



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DEL COUMESTROL SOBRE LA CONDUCTA  
SEXUAL EN PERROS (*Canis familiaris*) MACHOS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**NIDIA GUADALUPE GUALO SOBERANES**

**TUTOR**

**JUAN JOSÉ PÉREZ RIVERO CRUZ Y CELIS**

**COMITÉ TUTORAL**

**MARIO PÉREZ MARTÍNEZ**

**HÉCTOR FERNANDO SERRANO**

México D. F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

A mis padres **Francisco Gualo** y **Esperanza Soberanes** por todo el cariño, comprensión y apoyo que me han brindado hasta ahora, siempre serán parte importante de mi vida, los quiero mucho.

A mi gran amor, amigo y compañero de vida **J. Iván Reyes** por el amor que compartimos, por los grandes momentos que estamos viviendo y por lo que falta por vivir. Te amo

A mis hermanos **Nadia Gualo** y **Paulino Gualo** gracias por el apoyo, los consejos, por demostrarme que pase lo que pase puedo contar con ustedes, los quiero mucho y siempre cuentan conmigo.

A **Rodrigo Gualo** mi sobrino, gracias nene por tu cariño, por cambiarme la vida y darme esos grandes momentos de alegría. Te quiero mucho.

A mis grandes amigas **Nubia, Ceylin** y **Citlali** porque aun que casi ya no estamos juntas como antes, siempre están cuando mas las necesito. Gracias

A **Marian, Roxana, Nancy, Arely, Ulises, Víctor** y **Efraín** muchas gracias por el apoyo, los consejos y por apoyarme en esta nueva etapa de mi vida.

## **Agradecimientos**

Al **Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz y Celis** por su amistad, por compartir sus conocimientos, por los consejos, el apoyo y sobre todo por ayudarme a terminar esta gran reto. Muchas Gracias.

Al **Dr. José Juan Martínez Maya** por su tiempo, por permitirme iniciar este proyecto, y por el apoyo. Muchas gracias.

Al **Dr. Mario Martínez Pérez** por todos los grandes consejos y por compartir su conocimiento. Muchas gracias.

Al **Dr. Héctor Serrano** por su tiempo, por los conocimientos que me han servido para concluir este trabajo. Muchas gracias.

A la **MC Tatiana Chávez** muchas gracias por el apoyo y el interés en la conclusión de este trabajo. Muchas gracias.

Al **MVZ Luis Guevara** por el apoyo brindado para este trabajo.

A mi querida **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por permitirme continuar con este crecimiento profesional al ingresar al postgrado. Muchas gracias

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser mi alma mater y un gran orgullo para mí. Muchas gracias

A **CONACYT** por la confianza al otorgarme la beca que permitió mi formación en el postgrado de Maestría en Ciencias.

## INDICE

<b>Resumen</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	II
<b>1.0 Introducción</b> .....	1
<b>1.1 Problemas de salud pública</b>	
<b>2.0 Aspectos conductuales</b> .....	2
<b>2.1 Agresividad</b>	
<b>2.2 Marcaje de territorio</b>	
<b>3.0 Control reproductivo</b> .....	4
<b>3.1 Métodos de esterilización en caninos</b>	
<b>3.2 Esterilización quirúrgica</b>	
<b>3.3 Esterilización no quirúrgica</b>	
<b>4.0 Receptores estrogénicos</b> .....	7
<b>5.0 Fitoestrogenos</b> .....	8
<b>6.0 Hipótesis</b> .....	11
<b>7.0 Objetivo general</b> .....	11
<b>7.1 Objetivos específicos</b>	
<b>8.0 Justificación</b> .....	12
<b>9.0 Material y métodos</b> .....	13
<b>9.1 Animales</b>	
<b>9.2 Preparación de la feromona artificial</b>	
<b>9.3 Preparación y administración del coumestrol</b>	
<b>9.4 Evaluación del comportamiento</b>	
<b>9.5 Obtención del eyaculado</b>	
<b>9.5.1 Evaluación del eyaculado canino</b>	
<b>9.6 Morfometría testicular</b>	
<b>9.7 Análisis estadístico</b>	

<b>10.0</b>	<b>Resultados</b> .....	19
<b>10.1</b>	Evaluación del comportamiento	
<b>10.2</b>	Evaluación del eyaculado canino	
<b>10.3</b>	Evaluación del tamaño testicular	
<b>11.0</b>	<b>Discusión</b> .....	22
<b>12.0</b>	<b>Conclusión</b> .....	25
<b>13.0</b>	<b>Literatura citada</b> .....	26
<b>14.0</b>	<b>Cuadros y figuras</b> .....	31

