mismos sitios se ha detectado la presencia de ERα y ERß lo que sugiere una estrecha relación entre las células productoras y la presencia de receptores para estrogenos, lo que permite suponer la presencia de un efecto paracrino y atocrino a nivel testicular.

La primera etapa en el desarrollo de un tratamiento específico mediante coumestrol, está asociada con la presencia de receptores con los cuales pueda interactuar. A pesar de que en la literatura aparecen informes de las alteraciones inducidas por fitoestrógenos en distintas especies animales diferentes al perro como lo son el vampiro macho en el cual se describen alteraciones en la morfología de los túbulos seminíferos (Serrano 2007) y en los toros donde se reporta baja en la motilidad espermática (Romero 1997), son pocos los artículos en los que se intenta la localización de receptores. Esto se debe principalmente a la dificultad que implica manejar una población heterogénea, como la de los receptores estrogénicos α y β. En la literatura se encontraron pocos trabajos en los que se identifican

los receptores estrogénicos en asociación con la aplicación de coumestrol. Dichos estudios se efectuaron en tejido testicular de vampiros procesado por la técnica de squash utilizando un marcado "in situ" con coumestrol para observar al microscopio de fluorescencia convencional (Pérez-Rivero et al 2005), también se han localizado en cultivos de células (Cos-7) y en receptores estrogénicos de origen humano (Miksicek, 1993; de Boer 2004)

En este trabajo se han detectado receptores estrogénicos en el perro a partir de cortes de testículo de 5µm de espesor, combinando dos metodologías diferentes, la Inmuno histoquímica (Nie et al. 2002) y por microscopía de fluorescencia (Miksicek, 1993; de Boer 2004) aprovechando dos características únicas del coumestrol las cuales son la capacidad que tiene para unirse a ambas estirpes de receptores y su capacidad de auto fluorescer con mayor intensidad al estar unido a su receptor (λ_{ex} 377 nm; λ_{em} 437 nm), el cual como método no isotópico es útil para la localización del complejo coumestrol-receptores estrogénicos α y β .

En el testículo de perro se ha reportado la presencia de ERα en células de Leydig, células peri tubulares (mioides), red testicular, conductos aferentes tanto en las células ciliadas como en las no ciliadas, en el músculo peri tubular del epidídimo así como en su tejido conectivo finalizando en los conductos deferentes (Nie et al., 2002), mismos sitios a excepción de los conductos deferentes los cuales no fueron analizados, se ha detectado señal para ER con las metodologías empleadas en este trabajo (Cuadro 8, figuras 15 y 16).

También existen los ERβ en espermatides redondas, espermatogonias y espermatocitos, dentro del túbulo seminífero de manera ocasional se detecta en células de Sertoli y en las células de Leydig presentes en el intersticio, en la red testicular existen de manera moderada estos receptores y en los conductos aferentes es muy intensa su señal, en el epidídimo su presencia varia de moderada a fuerte, dependiendo del segmento analizado (cabeza a cola), para finalizar en los conductos deferentes los cuales son positivos (Nie et al., 2002) (cuadro 8 , figuras 15 y 16).

Los diferentes mecanismos con que cuenta el organismo para la producción y detección de estrogenos se sabe que la P450aro, los ERα y ERß son codificados por diferentes genes, sin embargo se expresan de manera conjunta con los AR en el tracto reproductivo del macho (Akingbemi. 2005).

En modelos experimentales se ha podido identificar la importancia de los estrogenos en la fisiología reproductiva de los machos, como se menciono con anterioridad, esta hormona actúa como factor de supervivencia en las células germinales, la presencia de P450 aro

promueve la maduración espermática y regula los mecanismos de absorción en los conductos aferentes (Lambard et al. 2005).

Es así como utilizando ratones a los cuales se les suprimieron los genes que expresan la aromatasa (ArKO), y ambos ER (ERKO) se han observado alteraciones en la morfología testicular y disminución de la motilidad de los espermatozoides la que resulta en imposibilidad de fertilizar al ovocito (Akingbemi. 2005, Lambard et al 2005).

En animales adultos ArKO la inhibición de la biosíntesis de estrógenos, tiene como resultado alteraciones de la espermatogenesis consistentes en defectos en la espermiogenesis, incremento de la apoptosis (Giampietri, 2005) y la reducción de la fertilidad, la cual va acompañada con la disminución del comportamiento de copula, (Robertson ,2002).

Se ha observado en espermatozoides con poca movilidad, una disminución del 50% en la actividad de la aromatasa, esto comparado con espermatozoides con movilidad normal (Carreau, 2007)

En ausencia de ER (ERKO) se reduce la absorción de fluidos en los conductos aferentes, la red testicular y los túbulos seminíferos, a consecuencia de esta alteración de la dinámica de los fluidos, estos se acumulan en los testículos dañando el epitelio germinal de los conductos seminíferos y por ende, provocan alteraciones en el desarrollo de los espermatozoides (Hess et al. 2001).

Si bien el coumestrol presenta actividad similar a los estrogenos su importancia radica en que se une a ambos receptores estrogénicos, aunque con mayor afinidad por los ER β también se une a los ERα, su efecto es dosis dependiente, en dosis bajas actúa como agonista estrogenito y a dosis relativamente altas actúa como antagonista estrogénico, lo que produce un bloqueo del receptor. (Jacob et al. 2001, Whitten et al. 2002).Además se ha reportado su efecto antagónico sobre la aromatasa y la 17βHSD también íntimamente ligadas a la producción de estrogenos (Rice, 2008).

En el presente estudio se han descrito cambios tanto en la morfología testicular, como es el aumento del lumen en los túbulos seminíferos, la reducción del numero de células germinales , la disminución tanto de la cuenta espermática, como de su concentración, el incremento en alteraciones en la morfología y motilidad del espermatozoide y cambios en el comportamiento en los perros, los cuales son similares a los observados en ratas que consumen cantidades equivalentes a 14mg /kg de fitoestrogenos al día, induciendo apoptosis, la cual es mediada por factores locales independientes al eje hipotalamo-

hipofisis-testículo, como lo es el bloqueo de la acción paracrina y/o autocrina de los estrogenos(Assinder 2007).

En los animales ERα, ERαβKO y ArKO, los cuales son incapaces de detectar o producir estrogenos, se observan efectos similares a los encontrados en este trabajo, esto abre la posibilidad de que el coumestrol a esta dosis antagonise el efecto de los estrogenos endogenos mediante el bloqueo del receptor o interfiera con la aromatizacion de la testosterona (Robertson, 2002) lo que al final genera un estado de "ausencia de estrogenos" induciendo alteraciones asociadas a la falta de estos.

Al igual que en el testículo, en el Sistema Nervioso Central del perro se ha demostrado la existencia de ERα en los núcleos ventromedial y preóptico medio del hipotálamo. Estas regiones anatómicas están relacionadas con el olfato y el comportamiento sexual (Whitten, 2001). De igual manera, se ha demostrado la expresión y acumulo de ER β en sitios relacionados con el comportamiento como la región preóptica, implicada en la conducta sexual del macho, además del núcleo ventro medial, la amígdala y el bulbo olfatorio (BO) que intervienen en la modulación de la excitación sexual (Bodo and Rissman, 2006; Simpson and Davis ,2000), en ratones hembra se ha encontrado que el coumestrol antagoniza los efectos neuroendocrinos de los estrógenos a través del receptor estrogénico tipo α (Jacob et al. 2001).

El aumento en el período de latencia de respuesta a las secreciones vaginales observado en el presente estudio es similar al que se presenta en ratas tratadas con COU en la dieta.(Whiten et al. 1995) La perdida del comportamiento sexual en ratones se observa en los modelos experimentales ERαβKO, lo que indica que ambos receptores se complementan para que el comportamiento sexual se lleve a cabo(Simpson and Davis 2000). La capacidad de unión del COU a ambos receptores y su acción antagónica hacia los mismos puede estar relacionada con las alteraciones en la conducta de exploración olfatoria a las secreciones de moco cervical de hembras en celo.

En el presente estudio se observó la presencia de receptores estrogénicos en el testículo de perro, y que el tratamiento de perros con una dosis de 300µg/kg de COU durante cuatro semanas tiene un efecto oligospérmico y teratospérmico, además ocasiona alteraciones en la morfología testicular y en la en la conducta de exploración olfatoria, todas ellas derivadas de alteraciones asociadas a diversos efectos negativos que tiene el coumestrol sobre la producción y detección de estrogenos que favorece el aumento de la apotosis a nivel epitelio germinal y la perdida del comportamiento sexual.

Resumen de resultados y discusión

ESPERMATOSCOPIA	COMPORTAMIENTO	MORFOLOGÍA	UNIÓN A RECEPTORES	TESTOSTERONA
Resultados	Resultados	Resultados	Resultados	Resultados
↓ motilidad espermática. ↓ volumen eyaculado. ↓ concentración espermática (ezp/ml). ↓ espermatozoides eyaculados totales. Alteraciones en la morfología espermática.	↓ frecuencia de olfateo de secreciones vaginales. ↓ frecuencia de marcado con orina. ↑ latencia de respuesta hacia las secreciones vaginales. ↑ latencia de respuesta al marcado con orina.	↓ número de células germinales. ↑ diámetro de los túbulos seminíferos y conductos aferentes. ↑ espacio intersticial ↓ valor del criterio de Johnsen	•Células de Leydig •Red testicular •Conductos aferentes •Epidídimo (tejido conectivo) •Espermatogonias •Espermatocitos •Espermatides redondas •Cellas de Sertoli	•Valores dentro de rango fisiológico con tendencia al alza. •No hay cambios estadísticos entre el periodo de 5 semanas. •Forma de muestreo no optimo (frecuencia e intervalo)

ESPERMATOSCOPIA	1.0 Comparado con	2.0 comparado con	3.0 Comparado con	Conclusiones
Resultados	**Luconi et al.** J Ster Biochem Mol Biol 2002;80:369-381	**Lambard et al. J** Ster Biochem 2005;95:63-69	**O´Donell et al.** Endocrine Reviews 2001;22:289-318	Estos cambios se deben de manera principal a:
↓ motilidad espermática. ↓ concentración espermática (ezp/ml) y espermatozoides eyaculados totales. Alteraciones en la morfología espermática.	ERαKO degeneración progresiva de los testículos. ERαKO ↓ espermatozoides en número y motilidad. ArKO Alteración en la espermatogénesis, falla la diferenciación de células germinales hacia espermatozoides, se incrementa la apoptosis	ArKO daño en la espermatogénesis. ArKO ↓ motilidad espermática. ArKO ↓ maduración espermática	La exposición a estrogenos ↓ cuenta de espermatozoides. Los estrogenos son el principal componente de la retroalimentación negativa de la testosterona ERαKO alteración de la espermatogénesis, ↓ cuenta espermática y baja la motilidad espermática. ArKO ↑ apoptosis en espermátides redondas.	↓ **motilidad espermática.** ERαKO ArKO ↓ **concentración espermática (ezp/ml) y espermatozoides eyaculados totales.** ERαKO ArKO Estrogenos **Alteraciones en la morfología espermática** ArKO

COMPORTAMIENTO	1.0 Comparado con	2.0 comparado con	3.0 Comparado con	Conclusiones
Resultados	**Simpson & Davis** Proc Nat Acad Sci 2000;97:14038-14040	**Bodo & Rissman** Front Endocrinol 2006;27:217-232	**Leconi et al.** J Ster Bioch Mol Biol 2002;80:369-381	Estos cambios se deben de manera principal a:
↓ frecuencia de olfateo de secreciones vaginales y marcado con orina. ↑ latencia de respuesta hacia las secreciones vaginales y al marcado con orina.	ERαβKO comportamiento sexual en machos alterado No montas No penetración No eyaculación ArKO ↓ comportamiento sexual	ERαKO comportamiento sexual en ambos sexos alterado ERαKO los animales no distinguen entre olores de otros machos y los producidos por las hembras en estro	ERαKO ↓ número y frecuencia de montas. ArKO ↑ latencia entre montas y numero de montas.	↓ **frecuencia de olfateo de secreciones vaginales y marcado con orina.** ERαβKO ERαKO ArKO ↑ **latencia de respuesta hacia las secreciones vaginales y al marcado con orina** ERαβKO ArKO

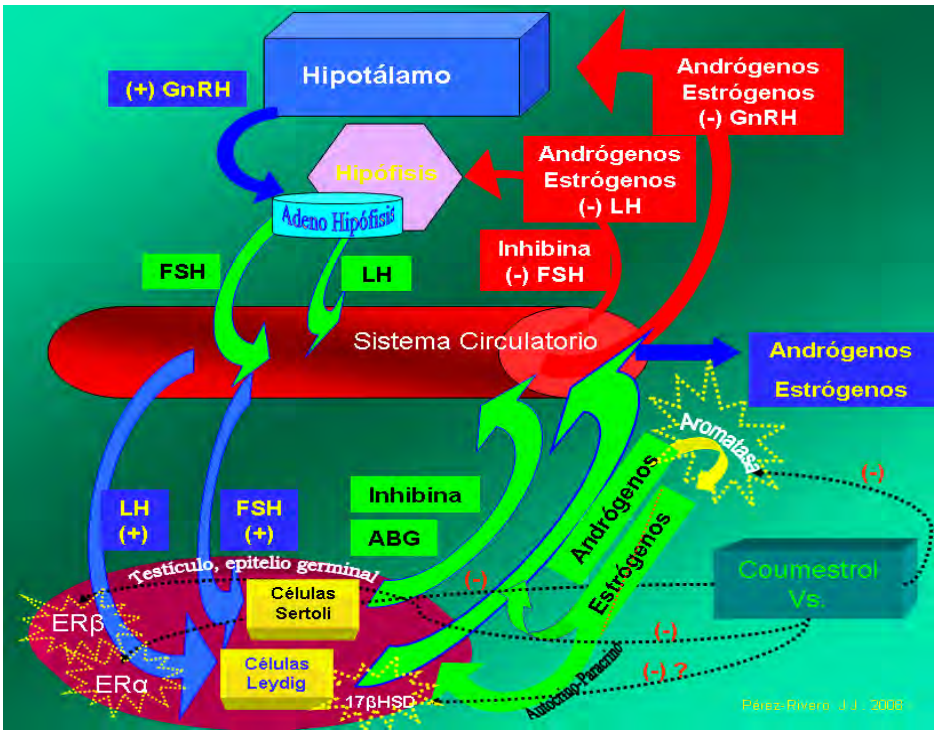
MORFOLOGÍA	1.0 Comparado con	2.0 comparado con	3.0 Comparado con	Conclusiones
Resultados	**Robertson et al**. Endocrinology 2002;143:2913-2921	**Eddy et al. 1996**	**Assinder et al.** Reproduction 2007;133:11-19	Estos cambios se deben de manera principal a:
↓ número de células germinales. ↑ en el diámetro de los túbulos seminíferos de los conductos aferentes. ↑ en el espacio intersticial ↓ valor del criterio de Johnsen	ArKO ↑ espacio intersticial. ArKO ↓ grosor del epitelio germinal. ArKO ↓ número de espermatocitos, espermátides redondas y alargadas. Los fitoestrogenos inhiben la acción de los estrogenos endogenos o de la aromatasa.	ERKO epitelio germinal atrofiado ERKO Lumen del túbulo dilatado	ERαKO distensión de la red testicular y conductos aferentes. ArKO alteraciones en la espermatogénesis, ↑ de la apoptosis de espermatocitos, espermátides redondas y alargadas. Fitoestrógenos actúan como antiestrógenos de manera independiente al eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo	↓ **número de células germinales.** ArKO ↑ **diámetro de los túbulos seminíferos y de los conductos aferentes.** ERαKO ↑ **en el espacio intersticial** ArKO ↓ **valor del criterio de Johnsen** ERαKO ArKO

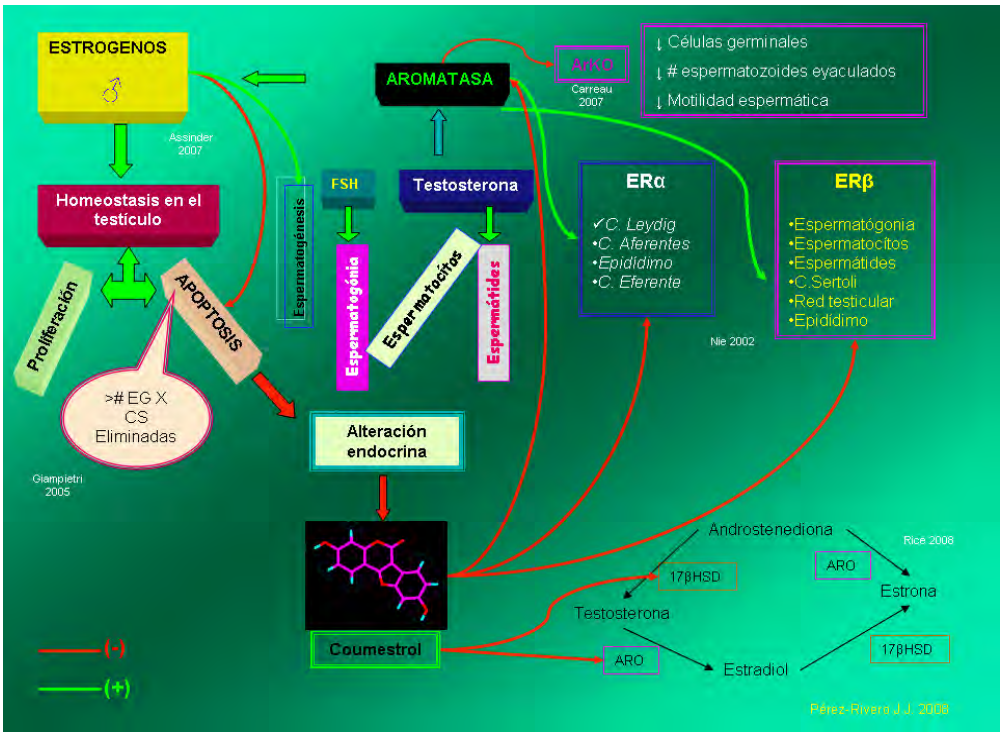
TESTOSTERONA	1.0 Comparado con	2.0 comparado con	3.0 Comparado con	Conclusiones
Resultados	**Akingbemi et al**. Endocrinology 2003;144:84-93	**Mc Vey et al.** Reprod Toxicol 2004;18:677-685	**O´Donell et al.** Endocrine Reviews 2001;22:289-318	Estos cambios se deben de manera principal a:
Valores dentro de rango fisiológico, con tendencia al aumento. Forma de muestreo no optimo (frecuencia e intervalo)	ERαKO ↑ LH y la biosíntesis de andrógenos en las células de Leydig. ↑ LH puede deberse a insensibilidad a los estrogenos La presencia de ER mejora los efectos de retroalimentación negativa de la testosterona en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, puede deberse a la aromatización de la T y la subsiguiente activación de las vías mediadas por ERα	↑ Testosterona testicular y serica en animales que consumen dietas altas con isoflavonas se puede deber a : Alteraciones en el metabolismo hepático. Alteraciones en la concentración de hormona unida y libre a la SHBG ↑ LH. La exposición a Isoflavonas y equol ↑ LH lo que ↑ el nivel de andrógenos producidos	Tratamiento con inhibidores de la aromatasa ↑ la LH y Testosterona	**Valores dentro de rango fisiológico con tendencia al aumento.** ERαKO Tratamiento con fitoestrogenos ↑ la LH Inhibidores de la Aromatasa.

UNIÓN A RECEPTORES	1.0 Comparado con	2.0 comparado con
Resultados	**Nie et al** Biol. Reprod. 2002;66 :1161-1168	**Nie et al** Biol. Reprod. 2002;66 :1161-1168
Células de Leydig Red testicular Conductos aferentes Epidídimo (tejido conectivo) Espermatogonias Espermatocitos Espermatides redondas Cellas de Sertoli	**ERα** Células de Leydig. Células peri tubulares. Núcleos de las células de la red testicular. Epitelio de los conductos aferentes. Tejido conectivo del epidídimo.	**ERß** Espermatogonias. Espermatocitos. Espermatides redondas. Células de Sertoli. Conductos aferentes Epidídimo Conductos eferentes

ESPERMATOSCOPIA	COMPORTAMIENTO	MORFOLOGÍA	UNIÓN A RECEPTORES	TESTOSTERONA
Conclusiones	Conclusiones	Conclusiones	Conclusiones	Conclusiones
↓ motilidad espermática. ERαKO ArKO **↓ concentración espermática (ezp/ml) y espermatozoides eyaculados totales.** ERαKO ArKO Estrogenos **Alteraciones en la morfología espermática** ArKO .	**↓ frecuencia de olfateo de secreciones vaginales y marcado con orina.** ERαβKO ERαKO ArKO **↑ latencia de respuesta hacia las secreciones vaginales y al marcado con orina** ERαβKO ArKO	**↓ número de células germinales.** ArKO **↑ diámetro de los túbulos seminíferos y de los conductos aferentes.** ERαKO **Aumento en el espacio intersticial** ArKO **↓ valor del criterio de Johnsen** ERαKO ArKO	**Se encontró señal por IHQ y coumestrol en las siguientes células:** **Células de Leydig** **Red testicular** **Conductos aferentes** **Epidídimo (tejido conectivo)** **Espermatogonias** **Espermatocitos** **Espermatides redondas** **Cellas de Sertoli**	**Valores dentro de rango fisiológico con tendencia al aumento.** **ERαKO** **Tratamiento con fitoestrogenos ↑ la LH** **Inhibidores de la Aromatasa** ArKO.

Modelo que se sugiere para el efecto del coumestrol en el perro macho.





Conclusiones

Disponer de nuevas estrategias para el control de poblaciones de perros no domiciliados, con un producto que se pueda administrar por vía oral, que interfiera con la respuesta sexual del macho, disminuya el conteo de espermatozoides eyaculados y que estos tengan alteraciones en su morfología, será una herramienta útil para el control de la reproducción de poblaciones de perros que deambulan y se reproducen libremente.

El empleo de las propiedades antiestrogenicas del coumestrol para bajar la fertilidad de perros no domiciliados y con ello poder proponer una alternativa de control de poblaciones no letal para esta especie, no había sido explorado por ningún grupo de investigación, lo cual deja campo fértil para la investigación de los efectos de este compuesto de manera especifica en perros (esto no cierra la oportunidad de hacerlo en otra especie considerada fauna nociva).