### **Lista de Figuras**

**Figura 1.** Escala diseñada por Proplan\* para evaluar la condición corporal en perros.

**Figura 2.** Morfometría testicular.

**Figura 3.** Evaluación de la coloración del semen eyaculado de los perros tratados con coumestrol.

**Figura 4.** Alteraciones en la morfología espermática en los perros tratados con coumestrol.

### **Lista de Cuadros**

**Cuadro 1.** Resultados de la prueba de Mann-Whitney.

**Cuadro 2.** Número de veces que orinaron los perros al ser expuestos a la feromona artificial.

## **Lista de Gráficas**

**Gráfica 1.** Media del tiempo (segundos) que tardaron en acercarse a la feromona artificial los perros con tratamiento y perros sin tratamiento.

**Gráfica 2.** Número de veces que se acercaron los perros con tratamiento y sin tratamiento a la feromona artificial.

**Gráfica 3.** Número de veces que se acercaron los perros con tratamiento y sin tratamiento a la solución salina fisiológica.

**Gráfica 4.** Evaluación de la coloración del semen eyaculado de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.

**Gráfica 5.** Media del porcentaje de motilidad de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.

**Gráfica 6.** Media del volumen del semen obtenido de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.

**Gráfica 7.** Media de la concentración de espermatozoides/mL de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.

**Gráfica 8.** Media del porcentaje de morfología normal de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.

**Gráfica 9.** Media de porcentaje de morfología anormal de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.

## Resumen

Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos derivados de las plantas, los cuales tienen actividad similar a los estrógenos. El coumestrol pertenece al grupo de los coumestanos y se conoce que tiene alta actividad estrógenica. Los fitoestrógenos tienen la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos; los mecanismos por los cuales pueden actuar los fitoestrógenos es porque al unirse con los receptores estrogénicos estos actúan como agonistas y/o antagonistas estrogénicos dependiendo de la dosis empleada. Su efecto depende de factores como la especie, el nivel reproductivo del individuo, el tiempo de exposición y/o la vía de administración. Cuando son consumidos en cantidades elevadas pueden alterar el comportamiento sexual, así como generar cambios anatómicos y fisiológicos de los órganos reproductivos. En este estudio se propuso determinar la efectividad del coumestrol, administrado por vía oral a dosis única de 600  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso, para producir cambios en la conducta sexual, inducir oligospermia y teratospermia en perros machos adultos. Se estudiaron 5 perros tratados con coumestrol y 3 perros testigos semanalmente durante 9 semanas; se evaluó el comportamiento sexual, la concentración y morfología espermática. Los resultados no mostraron cambios significativos ( $P > 0.05$ ) en el volumen del eyaculado, pH, concentración espermática, tamaño de ambos testículos. Sin embargo, se encontraron cambios significativos ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje de motilidad, en alteraciones de la morfología espermática y el tiempo que tardaron en acercarse a la feromona. Se concluye que la administración de una dosis de 600  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de coumestrol por vía oral en perros machos no produce cambios significativos en el comportamiento, sin embargo produce cambios en el porcentaje de motilidad y morfología espermática.

**PALABRAS CLAVE** Coumestrol, receptores estrogénicos, agonista, antagonistas, comportamiento.



## **Abstract**

Phytoestrogens are nonsteroidal compounds derived from plants, which have estrogen-like activity. The coumestrol belongs to the group coumestans and is known to have high estrogenic activity. Phytoestrogens have the ability to bind to estrogen receptors, the mechanisms by which phytoestrogens may act is that by binding with estrogen receptors they act as agonist and / or anti-estrogenic, depending on the dose used. Its effect depends on factors such as species, the reproductive level of the individual, the exposure time and / or route of administration. When consumed in high amounts can alter sexual behavior, and generate anatomical and physiological changes of the reproductive organs. In this survey was to determine the effectiveness of coumestrol, orally administered single dose of 600 mg / kg, to effect changes in sexual behavior and induce oligospermia teratospermia in adult male dogs. 5 dogs were studied coumestrol-treated and 3 control dogs weekly for 9 weeks and assessed sexual behavior, sperm concentration and morphology. The results showed no significant changes ( $P > 0.05$ ) in ejaculate volume, pH, sperm concentration, size of both testicles. However, significant changes were found ( $P < 0.05$ ) in the percentage of motility, alterations in sperm morphology and the time it took to approach the pheromone. We conclude that administration of a dose of 600 mg / kg oral coumestrol in dogs produced no significant changes in behavior, yet it produces changes in the percentage of sperm motility and morphology.

**KEYWORDS** coumestrol, estrogen receptor, agonist, antagonist, behavior

## 1.0 Introducción

Desde la antigüedad el hombre ha estado en estrecha relación con los cánidos, esto tiene sus orígenes en la domesticación de los animales. Inicialmente, los perros fueron de importancia para ayudar al ser humano en diversas tareas como los combates, tracción de trineos, la caza entre otras.

En la actualidad, los perros se han utilizado para actividades como son: guardia y protección, detección de drogas, lazarillos y como animales de compañía.

Desafortunadamente no todos los perros tienen dueño responsables algunos inicialmente contaron con un hogar y un dueño, pero por diversos motivos son abandonados en las calles; otros salieron de sus hogares y no pudieron regresar; no importando cuál sea el motivo, estos perros se convierten en perros sin dueño que deambulan por la calle. Existen diversas clasificaciones para nombrar este tipo de perros entre ellas la que realizó la Organización Mundial de la Salud en el año de 1990:

1. Perros restringidos o supervisados. Son perros que son completamente dependientes de sus dueños y sus movimientos son restringidos.
2. Perros de familia. Perros dependientes de sus dueños, con movimientos parcialmente restringidos.
3. Perros del vecindario o comunales. Perros parcialmente dependientes del humano, con movimientos no restringidos.
4. Perros ferales. Perros independientes los cuales se pueden alimentar de basura, los cuales sus movimientos son no restringidos.

Por su parte en México la Ley de protección a los animales del Distrito Federal y la Ley General de Vida Silvestre publicada en el Diario Oficial de la Federación (Julio 2000) mencionan que los animales ferales son especies domesticas que al estar fuera del control del hombre, se establecen en su hábitat

natural el cual comparten con fauna silvestre. El término de perro feral puede ser sustituido por algunos autores por el término de perros callejeros (Torres, 2006).

En la Ciudad de México, (D. F.) en el 2003 se calculó que existía una población de perros de aproximadamente un millón 393 mil perros, lo que nos da una media de un perro por cada 7 habitantes (Gobierno del Distrito Federal 2003)

## **1.1 Problemas de salud pública**

La sobrepoblación de perros representa un problema de salud pública ya que al deambular por la vía pública pueden ser reservorios de enfermedades zoonóticas como la rabia, brucelosis, leptospirosis (Suk, et al 2006), parasitosis (*Dypilidium caninum*, *Dirofilaria immitis* y *Toxocara canis*), entre otras (Acha PN, 1986). Lo anterior, aunado a la gran cantidad de excretas y orina que son liberadas al ambiente, sobre todo si se calcula que al día en promedio en el D. F. se generan hasta 696,915 kg de excremento y 1,222,388 litros de orina al día (Gobierno del Distrito Federal, 2003), ocasionando así un problema grave de contaminación ambiental.

## **2.0 Aspectos Conductuales**

### **2.1 Agresividad**

Dentro del comportamiento de los perros estos en ocasiones expresan agresividad dirigida hacia las personas; para esta conducta agresiva la Sociedad Americana de Veterinarios Especialistas en Comportamiento Animal (AVSAB) propuso una clasificación con la finalidad de proporcionar un diagnóstico y tratamiento adecuado.

En esta clasificación encontramos los siguientes tipos de agresividad:

- I. por miedo
- II. intrasexual
- III. por dominancia
- IV. maternal
- V. por protección del propietario
- VI. territorial
- VII. por causa orgánica
- VIII. por protección de recursos
- IX. depredadora.

La agresividad por dominancia tiene diferentes causas como las de naturaleza genética; por aprendizaje la cual se manifiesta más cuando los animales llegan a su madurez sexual. Además, existen factores hormonales por la acción de los andrógenos en el sistema nervioso central, este tipo de agresión se observa más en perros machos que no han sido castrados.

La agresividad por miedo se presenta principalmente hacia personas que son desconocidas para el animal, al igual que en la agresividad territorial, pero esta última se presenta cuando la persona desconocida penetra en el territorio del perro (Galindo, 2004).