Es importante conocer la dosis efectiva al 50% y la dosis única para inducir alteraciones reproductivas, y la duración de las mismas para poder calcular el intervalo entre dosis.

El desarrollo de un “pellet” con buena palatabilidad y propiedades de selectividad de “especie blanco”, que sea desagradable para especies no blanco y por supuesto para el humano en especial los niños, además de encontrar un antídoto para hacer más seguro y atractivo este producto de control de fauna nociva al mercado.

Sin lugar a dudas es necesario conocer mas sobre su toxicidad general y efectos específicos sobre sistemas como el endocrino, vascular y óseo, de la misma manera explorar el comportamiento sexual con más detalle y evaluar cual es su mecanismo de acción.

En este trabajo se han dado los primeros pasos en el desarrollo de una metodología alterna no letal a base de coumestrol para el control de la población canina, queda mucho camino por recorrer para lograr frutos en la prevención y control de la sobrepoblación canina y con ello la reducción de los problemas de salud pública veterinaria en este rubro.

10.0 Literatura Citada

1. Abascal TG. Ecología de las mordeduras por perros. Rev. AMMVEPE 1997; 8:236-238.
2. Abney TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. Steroids. 1999; 64:610-617
3. Acha PN, Szyfres B. Rabia en Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. volumen II tercera edición. Organización Panamericana de la Salud. 2003: 351-383
4. Akingbemi BT. Estrogen Regulation of Testicular Function. Reproductive Biology and Endocrinology. 2005. doi:10.1186/1477-7827-3-51
5. Aslantaş O, Özdemir V, Kiliç S, Babür C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. Veterinary Parasitology. 2005;129: 187-191
6. Assinder S, Davis R, Fenwick M, Glover A. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogens content increase apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. Reproduction. 2007; 133: 11-19
7. Atanassova NN, Walker M, McKinell C, Fisher JS, Sharpe RM. Evidence that androgens and estrogens, as well as follicule stimulant hormone, can alter Sertolli Cell number in the neonatal rat.J Endocrinol. 2005;184:107-117
8. Blank I J. El Maravilloso Mundo de los Perros. Librería de Manuel Porrúa S.A. México. 1974.
9. Bodo C., Rissman E., F. New roles for estrogen receptor β in behavior and neuroendocrinology. Frontiers in Neuroendocrinology. 2006. Doi:10.1016/j.yfrne.2006.02.004
10. Brod, Claudiomar Soares, Aleixo, José Antonio Guimarães, Jouglard, Sandra Denise Dorneles *et al*. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey**.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [online]. July/Aug. 2005, vol.38, no.4 [cited 26 August 2006], p.294-300. Available from World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-
11. Burke TJ, Reynolds HA. Megestrol acetate for estrus postponement in the bitch. J Am Vet Med Assoc.1975;167:285-287

12. Butler JRA, du Toit JT. Bingham J. Free-ranging domestic dogs (Canis familiaris) as predators and prey in rural Zimbabwe: threats of competition and disease to large wild carnivores. Biological Conservation. 2000;115:369-378
13. Canadian Hospital Injury Reporting and Prevention Program (CHIRPP).1996. Injuries associated with dog bites and dog attacks. Health Canada. Ottawa, Ont., Canada.
14. Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, Said L, Lambard S, Galeraud-Denis I, Delande C. Estrogens and male reproduction: a new concept. Braz J Med Biol Res. 2007;40:761-768
15. Castillo Y, Bazan, H, Alvarado D, *et al*. Estudio epidemiológico de Toxocara canis en parques recreacionales del distrito de San Juan de Lurigancho, Lima- Perú. . *Parasitol. día*. [online]. jul. 2001, vol.25, no.3-4 [citado 14 Agosto 2006], p.109-114. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-07202001000300007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0716-0720.
16. Coleman PG, Dye C. Inmunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies. Vaccine. 1996;14:185-186
17. Courtenay O., Quinnell R.J., Garcez L.M., Shaw J.J., Dye C. - Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission - J. Infect. Dis. 2002;186:1314-1320. Epub 2002 Oct 11
18. Curnow,RD. What are research needs and skills of the future. Proc. Wildlife Damage Management Conf. 2001; 9:1-8. Disponible en el URL: http://www.aphis.usda.gov/ws/nwrc/is/01pubs/01-8.pdf
19. de Boer T, Otjens D, Muntendam A, Meulman E, van Oostijen M, Ensing K. Development and validation of fluorescent receptor assays based on the human recombinant estrogen receptor subtypes alpha and beta. J Pharm Biomed Anal 2004;34: 671-679
20. De Keuster T, Lamoureux J, Kahn A. Epidemiology of dog bites: A Belgian experience of canine behaviour and public health concerns. The Veterinary Journal 2005[cited 27 April 2006] Available from World Wide Web: http://www.sciencedirect.com/science/journal/10900233
21. Dubé D, Assaf A, Pelletier G, Labrie F. Morphological study of the effects of GnRH agonist on the canine testis after 4 mounths of treatment and recovery. Acta Endocrinologica (Copenh). 1987;116:413-417

22. Dunbar BS, Kaul G, Prasad M, Skiner SM. Molecular approaches for the evaluation of immune responses to zona pellucida (ZP) and development of s England GC. Effect of progestagens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. J Reprod Fertil Suppl. 1997;51:123-138
23. England GC. Effect of progestagens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. J Reprod Fertil Suppl. 1997;51:123-138
24. Esparza G M. Esterilización en el Perro por Aplicación de Methyl Cyanoacrilato en la Cola del Epidídimo. Tesis de Licenciatura (Medico Veterinario). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 1987. 32 paginas
25. Fahim MS, Wang M, Stucu MF, Fahim Z, Youngguist RS. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zink arginine. Contraception. 1993;47:107-122
26. Fayrer-Hosken RA, Dookwah HD, Brandon CI. Immunocontrol in dogs. Animal Reproduction Science. 2000;60-61:365-373
27. Freshman JL. Semen Collection and Evaluation. Clinical Techniques in Small Animal Practice. 2002;17(3):104-107
28. Freshman JL, Olson PN, Amann RP, et al. The effects of methyltestosterone on reproductive function in male grey hounds. Theriogenology. 1990,33:1057-1073
29. Giampietri C, Petrungaro S, Coluccia P, D'Alessio, Starace D, Riccioli A. et al. Germ cell apoptosis control during spermatogenesis. Contraception. 2005;72:298-302.
30. Glen A S, Dickman CR .Effects of bait-station design on the uptake of baits by non-target animals during control programmes for foxes and wild dogs. Wildlife Researc. 2003; 30: 147-149.
31. Green JS, Gipson PS. Feral Dogs. In Prevention and Control of Wildlife Damage.1994:C77-C82 [cited 29 September 2005]. Available from World Wide Web:
32. Gobello C. Dopamine agonists, anti-progestins, antiandrogens, long term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. Theriogenology.2006;66:1560-1567
33. Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Willians CS, Srivastava KK, Ali K. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. Biol Repro. 2003;68:2081-2091

34. Goodwin M, Gooding KM, Regner F. Sex pheromone in the dog. Science. 1979;203:559-561
35. Gopalkrishnan K, Gill-Sharma MK, Balasinor N, Padwal V, D´Sousa S, Parte P, Jayaraman S, Juneja HS. Tamoxifen-Induced Light and Electron Microscopic Changes in Rat Testicular Morphology and Serum Hormonal Profile of Reproductive Hormones. Contraception. 1998;57:261-269
36. Guy N.C., Luescher U.A. , Dohoo S.E., Spangler E., Miller J.B., Dohoo I.R., Bate L.A. Demographic and aggressive characteristics of dogs in a general veterinary caseload. Applied Animal Behaviour Science .2001:74;15-28
37. Hafez ESE. Semen evaluation. In Reproduction in farm animals. Philadelphia, Lea&Febiger, 1993. pp 405-423
38. Hess RA, Bunick D, Bahr J. Oestrogens, its receptors and function in the male reproductive tract-a review. Molecular and Celular Endocrinology. 2001; 178:29-38
39. Hess RA, Bunick D, Lubahn DB, Zhou Q, Bouma J. Morphologic changes in efferent ductules and epididymis en estrogen receptor α knockout mice. J Androl. 2000;21:107-121
40. Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for estrogen receptors α and β in reproductive tissues. Reproduction 2003 ; 125 : 143-149
41. Howe LM. Surgical methods of contraception and sterilization. Theriogenology. 2006;66:500-509
42. Hughes IA, Lim HN, Martin H, Mongan NP, Dovey L, Ahmed SF, Hawkins JR. developmental aspects of androgen action. Mollecular and Cellular Endocrinology.2001; 185:33-41
43. Imamov O, Shim G, Warner M, Gustafsson J. Estrogen receptor beta in health and desease. Biology of Reproduction. 2005;73:866-871
44. Jacob DA, Temple JL, Patisaul HB, Young LJ, Rissman EF. Coumesrtrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor α. Exp Biol Med 2001; 226 (4):301-306.
45. Johnston SD, Root Kustriz MV, Olson PNS. Canine and Feline Theriogenology. WB Saunders Co.: Philadelphia;2001
46. Jung MJ, Moon YC, Cho IH, Yeh JY, Kim SE, Chang WS, et al. Induction of castration by immunization of male dogs with recombinant gonadotropin-releasin

hormone (GnRH)- canine distemper virus (CDV) T helper cell epitope p35. Journal of Veterinary Science.2005;6:21-24

47. Krebs JW, Mandel EJ, Swerdlow DL, Rupprecht CE. Rabies surveillance in the United States during 2003. JAVMA. 2004;225:1837-1849
48. Kiddy CA, Mitchell DS, Hawk HW. Estrus-Related Odors in Body Fluids of Dairy Cows. J. Dairy. Sci. 1984;67:388-391
49. Kuladip J, Prabhat KS. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. Contraception.2007;75:390-400
50. Kustriz MVR. Reproductive behavior of small animals. Theriogenology. 2005;64:734-746
51. Kutzler M A. Semen Collection in the dog. Theriogenology.2005;64:747-754
52. Kutzler M A, Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. Theriogenology.2006;66:514-525
53. Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S, Carreaun S. Aromatase in testis: Expression and role in male reproduction. Journal of Steroid Biochemestry & Molecular Biology. 2005; 95:63-69
54. Landsberg G.M. The distribution of canine behavior cases at three behavior referral practices. Vet. Med. 1991;86:1011-1018
55. Leney J. Impact of Companion Animals on Islands, Issues and Problems in their Management: Dogs. Proceedings of the Conference Challenges of Animal Protection on Island Nations with Special Emphasis on Dogs and Cats. 2002. April 2. Miami Beach Florida USA 2002 :7-9
56. Loza-Rubio E, Aguilar-Setién JA, Bahlou C, Brochier E, Pastoret PP, Tordo N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. Arch Med Res. 1999 Mar-Apr; 30 (2) : 144-9
57. Manteca V X. Etología clínica veterinaria del perro y del gato. Ed. Multimedica España;2003:57-66
58. Martínez-Barbabosa, Fernández PA, Vásquez TO, Ruiz HA. Frecuencia de *Toxacara canis* en perros y áreas verdes del sur de la Ciudad de México, Distrito Federal. Veterinaria México. 1998;29:239-244
59. Meltzer MI, Rupprecht CE. A Review of the Economics of the Prevention and Control of Rabies. Part 2: Rabies in Dogs, Livestock and Wildlife. Pharmacoeconomics. 1998;14:481-498

60. Méndez GR, Gómez TM, Somoza AI, Liras MJ, Pais PE, Vela ND. Mordeduras de Perro. Análisis de 654 casos en 10 años. An Esp Pediatr. 2002;56:425-429
61. Miksicek RJ. *In situ* localization of the estrogen receptor in living cells with the fluorescent phytoestrogen coumestrol. J Histochem Cytochem 1993;41: 801-810
62. Miller L, Rhyan J, Killian G. Evaluation of GnRH Contraceptive Vaccine use Domestic Swine as a Model for Feral Hogs. Proceedings of 10th Wildlife Damage Management Conference. 2003:120-127
63. Miller LA. and Fagerstone KA. Induced infertility as a wildlife management tool. Procedings Vertebrate Pest Conference.2000; 19:160-168. Disponible en el URL: http://www.aphis.usda.gov/ws/nwrc/is/00pubs/00-46.PDF
64. Moreira ED, Mendez de Souza VM, Sreenivasan M, Nacimiento EG,de Carvalho LP. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. Vet Parasitol. 2004;122:245-252
65. Murkies AL, Wilcox G, Davis R. Phytoestrogens. J Clin Endocrinol Metabol. 1998;83:297-303
66. Nie R, Zhou Q, Jassim E, Saunders PTK, Hess RA. Differential Expression of Estrogen Receptor α and β in the Reproductive Tracts of Adult Male Dogs And Cats. Biol. Reprod. 2002;66 :1161-1168
67. Norma Oficial Mexicana: NOM-033-ZOO-1995
68. OPS. Sistema de Información Epidemiológica (SIEPI). [cited 11 February 2006]. Available from World Wide Web: http://siepi.panaftosa.org.br/wbf_Painel.aspx
69. Ozanne-Smith J, Ashby K, Stathakis VZ. Dog bite and injury prevention-analysis, critical review, and research agenda. Inj Prev. 2001; 7:321-6.
70. Pal SK. Parental care in free ranging dogs, *Canis familiaris.* Applied Animal Behaviour Science.2005:90; 31-47
71. Parlevliet JM, Pearl CA, Hess MF, Famula TR, Roser JF. Inmunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. Theriogenology. 2006;66:755-765
72. Patronek G.J., Rowan A.N. Editorial: Detemining dog and cat number and population dynamics. Anthrozoos.1995: 8 (4); 199-205
73. Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setién A, Villa Godoy A, Serrano H. Detección de receptores estrogenicos beta (ERβ) en testiculo de *Desmodus rotundus* mediante el uso de coumestrol. Vet Mex.2005;36:469-474

74. Peters MAJ, de Rooij DG, Teerds KJ, van der Gaag I, van Sluijs FJ. Spermatogenesis and testicular tumors in ageing dogs. J Reprod Fertil. 2000;120:443-452
75. Preston WS, Bloomberg MS. Implications of Early Neutering in the Dog and Cat. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal).1995;10:8-12
76. Reece JF. Dogs and dog control in developing countries. In: The State of the Animals III. 2005:55-64
77. Reithinger R, Ueslei T, Davies CR. Topical Insecticide Treatments to Protect Dogs from Sand Fly Vectors of Leishmaniasis. Emerg Infect Dis. (on line) 2001 vol 7, no 5 [cited 23 September 2005] Available from World Wide Web: http://www.medscape.com/viewarticle/418200
78. Rice S, Whitehead SA. Phytoestrogen oestrogen synthesis and breast cancer. J Ster biochem Mol Biol. 2008;108:186-195
79. Robertson KM, O´Donell L, Simpson ER, Jones MEE. The Phenotype of the Aromatase Knockout Mouse Reveals Dietary Phytoestrogens Impact Significantly on Testis Function. Endocrinology. 2002; 143:2913-2921
80. Robinson-Rechavi M, Escribia H, Laudet V. The Nuclear Receptor Superfamily. Journal of cell science.2003;116:585-586
81. Romero CM, Castellanos MT, Mendoza RM, Reyes RA, García AR. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. Vet Mex 1997; 28:25-30
82. Rosselli M, Reinhart K, Imthurn J, Keller PJ, Dubey RK. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. Hum Reprod Update. 2000;6:332-350
83. Rubel D, Wisnivesky C. Magnitude and distribution of canine fecal contamination and helminth eggs in two areas off different urban structure, Greater Buenos Aires, Argentina. Veterinary Parasitology. 2005;133:339-347
84. Sabeur K, Ball BA, Nett TM, Ball HH, Liu IKM. Effect of GnRH conjugated to pokeweed antiviral protein on reproductive function in adult male dogs. Reproduction.2003;125:801-806
85. Sacks JJ, Kresnow M. and Houston B. Dog bites: how big a problem?. Injury Prevention, 1996; 2(1): 52 –54
86. Saunders P. Does estrogen receptor β play a significant role in human reproduction. TRENDS of Endocrinology and Metabolism.2005;16:221-227

87. Scarlett JM, Salman MD, New JG, Kass PH. Reasons for Relinquishment of companion animals in U.S. Animal Shelters: Selected Health and Personal Issues. Journal of Applied Animal Welfare Science.1999;2:41-57
88. Schutte, A,P. Canine vaginal cytology-I. Technique and cytological Slater MR. The Role of Veterinary Epidemiology in the Study of Free-Roaming Dogs and Cats. Preventive Veterinary Medicine. 2001;48:273-286
89. morphology. J. Small Anim Pract. 1967;18, 301-306.
90. Sprando RL, Collins TFX, Wiesenfeld P, Babu US, Rees C, Black T, Olejnik N, Rorie J. Testing the potential of flaxseed to affect spermatogenesis: morphometry. Food Chem Toxicol. 2000; 38:887-892
91. Serrano H, García-Suárez MD. Alteraciones en ovarios de perras por inmunización activa con proteínas de ovocito de cerdo. Vet.Mex.2001;32:221-224
92. Serrano H, García-Suárez MD. Alteraciones en ovarios de perras por inmunización activa con proteínas de ovocito de cerdo. Vet.Mex.2001;32:221-224
93. Simpson ER and Davis SR. Another role highlighted for estrogens in the male: Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 19;97(26):14038-40
94. Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Galassi Geres P, Gobello C. Effect of the Ngr. Antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. Theriogenology. 2007;68:687-692
95. Wang M. Neutersol: Intratesticular injection induces sterility in dogs. Proc. Non-surgical Meth. Pet Populat. Control. 2002 April 19-21 Callaway Gardens Georgia USA. 2002:62-65
96. Wilson ME. Biological function and mode of action of the androgen receptor. Pure Appl. Chem.2003;11-12:1685-1697
97. Whiten PL, Lewis C, Russell E and Naftolin F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. Proc Soc Exp Biol Med.1995;208: 82-86
98. Whitten PL, Patisaul HB, Young LJ. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavones in rodents. Neurotixicol Teratol. 2002;24:47-54
99. Whitten PL, Patisaul HB. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. Environ Health Perspect. 2001;109:5-20
100. Whitten PL, Russell E and Naftolin F. Influence of phytoestrogen diets on estradiol action in the rat uterus. Steroids 1994;59: 443-449

11.0 CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Principales causas por la que los perros son abandonados. (Modificado de Scarlett et al.1999).

Agresión hacia el humano	Problemas de comportamiento	Características del animal (no agresividad o enfermedad)	Salud del propietario
Agresión hacia otros animales	Animales enfermos	Cambio de casa	Necesidades personales

Cuadro 2. Agresiones por perro en diferentes países.

País	Incidencia anual Casos/habitantes	Edad en años mas frecuente de agresión	Localización de la agresión	Referencia
Australia	ND	0-4	cara	Sacks and Kresnow 1996. Ozanne-Smith et al. 2001.
Bélgica	22/1000	<15	ND	De Keuster et al. 2005.
España	ND	<13	cabeza, cara	Mendez et al. 2002.
Estados Unidos	18/1000	<14	ND	Guy et al. 2001. Patronek and Rowan 1995.
México	1.15/1000	<19	ND	Abascal 1997.

ND: Dato no disponible

Cuadro 3. Principales técnicas quirúrgicas empleadas en la esterilización masiva de perros y sus complicaciones (modificada de Howe 2006).

Hembras	Complicaciones	Machos	Complicaciones
Ovario histerectomía por línea media	Hemorragia, síndrome de ovario remanente, piómetra del muñón, fístula, infección.	Orquiectomía	Hemorragia, hematoma y/o inflamación del escroto, infección.
Ovario histerectomía por el flanco	Hemorragia, síndrome de ovario remanente, piómetra del muñón, infección	Vasectomía	Persiste el comportamiento sexual, debido a la presencia de hormonas.

Cuadro 4.- Color del eyaculado se semen. Blanco (+++), gris claro (++), traslucido (+), cristalino (-).

PERRO	SEMANA "0"	SEMANA "1"	SEMANA "2"	SEMANA "3"	SEMANA "4"
1	+++	++	+	-	++
2	+++	++	+++	-	-
3	+++	++	++	-	-
4	+++	++	++	++	++
5	+++	++	++	+	++
6	+++	+	++	++	+
7	+++	++	+	+	+

Cuadro 5.- Alteraciones en la morfología espermática.

Cada semana se obtuvo semen y realizo la evaluación morfológica, los datos se expresan en porcentaje ± Desviación Estándar y fueron analizados con un ANOVA de mediciones repetidas $P<0.01$.

Dia	0	7	14	21	28
Alteraciones morfológicas totales (%)					
Control	17±2	14±5	18±5	13±5	16±4
Coumestrol	15±3	37±19	43±17	60±20	65±13
Alteraciones por origen (%)					
Espermatogénesis*					
Control	13±4	10±5	10±6	11±6	11±5
Coumestrol	9±3	23±19	21±8	39±17	46±15
Epididimales*					
Control	3±2	4±2	7±6	2±1	4±3
Coumestrol	6±4	14±6	17±11	17±6	15±5

*Los tipos de alteraciones en los espermatozoides por origen se muestran en el Anexo

Cuadro 6.-Morfometría testicular. Se muestra el valor de la media del número de células presentes en los túbulos examinados y el espacio entre túbulos seminíferos de los grupos Tratados y Testigo con su desviación estándar.

	TRATAMIENTO	TESTIGO	Prueba de “t”
Células de Leydig	4 ± 3	9 ± 2	P = 0.001
Células de Sertoli	5 ± 2	11 ± 3	P = 0.001
Espermatogonias	4 ± 3	11 ± 2	P = 0.001
Espermatocitos	23±11	50 ±16	P = 0.001
Espermátides Redondas	43±22	108±26	P = 0.001
Espermátides Alargadas	14±10	47±20	P = 0.001
Espacio entre túbulos (µm)	124±99	58±40	P = 0.02

Cuadro 7.- Área del epitelio germinal de los túbulos seminíferos y epidídimo.

	Área Mayor $X10^6$ µ	Área Menor $X10^6$ µ
Epitelio germinal **Tratados**	14.36±9.61	12.28±10.98
Epitelio germinal **Testigos**	40.11±0.73	58.01±1.14
Prueba de "t" Túbulos seminíferos	P = 0.001	P = 0.001
Epidídimo Microvellosidades **Tratados**	5.8±1.6	3.8±1.0
Epidídimo Microvellosidades **Testigos**	17±4.6	11.4±2.7
Prueba de "t" Epidídimo	P = 0.001	P = 0.001

Cuadro 8.-Detección de receptores estrogénicos en testículo de perro.