Por otra parte, cuando los animales entran en celo se tornan agresivos, es de tipo circunstancial y está dirigida a individuos de la misma especie y sexo, sin embargo, la presencia de personas puede alterar su comportamiento y canalizar la agresión hacia ellos, por miedo o por dominio de territorio (Manteca, 2003). En el macho es donde se presenta más la agresión intraespecífica (Mertens, 2006), lo anterior puede generar un aumento en el número de mordidas hacia las personas. En México la Secretaría de Salud registra 110 mil agresiones al año lo que implica que 46 mil personas reciban atención preventiva contra rabia, generando un costo de 16.8 millones de atención médica y el costo por vacuna representa un poco más de 30 millones de pesos (Oscar Velásquez 2006).

## **2.2 Marcaje de territorio**

Otra problemática es el marcaje de territorio, el orinar dentro de la casa se observa más en los machos sexualmente activos. En el perro una feromona sexual es producida por la hembra la cual sirve para que el macho identifique que se encuentra receptiva (Kustriz, 2005); esta es eliminada por la orina y debido a su bajo peso molecular y a su característica de ser volátil; puede ser atrayente a un a distancias largas (Pérez-Rivero et al, 2009). La feromona en el perro ha sido identificada químicamente como metil-p-hidroxibenzoato. (Goodwin, 1979).

El macho al captar la feromona presente en la orina de las hembras, puede orinar encima de esta con la finalidad de sobreponer su olor y no tener competencia con otros machos (Kustriz, 2005); además de que esta feromona estimula la conducta de monta del macho (Goodwin, 1979).

La castración es uno de los métodos utilizados en la práctica clínica en pequeñas especies para controlar algunos comportamientos inadecuados de los perros machos como el orinar (marcaje de territorio), el deambular por las calles, la monta y las agresiones (Maarschalkerweerd, 1997). La técnica es simple, mínimamente invasiva, pero se requiere de equipo y personal capacitado.

## **3.0 Control Reproductivo**

Por lo anterior, es necesario buscar alternativas viables que permitan inhibir la reproducción en los canidos domésticos y la disminución de los animales callejeros. El control de la reproducción en la actualidad tiene un enfoque dirigido a cuestiones de ética y de bienestar animal. Por lo que se deben de considerar diversos aspectos, antes de elegir un método de inhibición de la reproducción que sea eficiente y esté acorde a los principios de bienestar animal y de protección del medio ambiente que la sociedad moderna exige.

### **3.1 Métodos de esterilización en caninos**

Tradicionalmente la esterilización de animales de compañía se han realizado por métodos quirúrgicos, pero también existen los métodos no quirúrgicos como lo son los farmacológicos o físicos que permiten realizar la anticoncepción en el macho.

### **3.2 Esterilización quirúrgica**

Existen diferentes métodos para el control de la fertilidad, en caninos machos, el más común es la esterilización quirúrgica (vasectomía y orquiectomía) (Sorribas, 2005); estas se utilizan para disminuir la sobrepoblación de animales de compañía y la orquiectomía de manera adicional es de utilidad, para prevenir enfermedades como la hiperplasia prostática no benigna (Howe L.M, 2006). El costo de este tipo de técnica no es muy elevado en promedio 900 pesos; pero se requiere de personal capacitado y de instalaciones adecuadas para poder realizarlo, y de esta forma evitar complicaciones secundarias como pueden ser, en el caso de la orquiectomía, la presencia de hemorragia, hematomas, inflamación del escroto o infecciones, por realizar de manera inadecuada el procedimiento quirúrgico (Howe, 2006). Mientras que en la vasectomía, un inconveniente es la persistencia del comportamiento sexual, debido a que continúan presentes las hormonas sexuales.

### **3.3 Esterilización no quirúrgica.**

Dentro de la esterilización no quirúrgica se encuentra la inyección de hormonas esteroides (andrógenos, progestágenos) la cual es una alternativa para la supresión de hormonas que intervienen en la fertilidad; estas actúan

indirectamente a través de la inhibición de la secreción de gonadotropinas, principalmente la LH por lo que se ve afectada la espermatogénesis (Kutzler et al, 2006) En caninos machos la administración de acetato de megestrol (MPA) a dosis de 4 mg/kg de peso diariamente durante 7 días produce pequeñas alteraciones secundarias en los espermatozoides, mientras que la administración subcutánea de MPA a dosis de 20 mg/kg de peso provoca cambios en la morfología y motilidad espermática, lo que disminuyó la reproducción (Kutzler et al, 2006). En cambio, la administración de andrógenos ha sido más eficaz que la de progestágenos; la aplicación de propionato de testosterona a dosis de 0.6 mg/kg de peso en caninos machos causó una disminución significativa en la motilidad espermática a tres semanas de haber sido administrada, además de persistir su efecto durante tres meses (Kutzler et al, 2006)