Empleando inmuno histo química (IHQ) y fluorescencia por unión del receptor al coumestrol.

		IHQ	Fluorescencia
Células de Leydig		+	+
Células peri tubulares		ND	ND
Red testicular		+	+
Conductos aferentes	Células ciliadas	+	+
	Células NO ciliadas	+	+
Epidídimo	Músculo peri tubular	ND	ND
	Tejido conectivo	+	+
Conductos eferentes		ND	ND
Espermatides redondas		+	+
Espermatogonias		+	+
Espermatocitos		+	+
Células de Sertoli		+	+

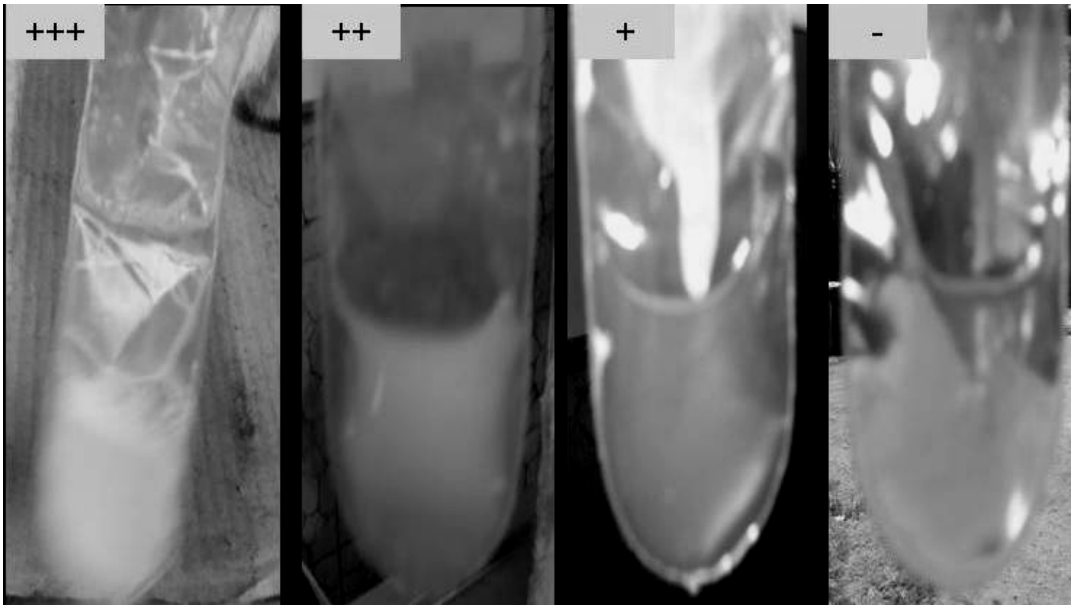


Figura 1.- Color del eyaculado de semen de los perros tratados con coumestrol.

Se nota el cambio de color conforme avanza el tratamiento con coumestrol,(+++) corresponde a la mayor turbidez encontrada a la semana "1" de tratamiento y así sucesivamente (++)a la semana 2, (+) a la semana 3 y finalmente (-) a la semana 4. el cambio de color es directamente proporcional a la concentración de espermatozoides en el eyaculado.

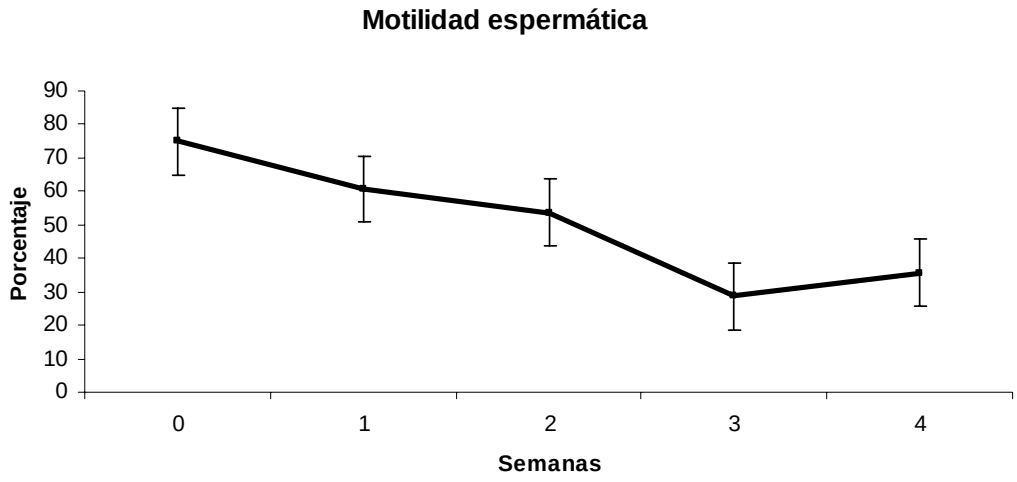


Figura 2.- Motilidad espermática de los perros tratados con coumestrol.
Conforme el tratamiento semanal con coumestrol avanzo, el porcentaje de espermatozoides con motilidad fue reduciendo ($P<0.05$).

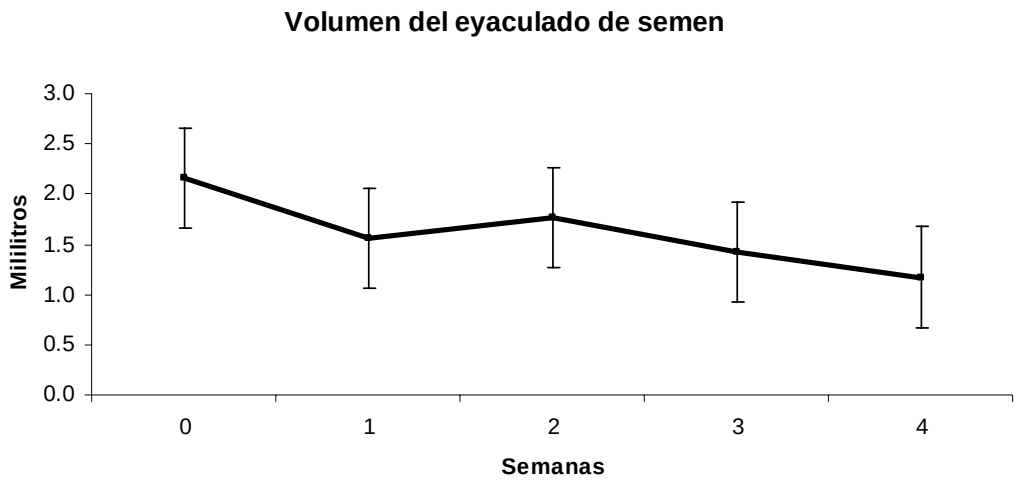


Figura 3.-Volumen del eyaculado de semen de los perros tratados con coumestrol. El volumen expresado en mililitros se redujo de manera considerable después de la tercera dosis de coumestrol. Los resultados fueron analizados con un ANOVA de mediciones repetidas $P<0.05$

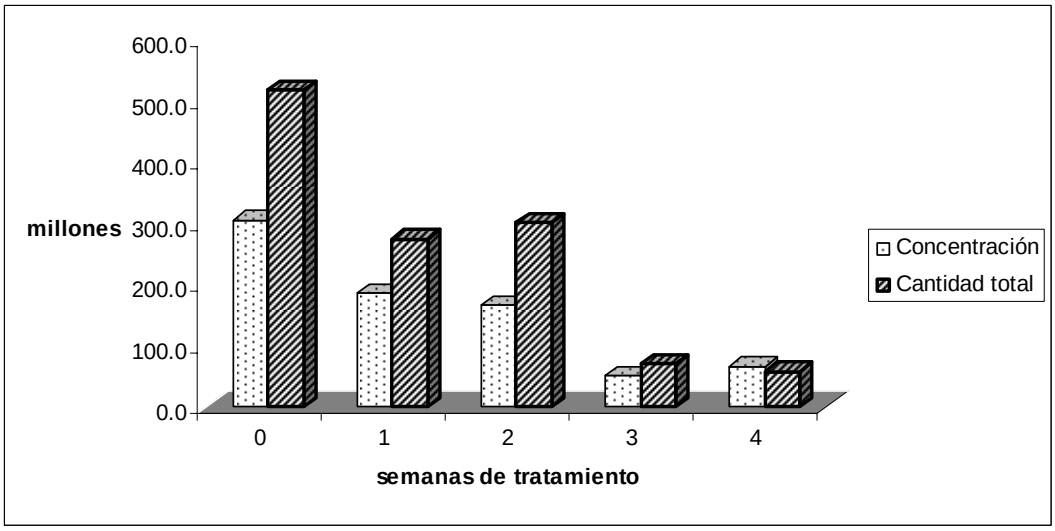


Figura 4.- Espermatozoides eyaculados y su concentración de los perros tratados con coumestrol.

Conforme avanza el tratamiento con coumestrol la cantidad de espermatozoides eyaculados y su concentración se reduce ($P<0.01$)

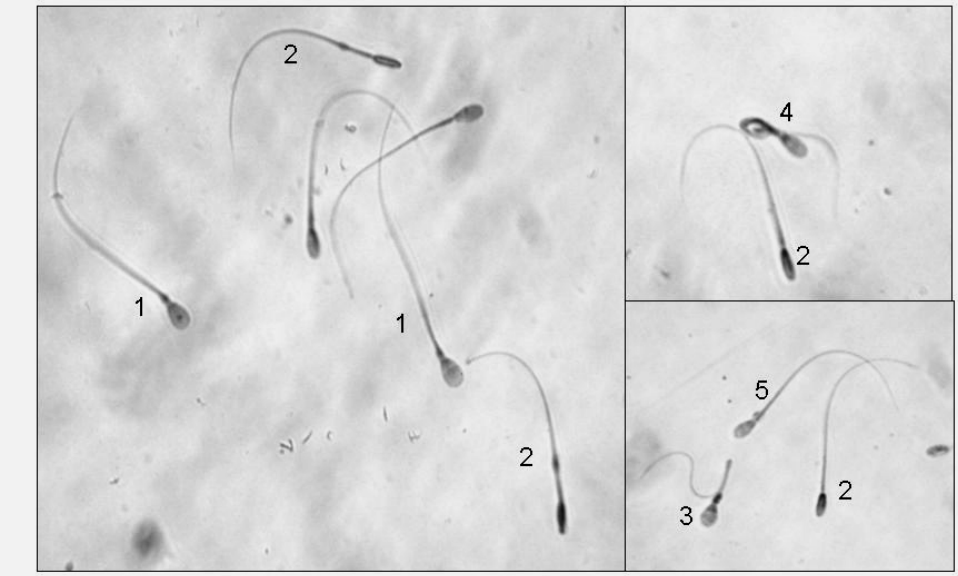


Figura 5.- Diferentes alteraciones en la morfología espermática en perros tratados con coumestrol.

(1) Espermatozoides normales, (2) cabeza de flama y gota distal, (3) cola doblada, (4) nudo proximal, (5) gota proximal.

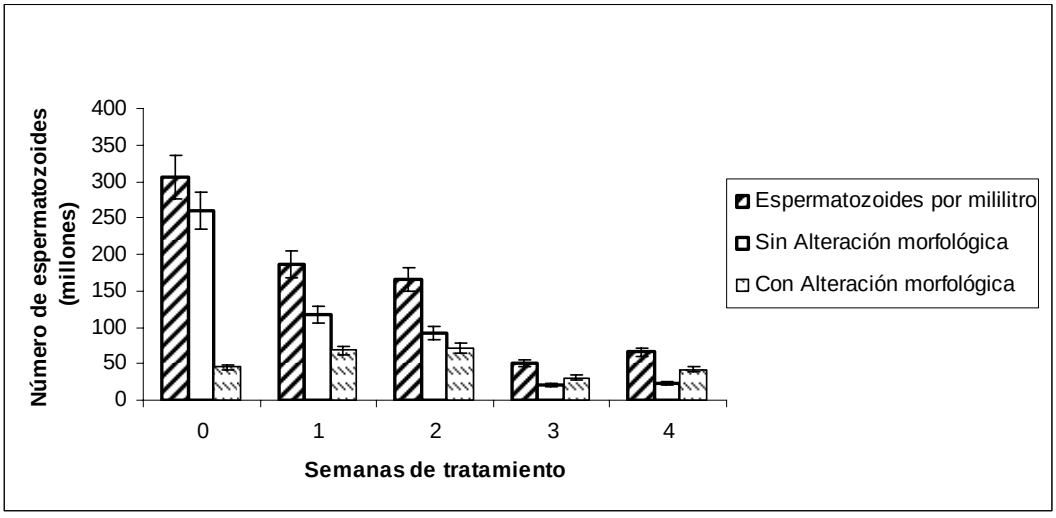


Figura 6.- Concentración espermática total, sin y con alteraciones morfológicas en perros tratados con coumestrol.

Se observa que conforme avanza el tratamiento la concentración espermática disminuye y aumenta la cantidad de espermatozoides con alteraciones en su morfología ($P<0.01$).

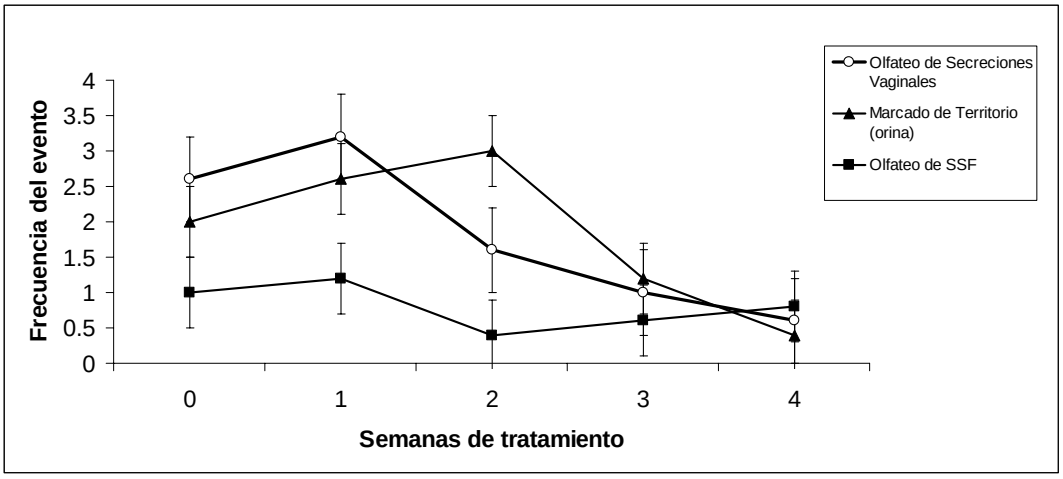


Figura 7. Frecuencia de exploración olfatoria de perros tratados con coumestrol. Perros adultos clínicamente sanos se retaron contra recipientes conteniendo secreciones cervicales de hembras en estro (probando) o solución salina (SSE). Los valores al inicio del estudio se consideraron como valores basales. De la semana 1 a 4 se administró por vía oral a cada perro una dosis/semana (300µg/kg), durante 4 semanas. Cada punto representa el promedio de las mediciones de los cinco animales.

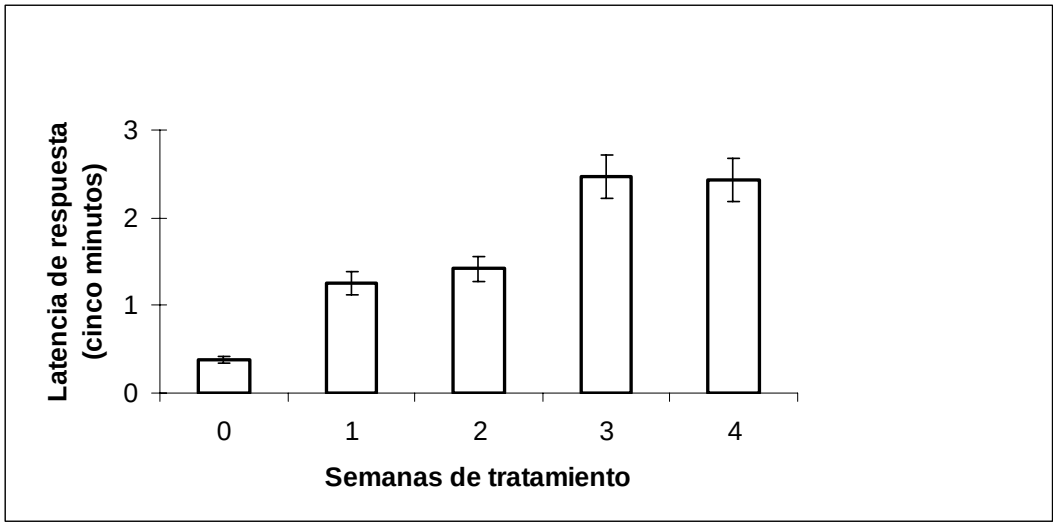


Figura 8. **Latencia de respuesta olfatoria de perros tratados con coumestrol a secreciones vaginales de perras en estro.**

Se muestra el tiempo que tardaron en acercarse y olfatear el frasco conteniendo las secreciones vaginales. Cada punto representa el promedio de los animales utilizados. El mayor tiempo de latencia se alcanzó en la tercera semana del experimento ($P<0.005$).

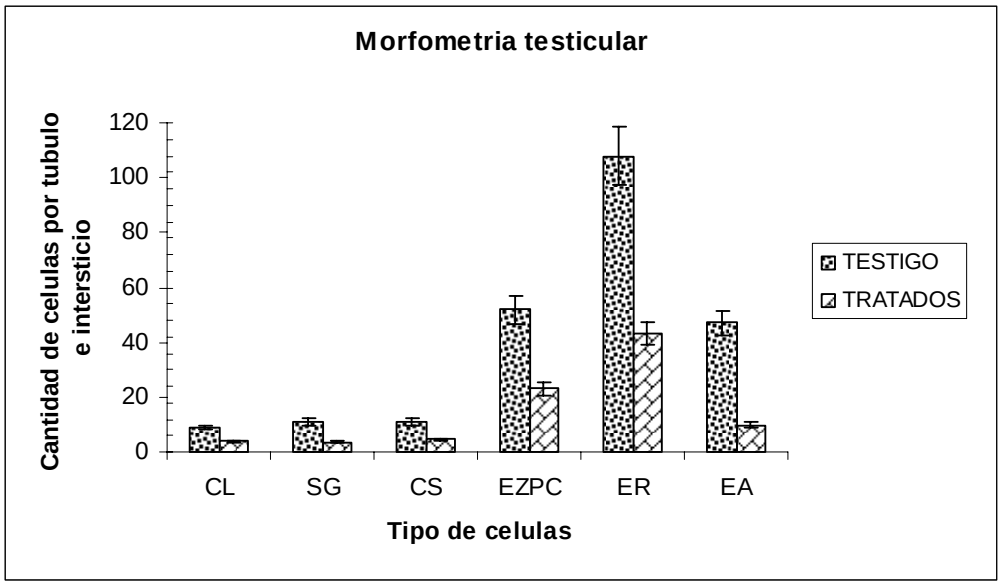


Figura 9. Morfometría testicular de los perros testigo y tratados con coumestrol.

Se redujeron los diferentes tipos celulares en el túbulo seminífero y espacio intersticial entre los perros del grupo tratado con coumestrol y el grupo testigo ($P<0.001$).

(CL= Células de Leydig; SG= Espermatogonias; CS= Células de Sertoli; EZPC= Espermatocitos; ER= Espermatides Redondas; EA= Espermatides Alargadas)

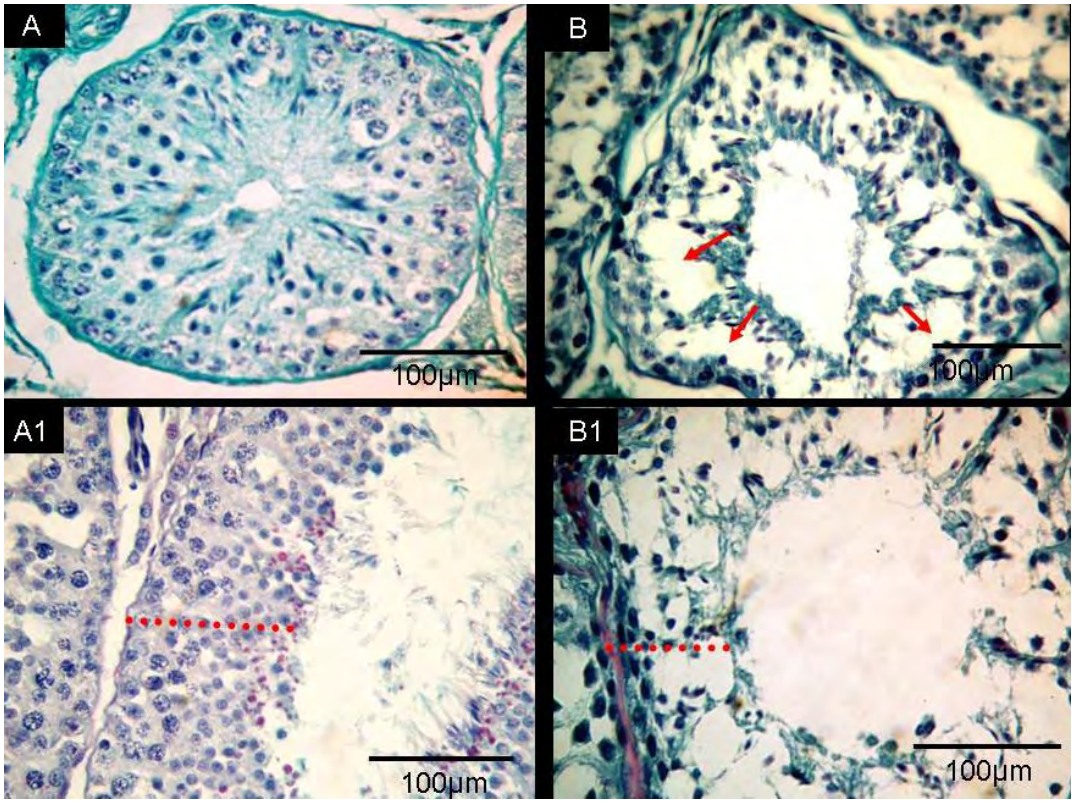


Figura 10. Morfología de túbulos seminíferos de los animales testigo y tratados con coumestrol.

Se observa en la cuadro A un túbulo seminífero activo (20X) donde se puede apreciar el epitelio germinal integro, comparado con el túbulo de un animal control (20X) donde no se aprecian células germinales y existe vacuolización del epitelio. En A1 se nota el grosor del epitelio germinal y espermatozoides en el lumen (20X) en un animal del grupo control, con B1 en donde el grosor del epitelio germinal ha disminuido (puntos rojos) y no existen espermatozoides en el lumen (20X).

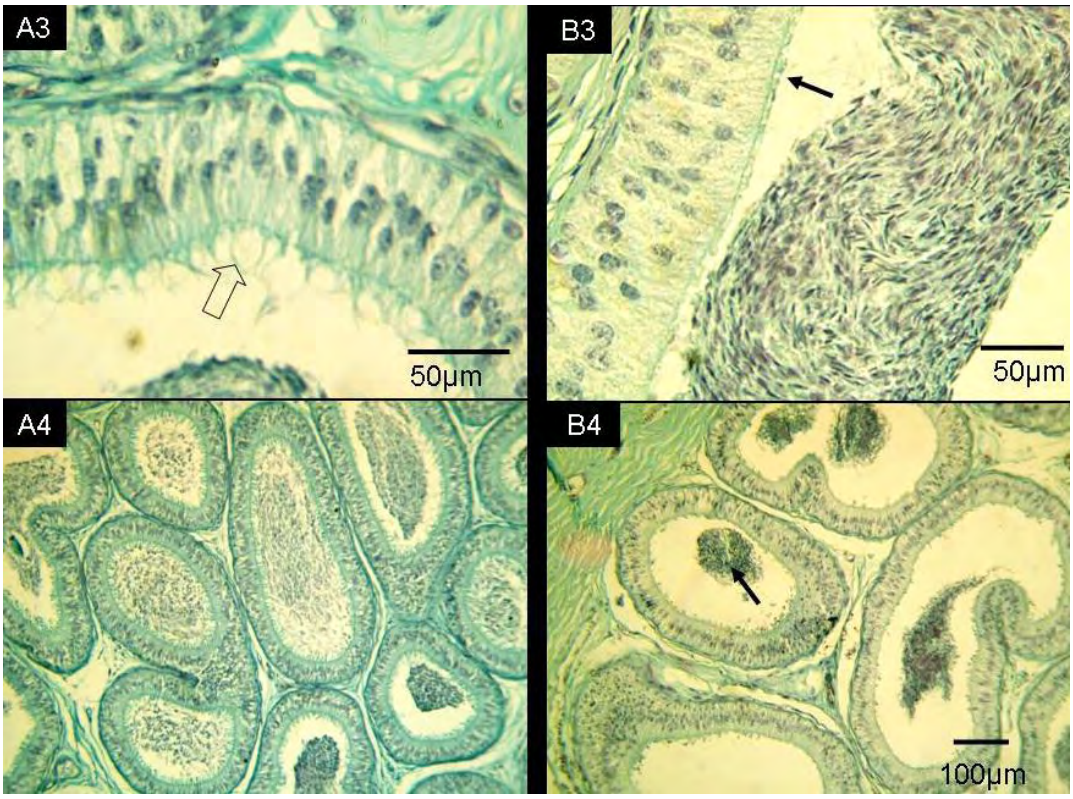


Figura 11.-Morfología del epidídimo de animales control y tratados con coumestrol.

A3 corresponde a un animal del grupo testigo, la flecha indica el lumen del epidídimo con micro vellosidades en todo su espesor (40X), B3 es una muestra de animales del grupo tratado, la flecha señala que no hay presencia de micro vellosidades (40X). En A4 se muestra una vista panorámica (10X) de una muestra de epidídimo del un animal del grupo testigo, el cual se aprecia lleno de espermatozoides. B4 es de un animal del Grupo tratado (10X) donde se observa pocos espermatozoides en el lumen del epidídimo.

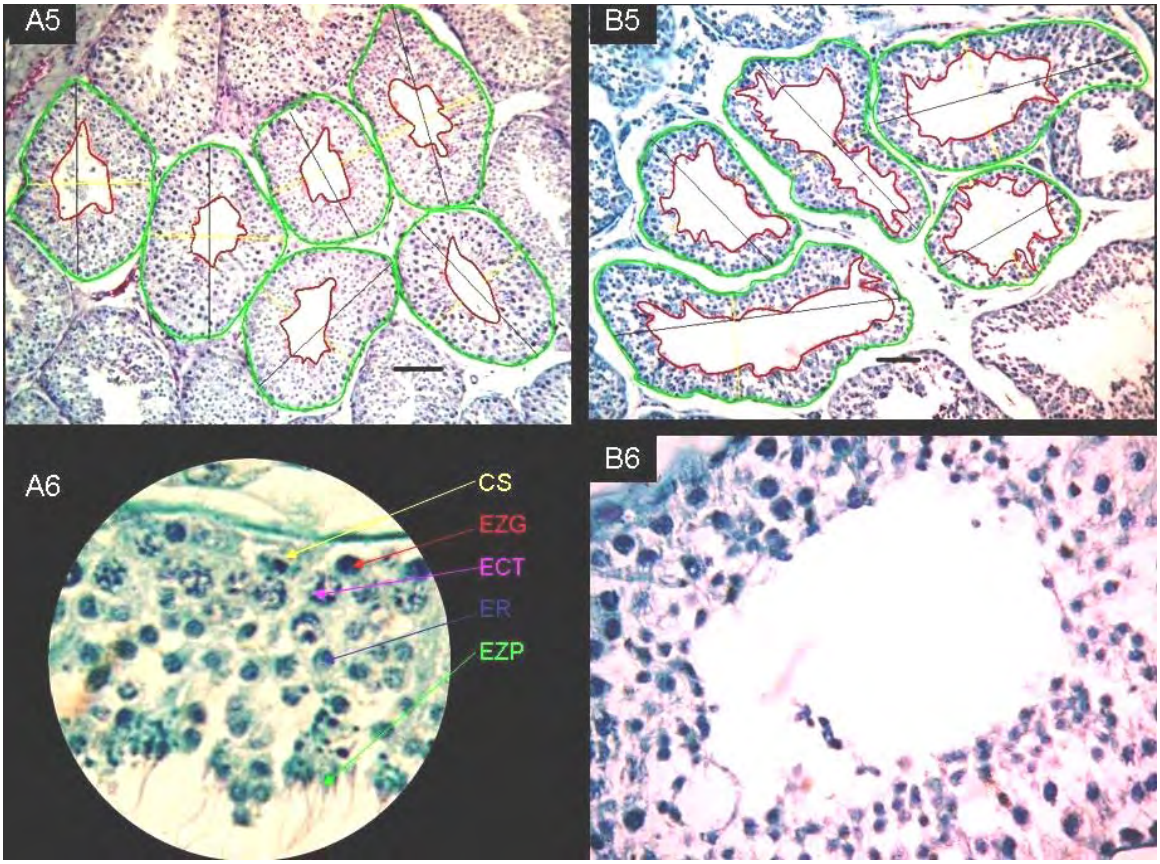


Figura 12.- Morfometría de túbulos seminíferos del grupo control y tratado con coumestrol.

A5 se muestra vista panoramica 10X de túbulos seminíferos del grupo testigo, se ha marcado los diámetros y perímetros, al igual que en B5 el cual corresponde a un epitelio de los animales tratados (barra=100µm).

A6 se distinguen los diferentes tipos celulares del epitelio germinal de los animales testigo: Células de Sertoli (CS), espermatogónia (EZG), espermatocíto (ECT), espermátide redonda (ER) y espermatozoides (EZP), comparados con B6 del grupo tratado.

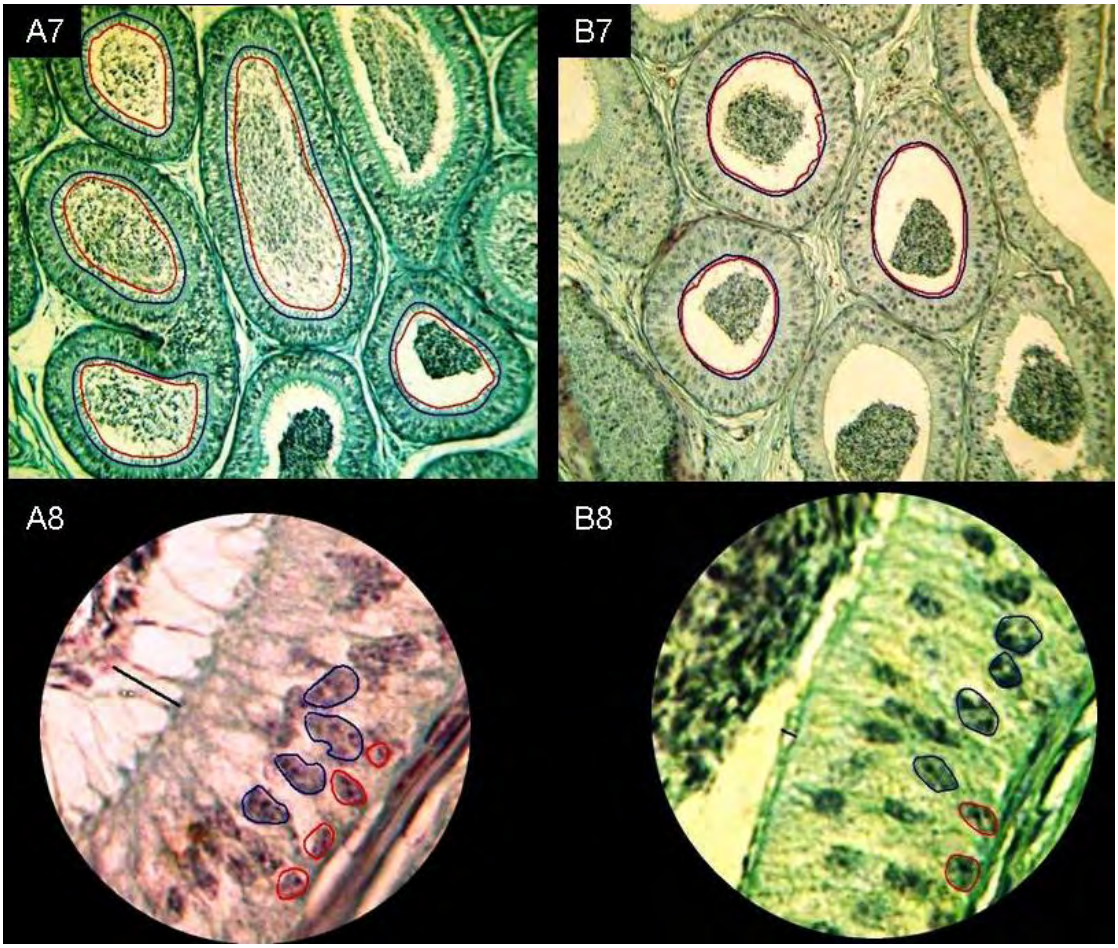


Figura 12.- Morfometría de túbulos seminíferos del grupo control y tratado con coumestrol.

En las fotos A7 (testigo) y B7 (tratado) se han marcado las áreas que ocupan las micro vellosidades (estereocilios). En A8 (testigo) y B8 (tratado) se muestran microfotografías con amplificación donde se marca la longitud de las micro vellosidades donde se nota la disminución de las mismas en el epitelio del lumen del epidídimo, de la misma manera se identifican en rojo las células básales y en azul las células cilíndricas altas.

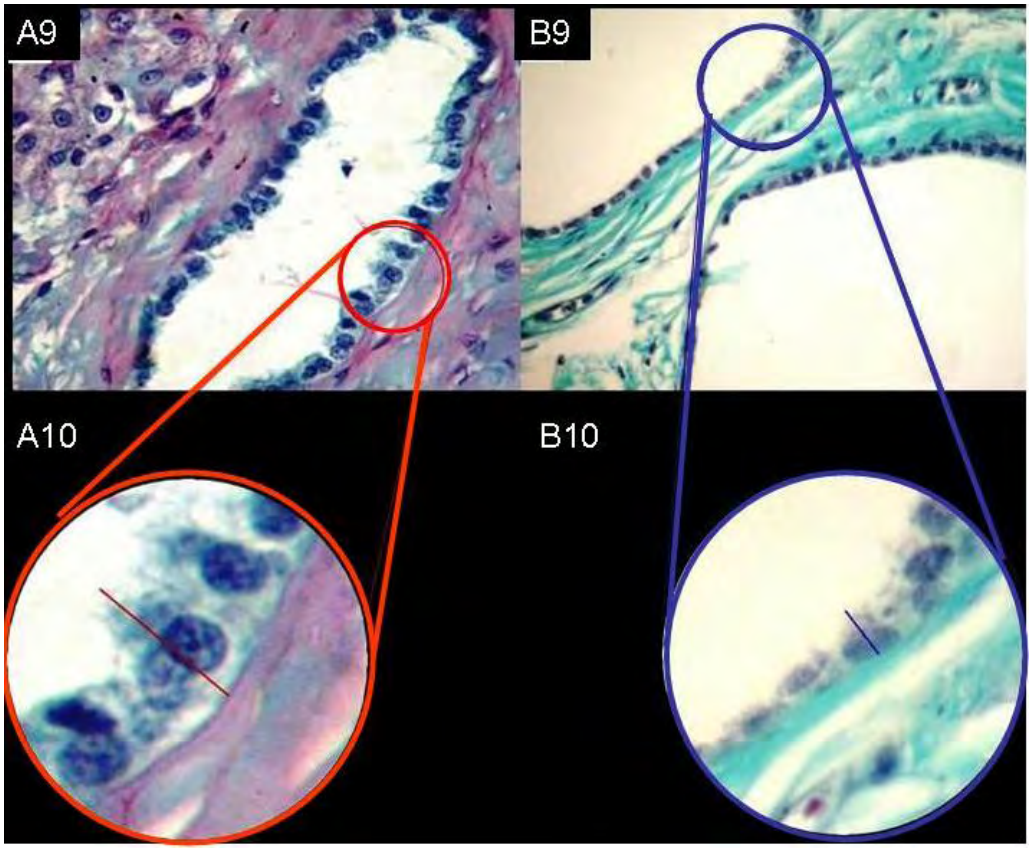


Figura 14. Epitelio de los túbulos aferentes de un perro del grupo testigo y uno del grupo tratado..

En la cuadro A9 se muestra el epitelio de los túbulos aferentes de los animales del grupo testigo (40X), en A10 se muestra en gran aumento (100X) se evidencia la presencia de cilios. En la cuadro B9 que corresponde al grupo tratado con coumestrol se nota disminuido el grosor del epitelio y la longitud de los cilios en B10.

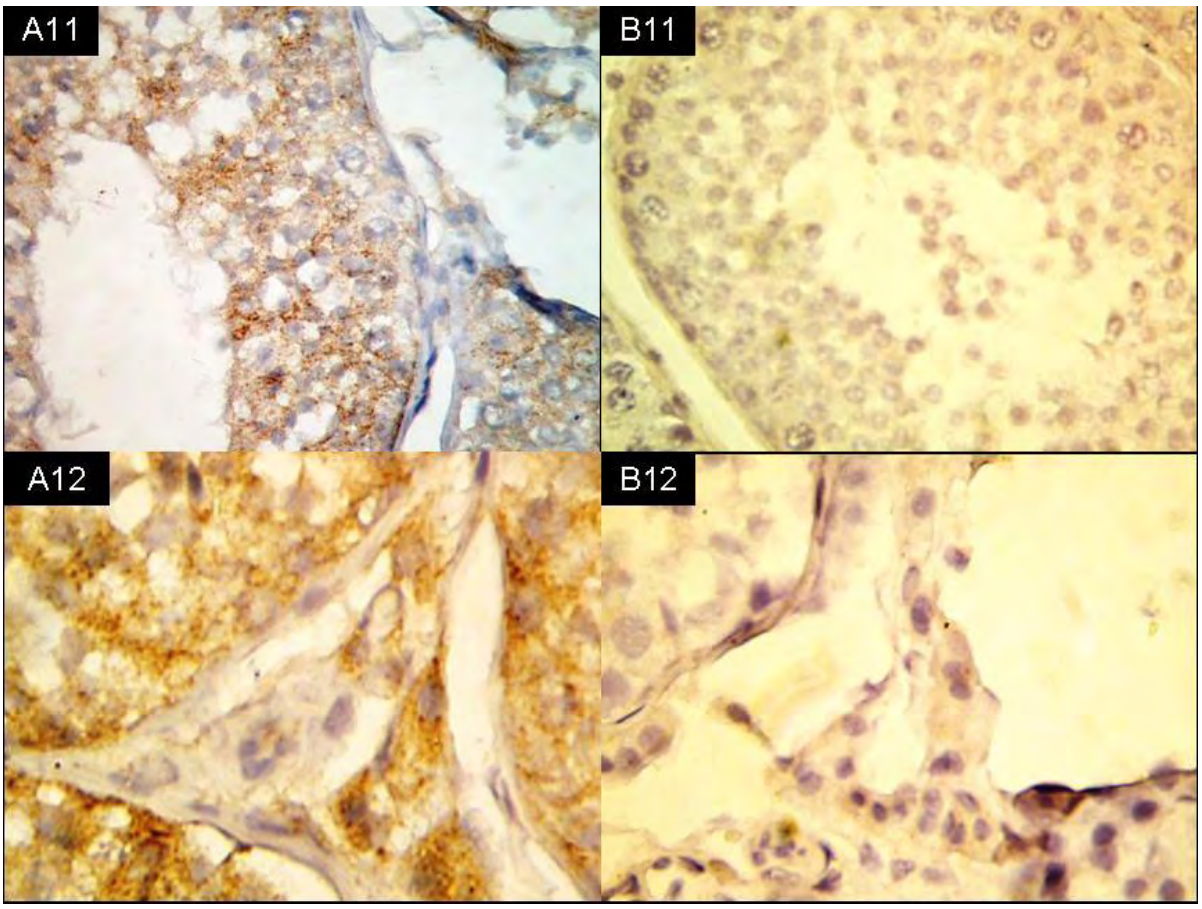


Figura 15. Detección de receptores estrogénicos en testículo de perro mediante inmunohistoquímica. Microfotografía de túbulo seminífero y espacio intersticial A11 en la cual se detecta fuerte señal de receptores estrogénicos (puntilleo café) a lo largo de todo el epitelio germinal, la cual se compara con el control negativo B11 en los que no se detecta señal. En A12 se detecta presencia de receptores estrogénicos en las células intersticiales de Leydig, contrastado con la nula señal el las mismas células en el control negativo B12.

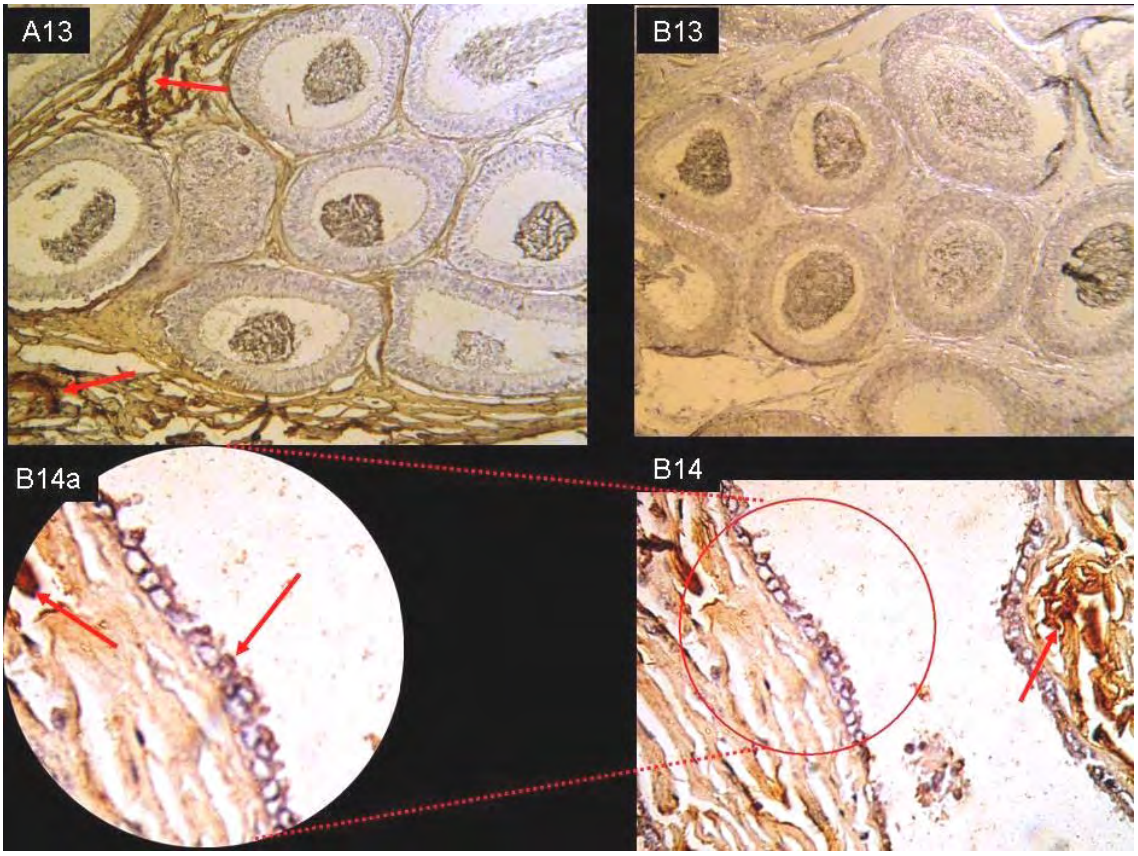


Figura 16.- Detección de receptores estrogénicos mediante inmunohistoquímica en epidídimo y conductos aferentes:

Se observa fuerte señal (colores sepia) en el tejido conectivo del epidídimo de los animales del grupo tratado (cuadro A13) mientras que en la imagen del control negativo B13 no se detecta señal en el tejido. En B14 se observa fuerte señal para receptores estrogénicos en el epitelio y tejido peri tubular de los túbulos aferentes.