Otro método es el inmunológico a partir de la inmunización contra la hormona luteinizante (LH) canina, utilizando LH bovina, la cual produce anticuerpos que actúan contra la LH canina, anulando la eyaculación aproximadamente durante 6 semanas ocasionando una disminución de la función reproductiva durante casi un año (Sorribas, 2005). Otra es la inmunización contra espermatozoides lo que afecta la fecundación y la fertilidad; los principales antígenos que se utilizan son el lactato deshidrogenasa y acrosina, no se utiliza todo el espermatozoide por que comparte varios antígenos con células somáticas (Kutzler et al, 2006). También se ha utilizado la inyección de agentes químicos en el epidídimo, testículo o en conducto deferente (Kutzler et al, 2006), como son: glicerol (Immegart, 2000), gluconato de zinc, tanato de zinc o arginina de zinc, estos químicos producen azoospermia ya que al ser aplicados en la cola del epidídimo causan irritación, inflamación y cicatrización lo cual cierra la luz de los conductos deferentes de forma irreversible. Una desventaja de este tipo de procedimiento es que el aplicar un químico directamente en el testículo causa una respuesta

inflamatoria local lo cual permite a las células linfoides acceder al tejido testicular, lo que puede provocar una respuesta autoinmune (Kutzler et al 2006). Además se da un aumento de tamaño gonadal, lo cual no se ve estético en los animales de compañía, además de ser un procedimiento doloroso el cual requiere que los animales sean anestesiados (Fahim et al. 1993). Otras reacciones sistémicas que se pueden observar son ulceraciones, dermatitis escrotal, automutilación y letargo; sin embargo este tipo de castración no elimina las fuentes de testosterona. (Kutzler et al 2006).

#### **4.0 Receptores Estrogénicos**

Los receptores estrogénicos (ER) pertenecen al grupo de receptores nucleares los cuales presentan una estructura modular (Pérez-Rivero et al. 2007); los receptores nucleares están conformados por los receptores para andrógenos (AR), estrógenos (ER), progesterona (PG), glucocorticoides (GR), hormonas tiroideas (TR), para vitamina D3 (VDR), ácido retinoico (RXR) y otros receptores conocidos como huérfanos (OR) debido a que se desconoce el ligando al cual responden (Robinson-Rechavi et al. 2003)

De los receptores estrogénicos se han identificado dos isoformas, la  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y  $\beta$  (ER $\beta$ ) las cuales se pueden distinguir por que presentan diferentes secuencias de aminoácidos. Los ER al ser receptores nucleares modulan la transcripción por la unión específica a secuencias del genoma a co-receptores y co-activadores regulando así la acción del complejo ARN polimerasa.

Cuando se unen los ER con los estrógenos se producen cambios en la conformación del receptor, lo que le permite separarse del complejo co-represor y así poder unirse con un complejo co-activador, proporcionándole así la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a los estrógenos. Por lo que en ausencia de estrógenos los ER se unen con los co-represores inhibiendo así la transcripción (Pérez-Rivero et al. 2007).



## 5.0 Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos derivados de las plantas, que tienen actividad similar a los estrógenos (Pérez-Rivero et al 2007), y pueden ser clasificados dependiendo de su estructura química en tres diferentes grupos: isoflavonas, coumestanos y lignanos (Opalka et al, 2006). Estos compuestos se encuentran de forma natural en pequeñas cantidades en frutas, vegetales y legumbres, en los cuales actúan como fungicidas y antimicrobianos. El coumestrol pertenece al grupo de los coumestanos y se conoce que tiene alta actividad estrógena (Romero et al, 1997) se puede encontrar de forma natural en la alfalfa (*Medicago sativa* L.) y el germen de soya (Pérez-Rivero et al 2007)

Los fitoestrógenos tienen la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos por lo cual al ser consumidos en grandes cantidades puede generar cambios alterando el comportamiento sexual, así como generar cambios anatómicos y fisiológicos de los órganos reproductivos.