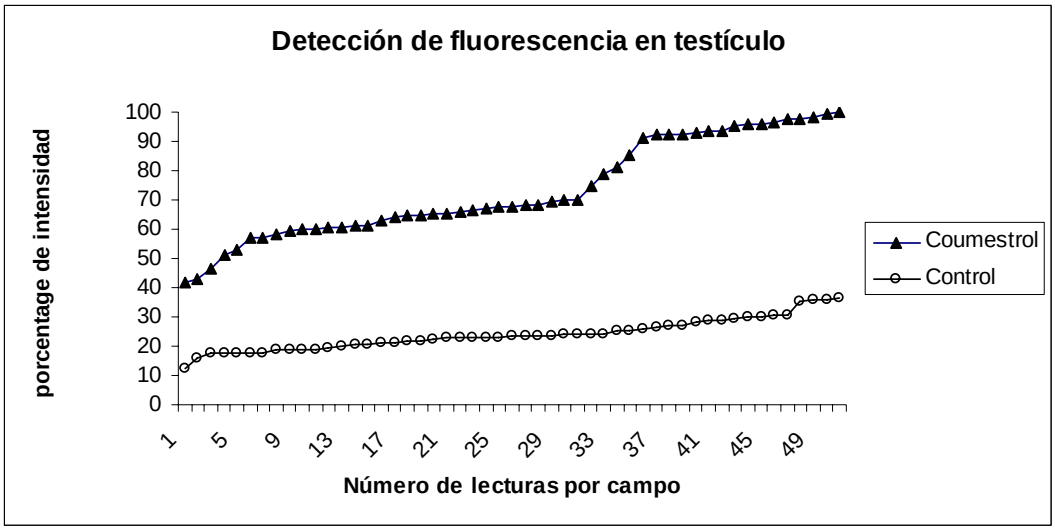


Figura 17.- Intensidad de señal fluorescente en testículos de perros tratados y no con coumestrol.

Los testículos del grupo tratado fluorescieron de manera significativa comparados con los del grupo testigo ($P<0.001$).

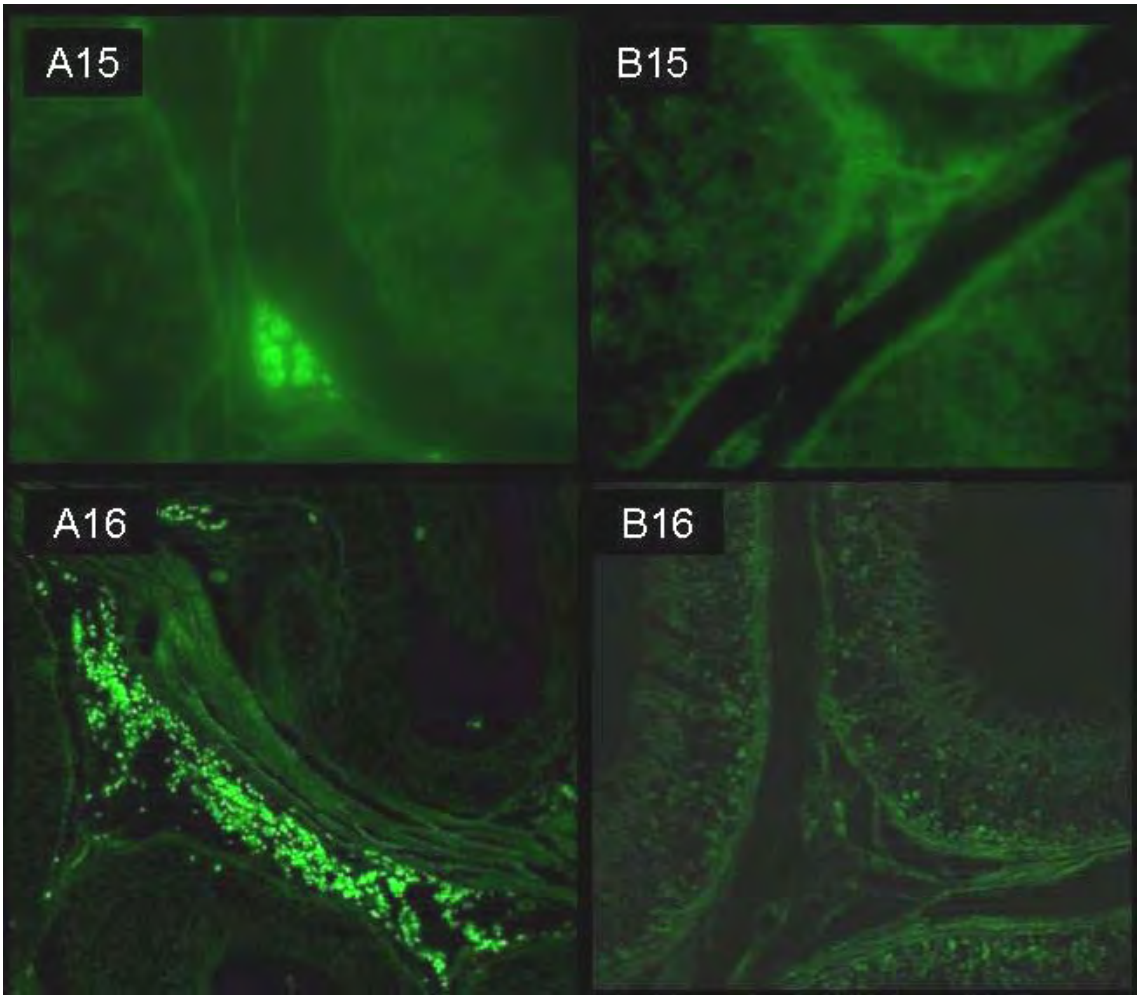


Figura 18.- Detección de receptores estrogénicos unidos a coumestrol en túbulos seminíferos y epididimo de perro mediante autofluorescencia.

La fluorescencia que emite el coumestrol unido al receptor estrogenito se observa en las células de Leydig en el testículo de cuadros A15, comparado con testículo de un perro del grupo testigo, donde únicamente se observa el fondo celular B15, de manera similar se observa señal fluorescente en el tejido conectivo del epidídimo de la muestra del grupo tratado A16 contrastado con la señal negativa de la muestra del grupo testigo B16.

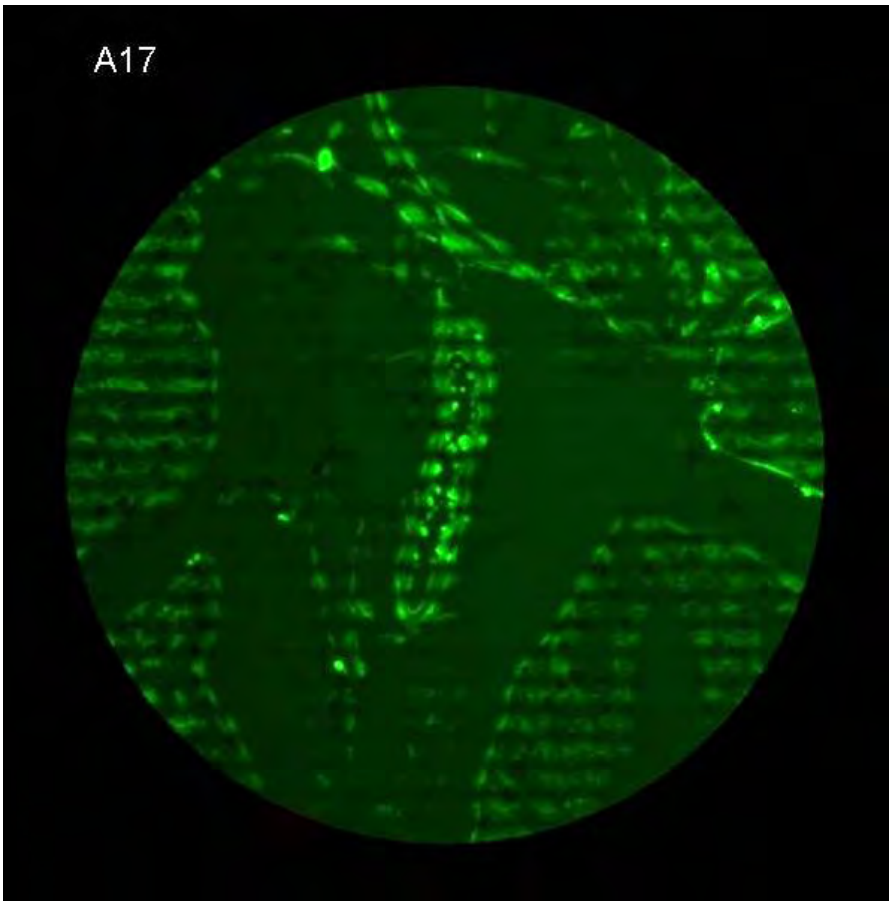


Figura 19.- Detección de receptores estrogénicos unidos a coumestrol mediante autofluorescencia en conducto aferente en perros tratados.

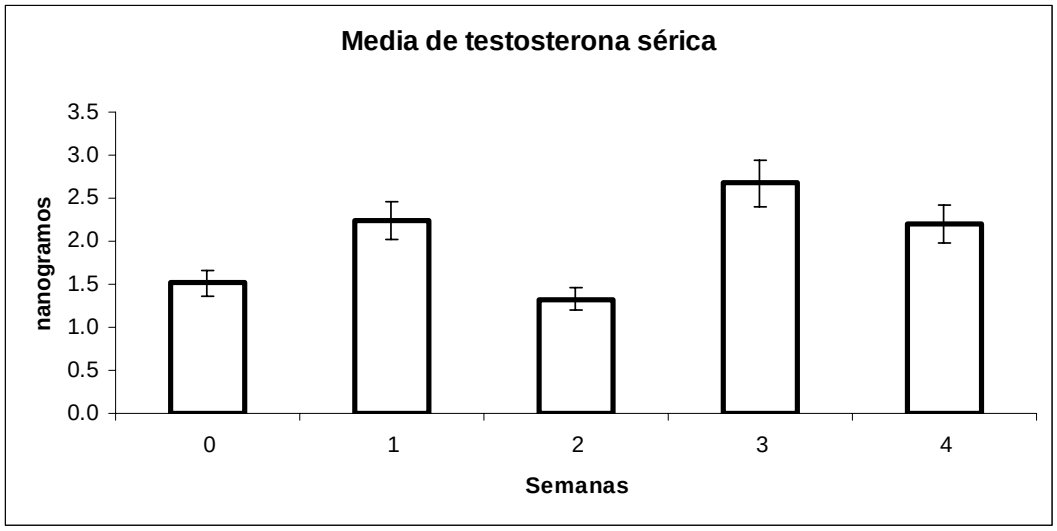


Figura 20.- Valores de testosterona sérica de los animales del grupo tratado con coumestrol.

Los valores de la testosterona se mantuvieron sin cambios estadísticamente demostrables durante el tiempo de tratamiento ($P>0.05$).

ANEXOS

Artículos publicados y/o aprobados

VNIVERSIDAD NACIONAL AVFNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

REVISTA VETERINARIA MÉXICO

SR. (S) DR. (S)
JUAN JOSÉ PÉREZ -RIVERO
JOSÉ JUAN MARTÍNEZ -MAYA
MARIO PÉREZ -MARTÍNEZ
ÁLVARO AGUILAR- SETIÉN
HÉCTOR SERRANO

Estimados Doctores:

Informamos a ustedes que su artículo **"Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral "** ha sido aceptado en principio para su publicación en la Revista "**Veterinaria-México**".

Adjuntamos los comentarios que el Comité Editorial hizo a su **Artículo**, el cual agradeceremos a ustedes se sirvan devolver debidamente corregido con **un original y dos copias** para una revisión final, en caso de no estar de acuerdo con algún comentario, remitir por escrito el motivo. Le(s) rogamos considerar la rapidez de su respuesta, lo que contribuirá a la pronta decisión de la publicación del artículo. **Asimismo, se les informa que tienen 20 días naturales para entregar sus correcciones. De no respetar este lapso, el artículo deberá ingresar nuevamente a la Revista con otra fecha de recibido.**

Sin otro particular y en espera de la devolución de su artículo lo antes posible, reciban un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
Cd. Universitaria, D.F., 2 de abril de 2008
DIRECTOR TÉCNICO DE LA REVISTA

MVZ. RAYMUNDO MARTÍNEZ PEÑA

NOTA: FAVOR DE DEVOLVER SU ARTÍCULO REVISADO POR NOSOTROS.
Enviar CD-ROM en word p/windows de su estudio ya corregido sin ninguna otra información en el disco y notificar en qué programa están los cuadros, gráficas o figuras que existan en el mismo.
Se informa a los autores que a partir del 2002, esta revista es publicada totalmente en versión bilingüe, (español e inglés) por lo que se deberá enviar todo manuscrito primeramente en español, preparado con base en las **Instrucciones a los autores**, para ser sometidos a consideración del Comité Editorial. El proceso de revisión será como hasta hoy. Los manuscritos ya aceptados deberán ser traducidos al inglés. **Vet. Méx.** cuenta con un equipo profesional para este fin, con el que podrán contactar los autores que así lo deseen, quienes cubrirán el costo de este trabajo. Aquellos que decidan enviar las dos versiones (español-inglés), podrán hacerlo una vez que su artículo **haya sido aceptado**.

C.c.p. Archivo

*RMP*ggm*

Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510, México, DF
Tels.: 5622 5875 y 5622 5918 Fax: 5622 5918
rmp@servidor.unam.mx

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

México D.F. a 28 de mayo de 2008

Dr. Raymundo Martínez Peña
Director Técnico de la Revista Veterinaria México
P R E S E N T E

Estimado Dr. Martínez Peña

Por este conducto nos permitimos enviar la versión corregida de nuestra comunicación

EFECTO DEL COUMESTROL SOBRE LA PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA Y LA CONDUCTA DE EXPLORACIÓN OLFATORIA DE PERROS ESTIMULADOS CON MOCO VAGINAL ESTRAL.

Como se puede ver en el documento anexo, se hicieron las correcciones editoriales que se sugirieron. Para las opiniones y observaciones de los revisores, se ha tomado especial cuidado en seguirlas. Sin embargo, como encontramos contradictoria la opinión del revisor 1312, hemos hecho caso al cambiar el tipo de gráfica quedando ahora como histograma con líneas de desviación estándar, como primeramente lo propuso este revisor. Creemos que incluir las figuras en una sola tabla no permitiría hacer una evaluación e integración adecuada de los resultados que queremos resaltar.

Queremos felicitar el excelente trabajo de los revisores pues gracias a sus sugerencias, la calidad, claridad y apreciación de nuestro comunicado aumenta sustancialmente. Sin más por el momento, nos reiteramos a sus distinguidas órdenes para cualquier comentario, aclaración o ampliación,

Atentamente

Dr. Héctor Serrano
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Av. San Rafael Atlixco 186 C.P. 08340
Teléfono 58 04 47 33.
Correo electrónico: hser@xanum.uam.mx

U.N.A.M.
FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA
8 MAY 28 18:33
REVISTA
VETERINARIA
MEXICO

Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral

Juan José Pérez-Rivero[*,**], José Juan Martínez-Maya[**], Mario Pérez-Martínez[***], Álvaro Aguilar-Setién[†], Héctor Serrano [‡]

Abstract

Dog overpopulation is a major health problem in developing countries due to the existence of some zoonotic diseases in which dogs act as reservoirs, besides the aggressive events to humans. Distribution, behavior patterns and combined methodologies are needed aspects in the design of successful dog population control programs. Coumestrol is a phytoestrogen which induces alterations in the reproductive male system, when bind to alpha and beta estrogen receptors acting as an agonist or antagonist fashion. Both receptor types also exist in central nerve regions governing sexual behavior of those animals such as the preoptic area, ventro medial nucleous, the amigdala and the olfactory bulb. In this study, 300 μg/kg coumestrol was orally administered to male dogs, once a week for a 4 week period. Dogs were freed for 5 min in a 9 m^2 area having a recipient containing vaginal discharges from estrous dog females and other similar vessel containing sterile saline solution. Smelling latency time for each recipient, smelling frequency and territory

Recibido el 8 de enero de 2008

[*] Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F.

[**] Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F.

[***] Departamento de Morfología, Laboratorio "Rosa Emilia Lavielle" de Biología Tisular de la Reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F.

[†] Unidad de Investigación Medica en Inmunología, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Medico Nacional Siglo XXI, Hospital de Pediatría. Avenida Cuauhtemoc 330, 06720, México D.F.

[‡] Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, La Purisima 09340 México D.F., Tel.: 5804-4733, Fax: 5804-4727, Correo electrónico: hser@xanum.uam.mx

Nota: Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor

marking in response to stimulus, was recorded. At the end of the test, semen was collected and evaluated. A significative difference ($p<0.005$) in smelling latency time and smelling frequency to the vaginal discharge was found; sperm count decreased from 518.4 ± 215.4 $x10^6$ to 57.6 ± 50.4 $x10^6$ at week 4 and the abnormal sperm morphology increased from 14.7 ± 3.3 % at 0 week to 60.0 ± 20%. In conclusion, 300 μg/kg coumestrol given orally to male dogs for 4 weeks induces alterations in the olfactory behavior along with an oligo and teratospermic effect.

Keywords: OLFACTORY EXPLORATION, COUMESTROL, DOGS, SPERM PRODUCTION, VAGINAL MUCUS.

Resumen

La sobrepoblación canina es un problema importante de salud pública debido a la transmisión de enfermedades zoonóticas y las agresiones hacia el humano. En el diseño de programas para controlar la población canina se requiere del conocimiento de su distribución, comportamiento y metodologías combinadas para tener éxito. El coumestrol es un fitoestrógeno que induce alteraciones en el aparato reproductor de los machos al unirse a los receptores estrogénicos alfa y beta, en donde actúa de manera dosis dependiente como agonista o antagonista. Estos receptores también existen en las estructuras del sistema nervioso que regulan el comportamiento sexual, como la región preoptica, núcleo ventro medial, la amígdala y el bulbo olfatorio. En este estudio se administró coumestrol (300μg/kg) por vía oral a perros machos, una vez por semana durante cuatro semanas; los perros se colocaron por 5 minutos en un área aislada de 9 m^2 en donde se colocó un frasco conteniendo secreciones vaginales obtenidas de perras en estro y otro con solución salina estéril. Se registró el tiempo de latencia de los perros para olfatear cada frasco, su frecuencia de respuesta y la frecuencia con que se presentó conducta de marcaje en respuesta al estímulo. Una vez concluido el experimento se obtuvo

semen y se evaluó. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.005$) en el período de latencia y frecuencia con la que el macho se acercó a oler las secreciones vaginales y el conteo espermático disminuyó de 518.4 ± 215.4 X 10^6 al inicio del estudio a 57.6 ± 50.4 X 10^6 en la semana 4 y el porcentaje de anormalidades espermáticas aumentó de 14.7 ± 3.3 % en la semana "0" a 60.0 ± 20.0% la semana cuatro. Se concluye que el tratamiento de perros con coumestrol durante cuatro semanas ocasiona alteraciones en la conducta de exploración olfatoria y tiene un efecto oligospérmico y teratospérmico.

Palabras clave: EXPLORACIÓN OLFATORIA, COUMESTROL, PERROS, PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA, MOCO VAGINAL.

Introducción

Los perros son una especie prolífica con características reproductivas particulares. Se ha estimado que en seis años una perra y sus crías tienen el potencial para producir 67 mil nuevos perros[1,2] en este contexto la sobrepoblación de perros que deambulan libremente en la calle constituye un problema de salud pública como en la Ciudad de México. [3]

Los riesgos que implica la sobrepoblación canina estriban en que esta especie padece varias enfermedades de tipo zoonótico, como rabia, [4] leptospirosis, [5] y distintas parasitosis[6]. Los perros pueden en ocasiones transmitir este tipo de enfermedades al humano, ello aunado a los casos de agresiones físicas que en ocasiones inflingen, en las que los niños son afectados con mayor frecuencia. [7,8]

La elaboración de programas de control de la población de perros callejeros requiere del conocimiento de su distribución, patrones de comportamiento, así como del empleo de metodologías combinadas para lograr dicho objetivo con éxito.

Además de la esterilización quirúrgica en ambos géneros y la inyección intratesticular de diferentes agentes químicos, las estrategias para poder controlar la

función reproductiva de esta especie incluyen el uso de diferentes preparaciones proteicas de la zona pelúcida porcina, [9] de la hormona liberadora de gonadotropinas o incluso de las propias gonadotropinas. [10] Actualmente se estudia el uso de algunos fitoestrógenos para el control reproductivo en especies silvestres. [11] En este sentido dentro de la lista de fitoestrógenos conocidos, el coumestrol parece tener efectos prometedores.

El coumestrol (COU) es un fitoestrogeno perteneciente a la familia de los coumestanos, se encuentra en plantas como la alfalfa (*Medicago sativa*) y en el germen de soya.[12] El coumestrol (68.8 mg/kg de alfalfa seca) altera el aparato reproductor de bovinos y ovinos, [13] presentándose en hembras folículos hemorrágicos, útero turgente, retención placentaria y disminución de la libido en los machos. [14]

Además, se ha notificado que el coumestrol administrado en dosis de 100 μg/g en la dieta, afecta el desarrollo neuroendocrino de ratas lactantes en ambos sexos. En hembras adultas en lactancia, es posible inducir con varias exposiciones orales un síndrome anovulatorio. Los efectos aditivos del coumestrol se han observado cuando ingresan por vía oral y no por la vía parenteral, esto último a consecuencia de la prolongada vida media de eliminación. Yamada (1999) propone que este compuesto sufre modificaciones en su estructura donde intervienen bacterias residentes en el tracto digestivo, procesos de absorción y reabsorción en el hígado, transporte en arterias y venas para su acumulación y desecho en la orina. [15] En machos se ha informado que ocasiona una disminución importante de peso y de la libido. [16,17]

El COU se une a los receptores estrogénicos beta (ERß) con mayor afinidad que el 17β estradiol así como a los receptores estrogénicos alfa (ERα) con menor afinidad y tiene efectos agonístas o antagónicos sobre ambos receptores, dependiendo de la dosis administrada. [18]

Asimismo, los ERß se expresan en diferentes regiones en el testículo asociados con la espermatogénesis, como lo son los conductos eferentes, epidídimo y conductos deferentes, además de la próstata. [19] Igualmente, se ha demostrado su expresión y acumulación en sitios relacionados con el comportamiento como la región preóptica, implicada en la conducta sexual del macho, además del núcleo ventromedial, la amígdala y el bulbo olfatorio (BO), que intervienen en la modulación de la excitación sexual. [20,21]

El sistema olfatorio de los mamíferos tiene la capacidad de detectar diferentes moléculas[22] por medio de los sistemas quimiosensoriales, como las feromonas. Estas sustancias son secretadas hacia el exterior de un individuo y son captadas por un segundo individuo de la misma especie, en el que inducen una conducta especifica,[23] por ejemplo la inducción del reflejo de Flehmen en muchas especies de rumiantes. [24] Esa misma señal es captada por diversos sistemas quimiosensoriales, como el epitelio olfativo principal, el cual, está formado principalmente por neuronas sensoriales olfatorias ciliadas, cuyas proyecciones llegan al BO y al órgano vomeronasal. [25,26]

La capacidad de los perros para detectar y asociar olores específicos está bien documentado [27-29] incluso desde el nacimiento pueden asociar olores de los alimentos a los que su madre fue expuesta durante la gestación. [30] La detección de feromonas no es la excepción, éstas contienen elementos volátiles de bajo peso molecular, capaces de ejercer una acción atrayente desde distancias considerables a los machos hacia las hembras en celo, estimulando la conducta de monta. [23]

A partir de las secreciones de moco vaginal de las hembras en estro, se ha podido aislar una feromona identificada químicamente como metil p-hidroxibenzoato la cual es capaz de atraer sexualmente a perros machos. [31,32]

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del COU administrado por vía oral sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal de perras en estro.

Material y métodos

Las secreciones vaginales se obtuvieron a partir de cinco perras mestizas en estro, previo diagnóstico de su estado fisiológico por citología vaginal exfoliativa [31,32] Para este fin se colectaron durante tres días con hisopos estériles las secreciones contenidas en el vestíbulo vaginal de las perras, las puntas de algodón impregnadas se depositaron en frascos viales estériles que se mantuvieron cerrados a -20ºC, hasta que fueron usados para el experimento.

La evaluación del efecto de las secreciones vaginales se realizó de acuerdo con el criterio descrito por Goodwin *et al.* [33] El experimento se realizó utilizando cinco perros mestizos clínica y reproductivamente sanos de 1.5 a 3 años de edad y con un peso promedio de 10.1 ± 3.3kg. En estos machos se verificó la ausencia de anticuerpos contra *Brucella canis* mediante la prueba de aglutinación en placa. Durante el experimento, los machos fueron alojados de manera individual en instalaciones con suficiente espacio para hacer ejercicio, con agua y alimento de tipo comercial *ad libitum*. A todos los perros se les proporciono un juguete para morder con el fin de enriquecer su medio ambiente. [34]

Antes de recibir el tratamiento con COU, se determinaron en los perros los parámetros a evaluar en el estudio: a este periodo se le consideró la semana cero de tal manera que cada perro fuera su propio control y así compararlo con el efecto del tratamiento durante el tiempo del experimento. De esta manera los valores notificados durante la semana cero corresponden a los perros sin tratamiento. A todos los animales se les administró por vía oral una dosis semanal de 300µg/kg de COU, durante cuatro semanas.

Los experimentos se efectuaron en una habitación vacía y limpia de 9 m^2. En ésta se colocaron en el suelo y equidistantes al único acceso, dos frascos de cristal con tapas perforadas a una distancia entre ellos de tres metros, fijados al piso con cinta adhesiva; uno de los frascos contenía las secreciones vaginales y el otro frasco solo incluía puntas de algodón humedecidas con solución salina estéril (SSE).

Una vez por semana cada perro fue colocado en el cuarto de evaluación durante cinco minutos, tiempo en que se observó y se registró con un cronómetro la latencia de respuesta la cual se definió como el tiempo que tardó cada animal en manifestar interés por explorar olfatoriamente el contenido de los recipientes y el número de veces que se aproximó a cada uno de los dos frascos por mas de cinco segundos. Además, se registró el número de veces en que los perros orinaron, levantando la pata en el cuarto después de oler el contenido de alguno de los recipientes. Las evaluaciones individuales eran seguidas de limpieza de la habitación, con hipoclorito de sodio y ventilación por al menos dos horas antes de hacer la evaluación del siguiente perro.

Una vez concluido el experimento, mediante estimulación manual se colectó semen de cada perro en un cono colector de nailon [35]. En cada eyaculado se determinaron de manera manual, empleando un microscopio de contraste de fases y un hemocitómetro, los números totales de espermatozoides y de espermatozoides con alteraciones morfológicas [36,37].

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó un análisis de varianza de mediciones repetidas, comparando el número total de espermatozoides de cada perro durante las semanas del experimento; asimismo, se comparó el periodo de latencia, la frecuencia de respuesta de la conducta de exploración olfatoria así como del marcado de territorio con orina mediante prueba de Friedman de mediciones repetidas. Todo con las facilidades del programa de estadística SAS (SAS Institute, Cary, NC). [38,39]

Resultados

La frecuencia de olfateo del recipiente con las secreciones vaginales disminuyó significativamente durante la primera a cuarta semanas. Estos valores variaron de 2.6 ± 1.95 veces en la semana cero a 0.6 ± 0.55 en la semana cuatro ($P < 0.01$), De igual manera, la menor frecuencia de marcado de territorio con orina de los perros se observó en la cuarta semana, iniciando en 2 ± 0.63 veces y culminando en 0.4 ± 0.49 ($P<0.005$).
No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en las respuestas a la SSE durante el período de evaluación.

El tiempo de latencia de respuesta de los perros hacia las secreciones vaginales aumentó de manera significativa de la semana 1 a la 3 y se mantuvo en la semana 4. De la misma manera, aumentó la latencia al marcado con orina estando ésta al inicio en 0.54 ± 0.35 segundos y en la cuarta semana en 2.45 ± 2.35 minutos ($P < 0.005$).

Respecto al número total de espermatozoides eyaculados éste disminuyó de manera significativa ($P< 0.005$) al pasar de 518.4 ± 215.4 x 10^6 la semana "0" a 57.6 ± 50.4 x 10^6 hacia la semana 4. El porcentaje de espermatozoides que presentaron alteraciones en la morfología espermática pasaron de 14.7 ± 3.3 % en la semana cero a 60.0 ± 20.0 % en la semana cuatro ($P< 0.005$).

Discusión

Los estrógenos son esenciales para la espermatogénesis. En el modelo experimental de ratones deficientes a los ERα (ERαKO) se ha observado que son infértiles, debido a que el ERα está presente en los conductos deferentes, importantes para la reabsorción de fluidos provenientes de la red testicular. [40]

La capacidad del COU para unirse a los ERα y ERß es conocida.[41] En los perros, ambos tipos de receptores se hallan en los testículos, [42] por lo que este fitoestrógeno puede actuar sobre ellos dependiendo de la dosis que se administre, como antagonista estrogénico

sobre el Erα. Esta interacción induce un estado similar al del ERαKO en lo que se refiere a la reabsorción de fluidos a nivel de los conductos deferentes. Este efecto induce la reducción del número de espermatozoides que ingresan al epidídimo. Como consecuencia de la alteración de la dinámica de los fluidos, éstos se acumulan en los testículos dañando el epitelio germinal de los conductos seminíferos y, por ende, alteraciones en el desarrollo de los espermatozoides [40,43]. En este estudio no se efectuó la evaluación histopatológica de los testículos, sin embargo, al igual que lo informado por Hess y colaboradores[40], es posible que estas alteraciones sean la causa de la oligospermia y teratospermia observada en los animales del presente estudio.

Se ha demostrado la existencia de ERα en los núcleos ventromedial y preóptico medio del hipotálamo. Estas regiones anatómicas están relacionadas con el olfato y el comportamiento sexual. En ratones hembra se ha encontrado que el coumestrol antagoniza los efectos neuroendocrinos de los estrógenos a través del receptor estrogénico tipo α .[44]

El aumento en el período de latencia de respuesta a las secreciones vaginales, observado en el presente estudio, es similar al que se presenta en ratas tratadas con COU en la dieta.[16] La pérdida del comportamiento sexual en ratones se observa en los modelos experimentales ERαβKO, ello indica que ambos receptores se complementan para que el comportamiento sexual pueda llevarse a cabo.[21] La capacidad de unión del COU a ambos receptores y su acción antagónica hacia éstos puede estar relacionada con las alteraciones en la conducta de exploración olfatoria a las secreciones de moco cervical de hembras en celo que se encontraron en el presente estudio.

Además de las alteraciones en la respuesta a feromonas, en el presente estudio se observó que el tratamiento de perros con dosis de 300 µg/kg de COU durante cuatro semanas tiene un efecto oligospérmico y teratospérmico. En conjunto, los cambios etológicos y en las características morfológicas de los espermatozoides observados en este

estudio indica que potencialmente el uso de COU podría servir de base para el desarrollo de nuevas estrategias para el control de poblaciones de perros no domiciliados, como un producto que se administre por vía oral, interfiera con la respuesta sexual del macho, disminuya el conteo de espermatozoides eyaculados. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto del COU sobre otros aspectos de la fisiología y endocrinología del perro, para delimitar su utilidad para este fin y determinar sus posibles efectos secundarios.

Agradecimientos

El primer autor agradece al CONACYT la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado en Ciencias de la Producción y la Salud Animal.

Referencias

1. Faulkner LC. Dimensions of the pet population problem. J Am Vet Med Assoc 1975;166:477-478.
2. Pal SK. Parental care in free ranging dogs, *Canis familiaris.* Appl Anim Behav Sci 2005:90; 31-47.
3. Slater MR The Role of veterinary epidemiology in the study of free-roaming dogs and cats. Prev Vet Med 2001, 48, 273-286.
4. Acha PN, Szyfres B. Rabia. En: Organización Panamericana de la Salud. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol II 3ºed. Washington D.C.Organización Panamericana de la Salud. 2003: 351-383.
5. Aslantaş O, Özdemir V, Kiliç S, Babür C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. Vet Parasitol. 2005;129: 187-191.

6. Martínez-Barbabosa, Fernández PA, Vásquez TO, Ruiz HA. Frecuencia de *Toxacara canis* en perros y áreas verdes del sur de la Ciudad de México, Distrito Federal. Vet Méx 1998; 29:239-244.
7. Ozanne-Smith J, Ashby K, Stathakis VZ. Dog bite and injury prevention-analysis, critical review, and research agenda. Inj Prev. 2001; 7:321-326
8. Méndez GR, Gómez TM, Somoza AI, Liras MJ, Pais PE, Vela ND. Mordeduras de perro. Análisis de 654 casos en 10 años. An Esp Pediatr 2002; 56:425-429.
9. Serrano H, García-Suárez MD. Alteraciones en ovarios de perras por inmunización activa con proteínas de ovocito de cerdo. Vet Méx 2001; 32:221-224.
10. Sabeur K, Ball BA, Net TM , Ball H ,Liu KM. Effect of GnRH conjugated to pokeweed antiviral protein on reproductive function in adult male dogs, Reproduction 2003 125, 801-806.
11. Serrano H, Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setién A,de Paz O, Villa-Godoy A., Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytooestrogen. Reprod. Fertil. Develop 2007; 19: 470-472.
12. Murkis AL, Wilcox G, Davis R S. Phytoestrogens. J Clin Endocrinol Metab. 1998.83:297-303.
13. Adams NR. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and sattle. J. Anim. Sci. 1995; 73:1509-1515.
14. Romero-R CM, Tárrago C M, Muñoz M R, Arista RR, Rosado G A. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. Vet Méx 1997; 28:25-30.
15. Yamada T, Yamamoto A, Fujioka M, Miyagi M, Saito N, Imai I, et al. Characterization of urinari metabolites of a new benzafuroquiniline derivative 3,9-

bis(N,N-dimethylcarbamoyloxy)-5H-benzofuro (3,-2C)-quinoline-6-one (KCA-098), in dogs. Pharmazie 1999; 54:672-677.

16. Whiten PL, Lewis C, Russell E, Naftolin F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. Proc Soc Exp Biol Med 1995;208: 82-86.
17. Whiten PL, Russell E and Naftolin F. Influence of phytoestrogen diets on estradiol action in the rat uterus. Steroids 1994;59: 443-449.
18. Whitten PL, Patisaul B H.Cross-Species and interassay comparisons of phytoestrogen action. Environ Health Perspect. 2001.109:5-20.
19. Saunders PTK. Does estrogen receptor β play a significant role in human reproduction? Trends Endocrinol Metab 2005; 16:222-227.
20. Bodo C, Rissman EF. New roles for estrogen receptor β in behavior and neuroendocrinology. Front Neuroendol. 2006; 27:217-232.
21. Simpson ER ,Davis SR. Another role highlighted for estrogens in the male: Sexual Behavior. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97:14038-14040.
22. Filiarte J.C.,Millot J.L, Eckerlin A. Behavioural variability of olfactory exploration of the pet dog in relation to human adults. Appl Anim Behav Sci 1991; 30:341-350.
23. Manteca VX. Etología clínica veterinaria del perro y del gato. 1ª edición Barcelona: Ed. Multimedia. 2003.
24. Pérez-Martínez M, Martínez-Maya JJ, Olivera LJI. Evaluación de diferentes fluidos corporales de la vaca, como inductores del reflejo de Flehmen en toros Holstein. Vet. Méx 1999; 24:27-29.
25. Brennan PA, Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. Nature 2006; 444:308-315
26. Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. Nature.2001; 413:211-218.

27. Sommerville BA, Settle RH, Darling FMC, Broom DM. The use of trained dogs to discriminate human scent. Anim Behav 1993; 46:189-190.

28. Kiddy CA, Mitchell DS, Hawk HW. Estrus-Related Odors in Body Fluids of Dairy Cows. J Dairy Sci 1984; 67:388-391.

29. Kiddy CA, Mitchell DS. Estrus-related odors in cows: Time of occurrence. J Dairy Sci 1981; 67:267-271.

30. Wells DL, Hepper PG. Prenatal olfactory learning in the domestic dog. Anim Behav. 2006; 72:681-686.

31. Kustriz MVR. Reproductive behavior of small animals. Theriogenology. 2005; 64:734-746.

32. Schutte AP. Canine vaginal cytology-I. Technique and cytological morphology. J. Small Anim Pract. 1967;18, 301-306.

33. Goodwin M, Gooding KM, Regner F. Sex pheromone in the dog. Science. 1979; 203:559-561.

34. Hubrecht RC. A Comparison of social and environmental enrichment Methods for laboratory housed dogs. Appl Anim Behav Sci 1993;37:345-361

35. Kutzler MA. Semen collection in the dog. Theriogenology 2005; 64:747-754.

36. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson P. Semen collection, evaluation and preservation. In: Ed.Ray Kersey. Canine and Feline Theriogenology. W.B. Saunders Company. 2001:287-306.

37. Freshman JL. Semen collection and evaluation. Clin. Tech. Small. Anim. Pract. 2002; 3:104-107.

38. SAS Institute. SAS User's guide: Statistics. SAS Institute: Cary. N.C. 1985

39. Marquez MJ. Probabilidad y estadística para ciencias químico biológicas. 1ª edición México: McGraw-Hill, 1995

40. Hess RA, Bunick D, Bahr,J . Oestrogens, its receptors and function in the male reproductive tract- a review. Mol and Cell Endocrinol 2001; 178:29-38.

41. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Phytoestrogens. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:297-303.

42. Nie R, Zhou Q, Jassmin E , Saunders PT, Hess RA .Differential expression of estrogen receptors α and β in the reproductive tracts of adults male dogs and cats. Biol Reprod 2002; 66:1161-1168.

43. O´Donnell L, RobertsonKM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and espermatogenesis. Endoc Revi 2001; 22:289-318.

44. Jacob DA, Temple JL, Patisaul HB, Young LJ, Rissman EF. Coumesrtrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor α. Exp Biol Med 2001; 226:301-306.

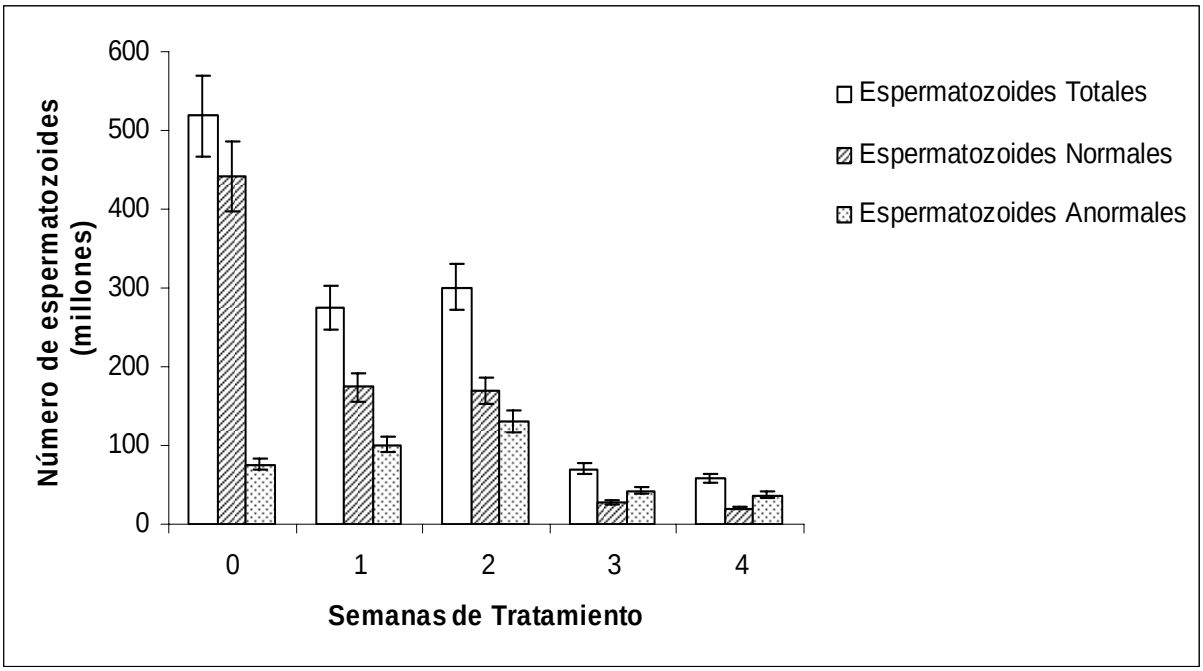


Figura 1. Frecuencia de exploración olfatoria de perros tratados con coumestrol.
Perros adultos clínicamente sanos se retaron contra recipientes conteniendo secreciones cervicales de hembras en estro (probando) o solución salina (SSE). Los valores al inicio del estudio se consideraron como valores básales. De la semana 1 a 4 se administró por vía oral a cada perro una dosis/semana (300 µg/kg), durante cuatro semanas. Cada barra representa el promedio de las mediciones de los cinco animales ± DE.

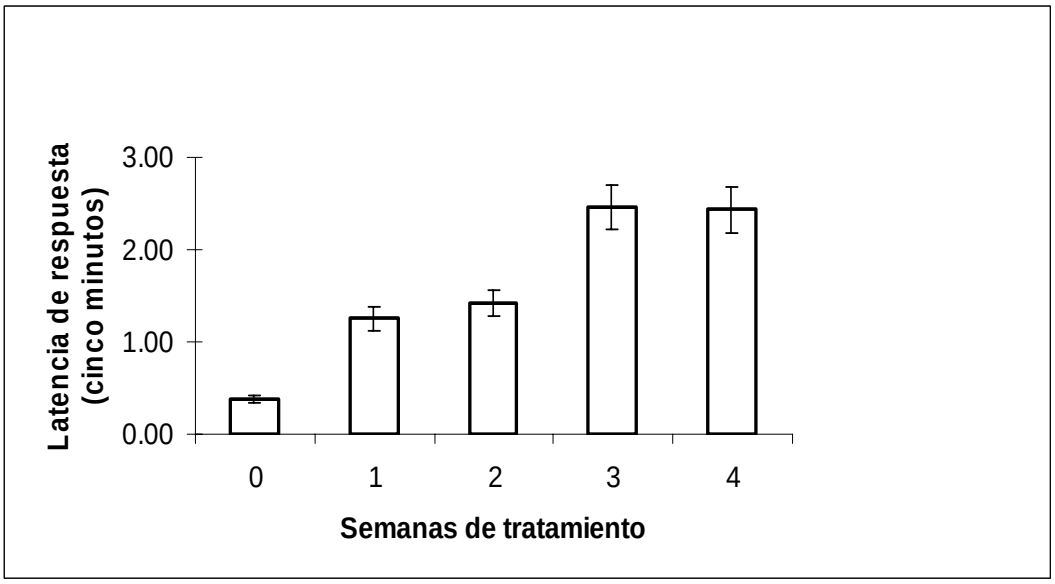


Figura 2. Latencia de respuesta olfatoria de perros tratados con coumestrol a secreciones vaginales de perras en estro. Cinco perros machos fueron retados contra recipientes conteniendo secreciones vaginales de perras en estro (probando) o solución salina. Se muestra el tiempo que tardaron en acercarse y olfatear el frasco conteniendo las secreciones vaginales. Cada barra representa el promedio de los animales utilizados ± DE. El mayor tiempo de latencia se alcanzó en la tercera semana del experimento ($P < 0.005$).

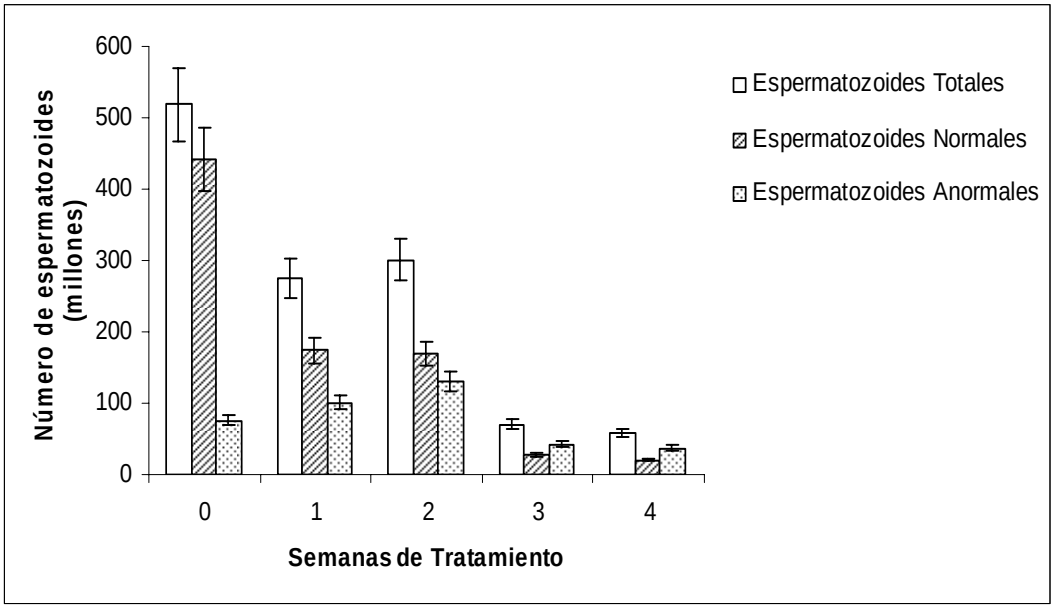


Figura 3. Número total de espermatozoides en eyaculados obtenidos de perros tratados con coumestrol. Cinco perros clínicamente sanos se eyacularon después de hacer la evaluación conductual. Se determinó el número total de espermatozoides y el de los espermatozoides con alteraciones morfológicas. Cada barra corresponde al promedio de los cinco animales ± DE.

Figura 4. Morfología de los espermatozoides en eyaculados obtenidos de perros tratados con coumestrol. Cabeza de flama (1), Nudo proximal (2), Cola doblada (3), espermatozoide normal (4), la flecha señala una gota proximal.

REVISIÓN

LOS FITOESTRÓGENOS Y EL EFECTO DE SU CONSUMO EN DIFERENTES ÓRGANOS Y SISTEMAS DE ANIMALES DOMÉSTICOS

Phytoestrogens consumption and their effects in different organs and systems of domestic animals

Juan Pérez-Rivero[1], Álvaro Aguilar-Setién[2], José Martínez-Maya[1], Mario Pérez-Martínez[1] y Héctor Serrano[3]*

A B S T R A C T

Phytoestrogens are plant-derived compounds having similar effects to estrogens. Several phytostrogen groups have been identified being the most characteristics the isoflavones like genistein, coumestans like coumestrol, and lignans represented by the enterolactone. Depending on the doses, they can act as agonists or antagonists of steroidal hormones. This apparently bimodal function is due to their capacity to interact with the alpha form of the estrogen receptor (ERα) in several organs of the female reproductive tract and to the beta form ERβ present in prostate, testis, ovaries, limph nodes and brain regions. It has been observed that an increase in genistein or coumestrol induces an increase in haemorrhagic follicles, miscarriages, LH-FSH surge suppression and even estrogenic syndrome, whereas in males, induces alterations in testis development and a decrease in sperm count. In this review, a panoramic view of the actual research of phytostrogen impact on the reproductive function and perspectives mainly for domestic animals is presented.

Key words: coumestrol, genistein, estrogen receptors.

R E S U M E N

Los fitoestrógenos son substancias de origen vegetal con propiedades similares a los estrógenos. Se han identificado diferentes grupos de fitoestrógenos entre los que destacan las isoflavonas como la genisteina, los coumestanos como el coumestrol, y los lignanos representados por la enterolactona. Estos compuestos actúan como agonistas o como antagonistas de las hormonas esteroidales dependiendo de la dosis que se utilice. Esta acción aparentemente contradictoria se debe a su capacidad para unirse como ligandos a los receptores estrogénicos alfa (ERα) del útero, glándula mamaria, sistema cardiovascular y hueso, y con mayor afinidad a los receptores estrogénicos beta (ERβ) presentes en próstata, ovarios, testículos, tracto urinario, tejido linfoide y algunas regiones del cerebro como el hipotálamo. Se ha observado que a medida que se incrementa la dosis de genisteína y coumestrol, se inducen folículos hemorrágicos, abortos, síndrome estrogénico, y supresión de picos de hormona luteinizante (LH) en las hembras, mientras que en los machos se altera el desarrollo testicular y disminuye el recuento de espermatozoides. En esta revisión se presenta un panorama del estado actual de las investigaciones respecto a las implicaciones de los fitoestrógenos sobre la reproducción y sus perspectivas de estudio, poniendo énfasis en su importancia en los animales domésticos.

Palabras clave: coumestrol, genisteína, receptores estrogénicos

[1] Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, DF.
[2] Centro Médico Nacional Siglo XXI, Unidad de Investigación en Inmunología, México, DF.
[3] Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud, San Rafael Atlixco 186, México, 09340, DF, México.
E-mail: hser@xanum.uam.mx *Autor para correspondencia.
Recibido: 3 de marzo de 2006. Aceptado: 28 de junio de 2006.

INTRODUCCIÓN

Una de las metas en el manejo del ganado vacuno u ovino es generar, dentro de los márgenes posibles, el máximo rendimiento. Ocasionalmente, pueden presentarse problemas reproductivos cuya causa es difícil detectar. Una posibilidad es que no se trate realmente de un problema asociado al manejo reproductivo u orgánico, sino que sea sólo el reflejo de la presencia de compuestos que simulan el efecto de las hormonas esteroides y que involuntariamente se administran al ganado en el alimento. En esta revisión queremos hacer notar el papel que juegan los fitoestrógenos en este problema y la posible repercusión económica que implicaría su efecto sobre la reproducción.

Los fitoestrógenos son productos de origen vegetal con actividad natural bactericida y fungicida de patógenos vegetales (Pike *et al.*, 1999). Estos compuestos presentan una actividad similar a los estrógenos, a pesar de que la estructura química es bastante diferente (Figura 1). Existen tres grupos de estos compuestos: las isoflavonas, los coumestanos, y los lignanos, cuyos principales representantes son la genisteína (GEN), el coumestrol (COU) y la enterolactona, respectivamente (Whitten y Patisaul, 2001; Whitten *et al.*, 2002).

Una planta puede tener más de una clase de fitoestrógenos, por ejemplo, las semillas de soya (*Glycine* sp.), son ricas en isoflavonas, mientras que el

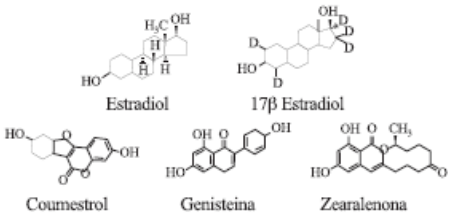


Figura 1. Estructura de diferentes compuestos con actividad estrogénica. Estructuras disponibles en http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/

Figure 1. Chemical structure of different estrogenic activity compounds. Structure drawings available at http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/

germen de soya es la principal fuente del coumestano (Murkies *et al.*, 1998). Asimismo, el COU también se encuentra en la alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Jacob *et al.*, 2001), y su concentración aumenta cuando se encuentra contaminada por el hongo *Pseudopeziza medicaginis* (Romero *et al.*, 1997). En las plantas, las isoflavonas GEN y daidzeina (DEZ) están presentes como glucósidos inactivos (Rosselli *et al.*, 2000).

La importancia de los fitoestrógenos radica principalmente en que pueden actuar como agonista o antagonista estrogénico (Whitten *et al.*, 2002), ya que al igual que los estrógenos, ejercen su influencia en tejidos donde existen receptores para estrógenos (ER), tanto en el macho como en la hembra (Rosselli *et al.*, 2000).

Como se sabe, los estrógenos favorecen la diferenciación celular y el crecimiento de las glándulas mamarias, útero, vagina, ovarios, testículos, epidídimo, próstata (Rosselli *et al.*, 2000), sistema vascular (Dubey *et al.*, 2000) y sistema nervioso (McGarvey *et al.*, 2001).

Las isoflavonas también se unen a los receptores para andrógenos (AR), no estando claro hasta el momento cuál es el mecanismo del efecto antiandrógeno de estos compuestos (Beck *et al.*, 2005).

Se ha observado en ratas que el consumo de 40 a 50 mg de GEN, equivalentes a los niveles séricos encontrados en humanos que consumen dietas ricas en isoflavonas, diminuye el número de los AR y los ER en la próstata. Así mismo, algunos fitoestrógenos como las isoflavonas se unen en forma débil a receptores para progesterona (PR) (Beck *et al.*, 2005).

Hasta el momento no se conoce plenamente el metabolismo de los fitoestrógenos. Respecto al COU, Yamada *et al.* (1999) proponen que este compuesto sufre modificaciones en su estructura, que van desde hidroxilaciones, desmetilaciones e incluso hidrólisis, por lo que se forman más de diez intermediarios, de los cuales algunos son detectados en la orina. Estas modificaciones incluyen algunas etapas donde intervienen bacterias residentes del tracto digestivo, procesos de absorción y reabsorción en el hígado, transporte en arterias y venas para su acumulación y desecho en la orina (Murkies *et al.*, 1998; Rosselli *et al.*, 2000).

Receptores estrogénicos

Como miembros de la superfamilia de receptores nucleares, los receptores estrogénicos (ER) tienen estructura modular (Figura 2). Se han identificado las isoformas α (ERα) y β (ERβ), que se distinguen por presentar diferencias en su secuencia de aminoácidos. Estos receptores presentan 96% de homologia de sus aminoácidos constituyentes, aunque no es una regla aplicable a todas las regiones del receptor, ya que la región de unión al ADN (DBD) es la que más similitud presenta, mientras que la región de unión al ligando (LBD) sólo presenta un 53% de similitud (Weihua *et al.*, 2003).

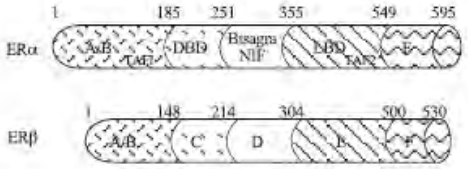


Figura 2. Estructura modular de los receptores estrogénicos (ER). Se representa la distribución que abarcan cada uno de los dominios de los receptores para estrógenos alfa (ERα) y beta (ERβ), como lo indican los números de residuos de aminoácidos colocados encima de cada uno. La región de unión al ADN (DBD) es la que se conserva más entre ambos receptores; la bisagra (D) contiene la secuencia de localización nuclear (NIF), el cual guia al receptor desde el citoplasma hacia el núcleo. La región de unión al ligando (LBD) es la menos conservada entre los dos receptores, este receptor tiene la región (F), caso único entre los receptores nucleares, la cual se encarga de diferenciar el efecto de agonista o antagonista cuando se une el ligando (Modificado de Pérez-Rivero *et al.*, 2005).

Figure 2. Modular structure of estrogen receptors (ER). The distribution of each domain of the alpha (ERα) and betta (ERβ) receptor type as indicated by the aminoacid residue number above the diagram, is shown. The DNA binding region (DBD) is the most conserved domain in α and β receptors; nuclear localization sequences are located in the hinge region (D) allowing the receptor travel to the nucleus. The less conserved region between the two ER types is the ligand binding domain (LBD). The F region is the most characteristic domain for ER and is absent in most nuclear receptors. The F domain is responsible for the agonist or antagonist effect induced by the bound ligand (Modified from Pérez-Rivero *et al.*, 2005).

Los estrógenos presentes en el plasma penetran a sus células blanco en los tejidos llamados "clásicos", que se encuentran en el útero, glándula mamaria, placenta, hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular y hueso. Las células blanco de estos tejidos presentan abundantes ERα (Mosselman *et al.*, 1996; Weihua *et al.*, 2003). Existen otros tejidos considerados "no clásicos", en los que la presencia de ERα es relativamente menor, pero que contienen cantidades significativamente mayores de ERβ. Entre estos últimos se incluyen próstata, ovarios, testículos, glándula pineal, glándula tiroides, paratiroides, suprarrenales y páncreas, vesícula biliar, piel, tracto urinario, tejido linfoide, tejido eritroide, pulmón, epitelio intestinal, y algunas regiones del cerebro, como el hipotálamo, cerebelo y lóbulo olfatorio (Jacob *et al.*, 2001). El tejido muscular estriado es único, puesto que en él se expresa de manera elevada el ERβ y está casi ausente el ERα (Mosselman *et al.*, 1996; Weihua *et al.*, 2003).

En células de la línea celular identificada en la American Type Cell Cultural Collection como T47D originada a partir de un tumor mamario, así como en diferentes tejidos como el prostático y el epitelio de la glándula mamaria, los estrógenos actúan en presencia del ERα como agonista, favoreciendo la proliferación de los tejidos. El ERβ actúa de manera antagonista, inhibiendo la proliferación del tejido, por lo que una misma hormona produce efectos opuestos, dependiendo del receptor al que se una (Imamov *et al.*, 2005).

Los ER son receptores nucleares que modulan la trascripción por su unión especifica a secuencias del genoma, así como a co-represores y co-activadores, para regular la acción del complejo de la ARN polimerasa. Los efectos moduladores de los ER sobre la trascripción se llevan a cabo en una serie secuencial de eventos. La unión de los ER con los estrógenos induce cambios en la conformación del receptor, que le permite al mismo tiempo disociarse de un complejo co-represor y unirse con un complejo co-activador, lo cual le confiere la actividad de trascripción de genes que contienen elementos de respuesta a los estrógenos (ERE). Por el contrario, en ausencia de estrógenos, los ER se asocian con los co-represores que inhiben la actividad de trascripción (Maniatis y Reed, 2002; Hewitt y Korach, 2003).

Se sabe que el coumestrol (3,9-dihidroxi-6h-benzofuro[3,2-c][1]benzo-piran-6-ona) se une al ERβ con una afinidad similar a la del 17β estradiol (Morito *et al.,* 2002), pero tres veces menos que el estradiol para el ERα (Kuiper *et al.*, 1998). La inducción de la trascripción es similar entre el COU y la GEN, uniéndose el coumestrol con mayor afinidad al ERα que la GEN, la cual lo hace preferentemente al ERβ (Morito *et al.*, 2002).

Las isoflavonas tienen poca afinidad por la hormona transportadora de esteroides (SHBG), ya que se han detectado fracciones libres que varían entre el 45 al 50% tanto de COU como de GEN en suero humano, mientras que solamente se ha encontrado el 4% de estrógenos libres (Whitten y Patisaul, 2001).

ACCIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS EN DIFERENTES ÓRGANOS Y SISTEMAS

En el cerebro el ERβ se expresa principalmente en el área preóptica, en el núcleo ventro-medial del hipotálamo y en el tallo cerebral. Estudios realizados en ratones hembras utilizando COU indican que éste antagoniza la acción del estradiol mediante la regulación del mARN para el ERβ en el núcleo paraventricular (Jacob *et al.*, 2001).

De manera similar, las isoflavonas GEN y DEZ tienen efectos en el núcleo paraventricular y ventromedial, áreas que regulan el comportamiento sexual y la secreción de gonadotropinas, induciendo cambios en los receptores para PR y en los ERβ (Whitten *et al.*, 2002).

Se ha atribuido principalmente al fitoestrógeno COU la capacidad de suprimir los picos de la hormona luteinizante (LH) en ratas (McGarvey *et al.*, 2001), y en ovejas (Jacob *et al.*, 2001). La presencia de los ERα y ERβ en las neuronas secretoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) abre la posibilidad que los fitoestrógenos actúen directamente sobre ellas (McGarvey *et al.*, 2001).

El sistema vascular expresa el ER en su forma α y β, al que los fitoestrógenos se unen con diferente afinidad, y ejercen su efecto biológico tanto en las células endoteliales como en las del músculo liso. Al respecto, se ha informado que la GEN inhibe la proliferación de las células endoteliales siendo capaz de inhibir las señales de transducción que están involucradas en trastornos vaso-oclusivos así como en los procesos de carcinogénesis/angiogénesis ejerciendo un efecto vaso protector (Dubey *et al.*, 2000).

Las isoflavonas tienen un efecto bifásico que favorece la formación de hueso cuando se encuentran en bajas concentraciones o la reabsorción del mismo cuando están presentes a altas concentraciones. Esto se ha demostrado en el modelo de roedores ovariectomizados a los que se les administraron bajas dosis de GEN (0,5 mg d^{-1}), lo que promueve la retención ósea, no así cuando se incrementa la dosis a 5 mg d^{-1}, debido a que el tejido óseo es más sensible a las isoflavonas que el útero. El ERα está presente en el hueso y es el encargado de mediar los efectos estrogénicos en el mismo. Sin embargo, cuando existen concentraciones micromolares de fitoestrógenos, las isoflavonas se unen preferentemente a los ERβ cuyo efecto es una función reguladora negativa en el tejido óseo. Este fenómeno puede explicar en parte este efecto bifásico. Sin embargo, el efecto antiestrogénico de las isoflavonas también se debe a la competencia entre los fitoestrógenos y los estrógenos para unirse a los ER (Dang y Lowik, 2005).

Los fitoestrógenos en el aparato reproductor

Se ha tratado de aprovechar el efecto de los fitoestrógenos con resultados poco alentadores. La premisa en la cual se basan estos estudios es que a través del uso de los fitoestrógenos es posible aumentar la frecuencia de estros en el ganado vacuno, lo que podría tener un impacto positivo en la producción de productos cárnicos o lácteos. Sin embargo, los resultados son totalmente diferentes. Así, en vacas Holstein que consumen 25 a 100 mg kg^{-1} de zearalenona por 42 días, muestran genitales externos edematosos, como si fuesen a presentar un estro fisiológico. Sin embargo, la duración del ciclo estral o el tiempo en el que se presenta permanecen inalterados (Mirocha *et al.*, 1978).

En el otro extremo, se ha reportado que el COU causa alteraciones reproductivas en hembras de diferentes especies (Cuadro 1). Los ratones hembra prepúberes de la cepa Swiss Webster que han sido alimentados durante cinco días con 20 g de alimento que contenga intencionalmente 90 mg kg^{-1} de coumestrol, presentaron edema uterino (Galey *et al.*, 1993). Por su parte, la administración de 100 μg de COU en ratones hembra de 1 a 5 días de nacidos produce cambios en los ovarios como es la presencia de folículos hemorrágicos y folículos poliovulares (Burroughs, 1995). En ratas Sprague-Dawley se encontró que el COU se une con afinidad similar al estradiol a los ER presentes en el útero (Branham *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Efecto de los fitoestrógenos en la fisiología reproductiva de especies experimentales y de importancia zootécnica.
Table 1. Phytoestrogen effects on reproductive physiology in experimental and zootechnical important species.

Animal	Edad	Sexo	Fitoestrógeno	Dosis y vía	Efecto	Referencia
Rata Wistar	2 días	M	Coumestrol	4 mg $kg^{-1} d^{-1}$ SC por16 días	Disminución de lumen de túbulos seminíferos, incremento del índice apoptótico en células germinales	Atanassova *et al*., 2000
Rata Wistar	Adultas	H	Coumestrol	0,4-1,6 mg IV por 8,5 h	Inhibición de la hormona luteinizante (LH) por inhibición de Hormona Liberadora	McGarvey, *et al*., 2001
		H	Genisteina	1,6 mg IV por 8,5 h	de Gonadotropinas (GnRH)	
Rata Sparague Dawley	Adultas	H	Coumestrol	100 mg kg^{-1} en la dieta	Anovulación, supresión de LH	Shaw y McCully, 2002
		M		por 10 días	Supresión de conducta sexual como monta y eyaculación	
Bovinos	Adultos	M	Coumestrol	66,8 mg kg^{-1} en alfalfa seca como pastura vía oral	Metaplasia glandular y epitelial en próstata y glándulas bulbo-uretrales, disminuye la maduración de espermatozoides.	Pike *et al*., 1999
Ovejas	Adultos	H	Coumestrol	25 mg kg^{-1} oral en la pastura	Crecimiento uterino, descargas vaginales, desarrollo mamario, ovarios quísticos, estros irregulares	Adams, 1995

Abreviaturas utilizadas: IV: intravenoso; H: hembras; M: machos; mg: miligramo; µg: microgramo; SC: subcutáneo.

Los fitoestrógenos se encuentran presentes en diferentes plantas utilizadas como forraje para los rumiantes, como la alfalfa que contiene COU, trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) que contiene las isoflavonas formononetina, biochamina A y GEN; el trébol rojo (*Trifolium pratense*) antes de la floración tiene un alto contenido de formononetina, que se mantiene cuando es ensilado o se convierte en forraje seco pero cuando el trébol rojo florece, la cantidad de isoflavonas disminuye (Adams, 1995).

Adams (1995) encontró una asociación entre la estrogenicidad en ovejas y el consumo de tréboles. Cuando la pastura con la cual se alimentaban las hembras contenía 25 mg kg^{-1} de COU, se presentó una baja tasa de nacimientos, folículos hemorrágicos, prolapso de útero, metritis y edema uterino. En las vacas lecheras alimentadas con alfalfa seca que tenía 68,8 mg COU kg^{-1} de alfalfa, se presenta un síndrome estrogénico con características similares al descrito para ovejas (Romero *et al*., 1997).

Por otra parte, los fitoestrógenos también alteran la expresión de otros receptores nucleares importantes en la reproducción de la hembra, como los de oxitocina, los de testosterona además de los de PR (Whitten *et al*., 2002). Los fitoestrógenos pueden influenciar de manera negativa los ciclos foliculares en los ovarios de los diferentes mamíferos, ya que éstos interactúan con los ERβ presentes de manera abundante en las células de la granulosa, lo que disminuye el efecto de los estrógenos en los folículos (Whitten y Patisaul, 2001).

Los ERβ se expresan en diferentes regiones en el testículo, como los conductos eferentes, epidídimo, conductos deferentes y próstata (Saunders, 2005). Asimismo se sabe que existen en las células de Sertoli (Atanassova *et al*., 2000), espermatogonias y espermatocitos (Nie *et al*., 2002). En las células de Leydig de los adultos se expresan los ERα (Saunders, 2005).

In vitro, la GEN induce la apoptosis en líneas celulares derivadas de células de Leydig de ratón de manera dependiente de la concentración adminis-

trada. Asimismo produce disminución en el número de montas y eyaculaciones en ratones (Iwase *et al.*, 2006). En ratas macho de 2 días de nacidos a los cuales se les inyectan 4 mg kg^{-1} de GEN por vía subcutánea durante 16 días, se inhibe el desarrollo testicular a corto y largo plazo. Asimismo, cuando llegan a la edad adulta, se afecta el número de crías por camada (Atanassova *et al.*, 2000).

En un estudio efectuado en toros, la ingestión de pasturas que contienen COU ocasiona metaplásia glandular y epitelial tanto en próstata como glándulas bulbo-uretrales. Asimismo, se presenta mayor número de espermatozoides inmaduros y con una disminución significativa en la movilidad (Romero *et al.*, 1997).

El efecto del tratamiento con fitoestrógenos en el ganado bovino es relativamente escaso, sin embargo, se puede estimar. Así pues, en 608 vacas alimentadas con alfalfa contaminada con el hongo *Pseudopeziza medicaginis*, se obtuvo menos del 30% de gestaciones a pesar de haberse realizado 1264 inseminaciones en el lapso de un año. Este porcentaje de gestaciones se redujo en un 10% adicional al incorporar el número de vacas que tuvieron abortos espontáneos. Aún en las que presentaron gestaciones normales, los niveles de estrógenos estaban alterados, sintomatología característica del síndrome estrogénico (Romero *et al.*, 1997). En cerdos, la ingesta de 25-50 mg kg^{-1} de zearalenona promueve una disminución en el número de lechones nacidos así como el tamaño de las crías (Sharma *et al.*, 1994). Si a estos resultados se incorpora la pérdida económica y los gastos de manutención del ganado, es entendible la razón por la cual es difícil realizar este tipo de estudios.

El impacto de la ingestión de fitoestrógenos sobre la industria, puede ejemplificarse con lo que sucede en Australia. Rebaños de ovejas que fueron alimentados con pastura conteniendo trébol rojo vieron afectadas su capacidad reproductiva de tal forma, que cerca de un millón de ovejas no pudieron procrear, lo que disminuyó entre 5 a 8% las ganancias brutas al considerar las pérdidas en inversión, alimentación, cuidados, e incluso compra de ganado, además de la disminución en la producción de lana y la necesidad de comprar e importar animales (Adams, 1990).

CONCLUSIONES

Basado en la literatura consultada, se puede concluir que los fitoestrógenos pueden inducir alteraciones en el sistema endocrino de los animales que los consumen, o en los animales a los que se les administran con fines experimentales. Desde el punto de vista clínico, en bovinos y ovinos estos productos pueden generar pérdidas económicas considerables debido a las alteraciones reproductivas que ocasionan. Si bien en la literatura se tienen documentados los efectos que tienen los fitoestrógenos en animales de laboratorio y, aunque de manera escasa en animales de importancia económica, es preocupante para el productor y el médico encargado de la revisión del ganado, la detección de casos de alteración reproductiva cuya causa no pueda explicarse fácilmente. Una de las alternativas es a través de substancias con actividad estrogénica proveniente del alimento que, como hemos mencionado, puede estar asociado a alguno de los grupos de fitoestrógenos descritos en esta revisión.

La implementación de metodologías que permitan evaluar de manera simple, eficiente y de bajo costo la presencia de fitoestrógenos está aún en etapa de investigación. Si bien los fitoestrógenos pueden formar parte de los metabolitos secundarios o inducidos en los vegetales ante la presencia de patógenos, o como parte normal de su desarrollo, la evaluación al menos ocular de aspectos simples que estén asociados con la producción o acumulación de fitoestrógenos, como la floración del trébol rojo o la infestación de hongos en la alfalfa, permitirá un control que pueda reducir las pérdidas económicas ocasionadas por los fitoestrógenos. Aún falta mucho por estudiar respecto al impacto que tienen los fitoestrógenos en el desarrollo y función reproductiva de los animales así como la forma de antagonizar su efecto.

LITERATURA CITADA

Adams, N.R. 1990. Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. Aust. Vet. J. 67:197-201.

Adams, N.R. 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. J. Anim. Sci. 73:1509-1515.

Atanassova, N., C. McKinnell, K. Turner, M. Walker, S. Fisher, M. Morley, *et al.* 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. Endocrinology 141:3898-3907.

Branham, W.S., S.L. Dial, C.L. Moland, B.S. Hass, R.M. Blair, H. Fang, *et al.* 2000. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. J. Nutr. 132:658-664.

Beck, V., U. Rohr, and A. Jungbauer. 2005. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 94:499-518.

Burroughs, CD. 1995. Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally with coumestrol. Exp. Biol. Med. 208:78-81.

Dang, Z., and C. Lowik. 2005. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. Trends. Endocrinol. Metabol. 16:207-213.

Dubey, K., R.M. Rosselli, J. Imthurn, P. Séller, and E.K. Jackson. 2000. Vascular effects of environmental oestrogens: implications for reproductive and vascular health. Hum. Reprod. Update 6:351-363.

Galey, D., E. Mendez, E. Whitehead, M. Holstege, H. Plimlee, and B. Johnson. 1993. Estrogenic activity in forages: diagnostic use of the classical mouse uterine bioassay. J. Vet. Diagn. Invest. 6:603-608.

Hewitt, S.C., and K.S. Korach. 2003. Oestrogen receptor knockout mice: roles for estrogen receptors α and β in reproductive tissues. Reproduction 125:143-149.

Imamov, O., G. Shim, M. Warner, and J. Gustafsson. 2005. Estrogen receptor beta in health and disease. Biol. Reprod. 73:866-871.

Iwase, Y., H. Fukata, and C. Mori. 2006. Estrogenic compounds inhibit gap junctional intercellular communication in mouse Leydig TM3 cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 212:237-246.

Jacob, D.A., J.L. Temple, H.B. Patisaul, L.J. Young, and E.F. Rissman. 2001. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor α. Exp. Biol. Med. 226:301-306.

Kuiper, G.G., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. van der Sagg, *et al.* 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. Endocrinology 139:4252-4263.

Maniatis, T., and R. Reed. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. Nature (London) 416:499-506.

McGarvey, C., C. Cates, P.N. Brooks, A. Swanson, I.R. Milligan, W. Coen, *et al.* 2001. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. Endocrinology 142:1202-1208.

Mirocha, C.J., G.Weaver, B. Gustafsson, M. Chi, S.V. Pathre, T.S., Robinson, and F. Bates. 1978. Pharmacological and toxicological studies on zearalenone in food producing animals. 125 p. Quarterly Report 11. FDA, Washington DC, USA.

Morito, K., T. Aomori, T. Hirose, J. Kinjo, J. Hasegawa, S. Ogawa, *et al.* 2002. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptor α and β(II). Biol. Pharmaceut. Bull. 25:48-52.

Mosselman J., R. Polman, and R. Dijkema. 1996. ERβ: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett. 392:49-53.

Murkies A.L., G. Wilcox, and R. Davis. 1998. Phytoestrogens. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 83:297-303.

Nie, R., Q. Zhou, E. Jassmin, P.T. Saunders, and R.A. Hess. 2002. Differential expression of estrogen receptors α and β in the reproductive tracts of adults male dogs and cats. Biol. Reprod. 66:1161-1168.

Pérez-Rivero, J.J., Aguilar-Setién, A., Villa-Godoy, A., y Serrano, H. 2005. Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esferoidales: Receptores estrogénicos. Vet. Mex. 36: 437-452.

Pike, A.C.W., M. Brzozowski, A.E. Hubbard, R.T. Bonn, A. Thorsell, O. Engström, *et al.* 1999. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. EMBO J. 18:4608-4618.

Romero, C., R. Tarrago, R. Muñoz, R. Arista, y A. Rosado. 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. Vet. Mex. 28:25-30.

Rosselli, M., K. Reinhart, B. Imthurn, P.J. Keller, and R.K. Dubey. 2000. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. Hum. Reprod. Update 6:332-350.

Saunders, P.T.K. 2005. Does estrogen receptor β play a significant role in human reproduction? Trends Endocrinol. Metabol. 16:222-227.

Sharma, V.D., R.F. Wilson, and L.E. Williams. 1994. Reproductive performance of female swine feed corn naturally molded or inoculated with *Fusarium roseum* Ohio isolates B and C. J. Anim. Sci. 38:598-602.

Shawn, I., and S. McCully. 2002. A review of the potential of dietary endocrine disrupters on the consumer. Int. J. Food Sci. Technol. 37:471-476.

Weihua, Z., S. Andersson, G. Cheng, E.R. Simpson, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2003. Update on estrogen signaling. FEBS Lett. 546:17-24.

Whitten P.L., and H.B. Patisaul. 2001. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. Environ. Health Perspect. 109:5-20.

Whitten, P.L., H.B. Patisaul, and L.J. Young. 2002. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. Neurotoxicol. Teratol. 24:47-54.

Yamada, T., A. Yamamoto, M. Fujioka, M. Miyagi, N. Saito, I. Imai, *et al.* 1999. Characterization of urinari metabolites of a new benzafuroquiniline derivative 3,9-bis(N,N-dimethylcarbamoyloxy)-5H-benzofuro[3,2-C]-quinoline-6-one (KCA-098), in dogs. Pharmazie 54:672-677.

UNAM POSGRADO
Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Coumestrol Given Orally Induces Histological Changes in Dog Testis: Preliminary Findings

Juan José Pérez-Rivero*, José Juan Martínez Maya, Mario Pérez Martínez, Álvaro Aguilar-Setién, Héctor Serrano

Purpose

Coumestrol (COU) is a naturally occurring phytoestrogen that acts in a dose dependent fashion as either an estrogen agonist or antagonist. In mammals, COU binds to the α and β estrogen receptors (ER). In males, ERα are present in Leydig cells, while ERβ are present in Sertoli cells, germinal cells, epydidimal duct and prostate epithelium. In cattle and sheep, COU consumption induces sterility. In this study we assessed the histological effects of COU given orally on male dog testis.

Methods

Sperm in ejaculates from three healthy one year male dogs were counted and morphologically evaluated. After establishing base line data, two dogs were fed with a chow pellet containing 1ng COU for 4 weeks; the other dog was fed in a similar way with vehicle in chow pellet. Blood samples were collected at the end of period to evaluated red cells and platelets. At the end of each week, all dog's ejaculates were evaluated. After 5 weeks, all dogs were surgically castrated, their testis fixed in Bouins for 6 h, processed, in a automatic histoquinette for paraffin inclusion and 5µm sections were obtained with a microtome. The tissue cuts were stained with Masson and tolouidine blue and examined by light microscopy with a 40 X objective.

Results

The sperm count of COU-treated dogs were drastically decreased correlating with treatment (fig 1). An increase in abnormal ejaculated spermatoza were observed in treated dogs (fig. 2) The testis did not have any typical histological structures and interstitial Sertoli and sperm cells were disorganized (fig 4). Red cells and platelet maintained their physiological values (fig 3).

Conclusions

Male dogs fed COU over four weeks undergo changes in the testis histological structures. These results indicate that COU may be useful in dog population control. Further studies are needed to evaluate the reproductive impact of COU on the biochemical and endocrine processes of dogs to assure there are no negative side effects for a phytoestrogen-based reproductive control strategy development.

Reference:

Perez-Rivero JJ, Martinez-Maya JJ, Perez-Martinez M, Aguilar-Setien A, Garcia-Suarez MD, Serrano H. Testis alterations in dogs induced by phytoestrogen treatment. Arch. Androl. (In press)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

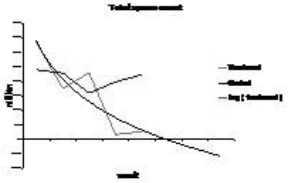


Figure 1. **Coumestrol induces astenozoospermia in dogs.** Coumestrol treated dogs were ejaculated before each pellet ingestion. Sperm count and concentration were obtained by haemocytometer count of formalin buffered samples.

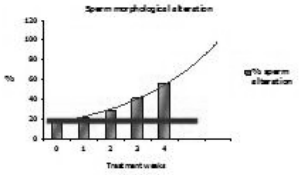


Figure 2. **Coumestrol induces an increase in altered spermatozoa.** Ejaculated spermatozoa from treated animals were evaluated under light microscopy. Solid bar at 20% indicate the maximal abnormal spermatozoa obtained in control dog. Logarithmic line indicate the actual tendency if treatment was maintained

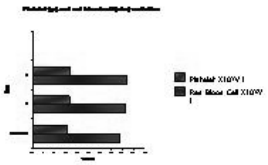


Figure 3. **Coumestrol does not alter hematopoietic parameters.** Control and experimental dogs were bleed after treatment and total erythrocytes (rbc) and platelets were determined . No differences in both cell types was observed

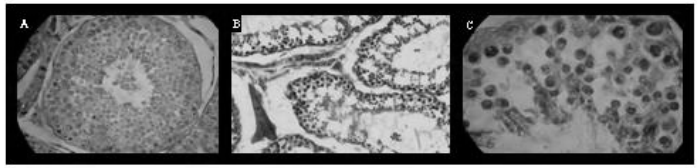


Figure 4. **Coumestrol treatment alters testis histoarchitecture.** Control dog tubuli show a germ cell´s in different development phase at 40X (methyl green stained)(A). Disorganized germinal epitelium in tubuli , increased insterstitial space and Sertoli cells are absente show in B (Masson stained) at 40X. (C) an oil view (100X) of germinal epitelium of trated dog show a decrease intermediate germ cell´s (toloudine blue stained)

UTILIZACIÓN DE FITOESTRÓGENOS ORALES PARA EL CONTROL DE LA POBLACIÓN DE PERROS MACHOS.

Pérez-Rivero Juan José [1,4] *, Pérez-Martínez Mario [2], Aguilar-Setién Álvaro [3], Martínez Maya José Juan [4], Serrano Héctor [5]

[1] Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. jjperez1_1999@yahoo.com.
[2] Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM
[3] Unidad de Investigación Médica en Inmunología, IMSS
[4] Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM
[5] Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

RESUMEN

Introducción: La estrecha relación del hombre con el perro ha permitido que varios agentes productores de enfermedad se transmitan entre ellos, lo que hace necesario el control de la población canina, el cual va encaminado a reducir su número y con ello la posibilidad de agresión y transmisión de enfermedades. Las técnicas de control letal de esta especie son controversiales y de manera general no son aceptadas por motivos religiosos, culturales y éticos, lo que abre la necesidad de contar con una alternativa de control reproductivo, eficaz y de administración oral, que complemente los procedimientos de estabilización de la población canina que se utilizan actualmente.
Material y Métodos: 7 perros sanos fueron evaluados reproductivamente por espermatobioscopía, se dividieron de manera aleatoria en dos grupos (Tratamiento n=7 y Control n=2) al grupo experimental se le dio coumestrol en el alimento por vía oral una vez por semana por cuatro semanas, de la misma manera se evaluó el semen y a la quinta semana se realizo orquiectomía, los testículos fueron procesados para histología convencional y observados al microscopio de luz.
Resultados: El número de espermatozoides disminuyo considerablemente, de la misma manera se incremento el numero de alteraciones morfológicas de los mismos. La histoarquitectura testicular presenta diferentes alteraciones como el incremento del espacio intersticial y vacuolización del epitelio germinal.
Conclusión: Estos resultados indican que el coumestrol es un agente que induce alteraciones de tipo reproductivo las cuales son asociadas con disminución de la fertilidad y por lo tanto pueden ser de utilidad para el control reproductivo de perros machos.

RESULTADOS

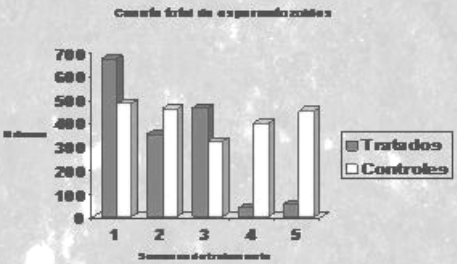


Figura 1.- Cuenta total de espermatozoides. El coumestrol administrado por vía oral reduce significativamente la cantidad de espermatozoides en el eyaculado.

INTRODUCCIÓN

El perro ha convivido con el hombre desde la edad mas remota (1), sin embargo es necesario mantenerlo bajo control para evitar que desarrollen por la vía pública y el campo, ya que pueden transmitir enfermedades y ser fuente de agresiones hacia el humano y los animales domésticos afectando así la economía (2).
La estrecha relación hombre-perro ha permitido que varios de los agentes productores de enfermedad se transmitan entre ellos (3, 4).
El control de poblaciones caninas va encaminado a reducir su numero y con ello la posibilidad de agresión y transmisión de enfermedades. Las técnicas letales de control de poblaciones en muchas sociedades es muy controversial y no es aceptada por motivos humanitarios, culturales, éticos y religiosos (5) , adicionalmente no existe evidencia que indique su efectividad en el control de poblaciones, adicionalmente los perros eliminados son rápidamente remplazados por cachorros susceptibles que nacen y por perros infectados que ocupan el nicho que queda vacío por la eliminación de los perros (6,7).
Un método de control reproductivo, de fácil administración que permita el tratamiento de manadas, como lo son los fitoestrógenos orales y que sea aceptado por la sociedad es el objetivo del tratamiento actual de poblaciones de perros que por sus características sean considerados un riesgo para el humano.
El coumestrol es un fitoestrógeno que actúa de manera dosis dependiente como agonista o antagonista estrogenito al unirse a los receptores para estrógenos, los cuales se encuentran presentes en el testículo y la próstata entre otros tejidos, esta unión induce estados de infertilidad en diferentes mamíferos como los ovinos, bovinos, roedores y vampiros (8,9,10).
El objetivo del presente trabajo es evaluar si en el perro el coumestrol administrado por vía oral induce estado de infertilidad.

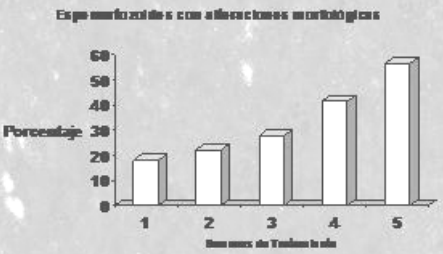


Figura 2.- Porcentaje de anormalidades morfológicas. En los animales tratados, de manera aditional con la reducción del número de espermatozoides en el eyaculado, se incrementa la cantidad de anormalidades su morfología celular.

MATERIAL Y METODOS

Siete perros machos sanos de un año de edad fueron evaluados en sus parámetros reproductivos por medio de espermatobioscopía, y serología para *Brucella canis*, se desparasitaron y vacunaron contra rabia, después de elaborar una base de datos se seleccionaron los perros al azar y se asignaron 5 al grupo tratamiento y dos al grupo control, todos los perros recibieron en mismo manejo en todo momento a excepción del grupo tratamiento el cual recibió unan dosis semanal de coumestrol en el alimento por un periodo de cuatro semanas.
Cada semana, se realizo a todos los perros espermatobioscopía y a la quinta semana se les realizo orquiectomía, los testículos fueron fijados en solución de Bouin y procesados para histología convencional, se obtuvieron cortes de 5 micras, los cuales fueron teñidos con verde metil pironina para su evaluación al microscopio de luz.

CONCLUSIONES

Los perros machos que consumieron coumestrol en el alimento durante cuatro semanas, presentaron cambios en la calidad del semen, los cuales fueron caracterizados por una disminución en el número de espermatozoides totales acompañado con incremento en alteraciones de la morfología espermática y alteraciones en la arquitectura histológica del testículo. Estos resultados indican que el coumestrol es un agente que induce alteraciones de tipo reproductivo las cuales son asociadas con disminución de la fertilidad y por lo tanto pueden ser de utilidad para el control reproductivo de perros machos.
Nos estudios son necesarios para evaluar la seguridad del producto tanto para el perro como para el medio ambiente.

LITERATURA CITADA

1.- Blank J J. El Maravilloso Mundo de los Perros. Librería de Manuel Porrúa S.A. México. 1974.
2.- Slater MR. The Role of Veterinary Epidemiology in the Study of Free-roaming Dogs and Cats. Preventive Veterinary Medicine. 2001;48:273-286.
3.- Loza-Rubio E, Aguilar-Setién JA, Bilbao C, Brodier E, Rastoret PP, Tordo N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. Arch Med Res. 1998 Mar-Apr; 30 (2) : 144-9
4.- Castillo Y, Bazan, H, Alvarado D, *et al.* Estudio epidemiológico de Toxocara canis en parques recreacionales del distrito de San Juan de Lurigancho, Lima- Perú. . *Parasitol. día.* [online]. jul. 2000, vol.25, no.3-4 [citado 14 Agosto 2006], p.109-114. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-07202000000300007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0716-0720.
5.- Meltzer MI, Rupprecht CE. A Review of the Economics of the Prevention and Control of Rabies. Part 2: Rabies in Dogs, Livestock and Wildlife. Pharmacoeconomics. 1998;14:481-498
6.- Adaniş O, Özdemir V, Kilic S, Babür C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. Veterinary Parasitology. 2005;129: 187-191
7.- Leney J. Impact of Companion Animals on Islands, Issues and Problems in their Management: Dogs. Proceedings of the Conference Challenges of Animal Protection on Island Nations with Special Emphasis on Dogs and Cats. 2002. April 2. Miami Beach Florida USA 2002. 7-9
8.- Adams N, R. 1998. Detection of the Effects of Phytoestrogens on Sheep and Cattle. J. Anim. Sci. 73:1509-1515.
9.- Gromee N, M. Sharpe R. 2000. Comparative Effects of Neonatal Exposure of Male Rats to Potent and Weak (Environmental) Estrogens on Spermatogenesis at Puberty and the Relationship to Adult Testis Size and Fertility: Evidence for Stimulatory Effects of Low Estrogen Levels. Endocrinology. 141:3898-3907.
10.- Serrano H, Pérez-Rivero JJ, Aguilar Setién A, De-Paz O, Villa-Godoy A. 2007 Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. Reproduction Fertility and Development 19:470-472

Cuadro anexo 1

Calificación de Johnsen	Criterio de evaluación
10	Espermatogenesis completa; algunos espermatozoides, epitelio germinal organizado, lumen abierto en el túbulo seminífero, suficientes espermátides redondas
9	Algunos espermatozoides, epitelio germinal desorganizado, con disminución u obliteración del lumen del túbulo seminífero
8	Entre 5 y 10 espermatozoides en el túbulo seminífero
7	No hay espermatozoides, pero si hay espermátides.
6	No hay espermatozoides, solo pocas (entre 5 y 10) espermátides
5	No espermatozoides, no espermátides pero varios espermatocitos presentes
4	Pocos espermatocitos (menos de 5) no espermatozoides, no espermátides
3	Solo espermatogonias
2	Solo células de Sertoli
1	Sin células

Criterio de Johnsen para cuantificar la espermatogénesis en cortes histológicos de testículo, modificado para su uso en perros (Peters et al., 2000)

Peters MAJ, et al., Journal of Reproduction and Fertility.2000; 120:443-452

Imagen anexa 1

Detección de coumestrol unido al receptor estrogénico en testículo de perro, mediante el empleo de microscopia confocal.