Se ha detectado la presencia de receptores estrogénicos en diferentes órganos (Couse, 2001); los receptores estrogénicos  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) se encuentran en el útero, glándula mamaria, hueso y en el sistema cardiovascular (Pérez-Rivero et al 2007) y los receptores estrogénicos  $\beta$  (ER  $\beta$ ) en órganos como próstata, conducto deferente, diferentes regiones del testículo que participan en la espermatogénesis (Pérez-Rivero et al 2009), así como en ovarios, tracto urinario y algunas regiones del cerebro como la región preóptica (relacionada con el comportamiento sexual), núcleo ventro medial, amígdala y bulbo olfatorio. (Pérez et al 2009) Los mecanismos por el cual pueden actuar los fitoestrógenos es porque al unirse con los receptores estrogénicos estos actúan como agonistas y/o antagonistas estrogénicos dependiendo de la dosis empleada. El efecto de estos depende de factores como la especie, el nivel reproductivo del individuo, el tiempo de exposición y la vía de administración (Opalka et al. 2006). La mayor actividad del coumestrol se observa cuando es administrado por vía oral, y debido a la vida media de eliminación se ha propuesto que el coumestrol

tiene modificaciones en el tracto digestivo (por bacterias residentes) y después de procesos de absorción en el hígado es transportado por arterias y venas por lo que hay acumulación y finalmente este es desechado por la orina (Pérez-Rivero et al 2009).

Por lo que el coumestrol al igual que el estradiol y otros fitoestrógenos, tiene afinidad por los receptores estrogénicos y puede inhibir el desarrollo y proliferación de los tejidos del tracto reproductivo y esto tiene un efecto negativo en la espermatogénesis (Serrano et al. ,2007).

La administración de cantidades elevadas de coumestrol por vía oral causa alteraciones reproductivas como el síndrome estrogénico reportado en vacas lecheras por (Romero et al 1997) quienes observaron cambios del ciclo estral, disminución en la tasa de concepción, quistes ováricos, e hiperplasia del útero en los animales que consumían alfalfa con altas cantidades de fitoestrógenos.

En los machos con dosis similares, se ha observado baja de peso y de la libido; los fitoestrógenos pueden además causar cambios fisiológicos en el tracto reproductivo como es la metaplasia glandular de próstata y del bulbo uretral, dificultad en la maduración y movilidad de los espermatozoides, ya que causan alteraciones en la espermatogénesis lo que puede causar infertilidad (Romero et al. 1997).

Por su parte, se ha demostrado que los fitoestrógenos en las hembras pueden causar cornificación vaginal persistente, folículos ováricos hemorrágicos, y apertura vaginal prematura cuando se administran fitoestrógenos a dosis de 50 a 100  $\mu\text{g}$  (Burroughs 1995).

La administración de 200  $\mu\text{g}$  de coumestrol en la dieta por 30 días en murciélagos hematófagos, induce alteraciones en la histoarquitectura testicular (Pérez-Rivero et.al, 2007; Serrano et al. 2007)

Los fitoestrógenos reducen la síntesis de hormonas esteroides como los andrógenos, estos son los causantes de estimular la conducta sexual en machos

(Opalka et al. 2006), si bien la cantidad de estos no está relacionada con la presencia o ausencia de la conducta sexual, la cual depende de la respuesta del sistema nervioso central a los andrógenos (Manteca 2003).

En estudios previos utilizando 300µg/kg de coumestrol por vía oral en perros machos, se han observado alteraciones en la morfología testicular y en la cuenta de espermatozoides eyaculados (Pérez-Rivero. et al. 2008), además de cambios en el comportamiento reproductivo (Pérez-Rivero. et al 2009) por lo que es necesario evaluar la dosis optima de coumestrol como un posible producto para el control de poblaciones de perros.

Por lo anterior, es necesario buscar otras alternativas que sean menos traumáticas y menos invasivas. En este sentido se ha explorado la utilización de fitoestrógenos como el coumestrol por vía oral, el cuál ha demostrado ser efectivo para inducir alteraciones en la morfología testicular y espermática en diversos animales las cuales han sido asociadas con alteraciones en la reproducción (Pérez-Rivero et al. 2008, Serrano et al. 2007).

## **6.0 Hipótesis**

El Coumestrol es un fitoestrogeno que altera la fertilidad en algunos mamíferos, por lo que al ser administrado por vía oral en caninos machos adultos, disminuirá significativamente los parámetros conductuales y reproductivos para llevar a cabo la reproducción.

## **7.0 Objetivo general**

Determinar la efectividad del coumestrol administrado por vía oral en una única dosis de 600 µg/Kg de peso, para disminuir la conducta sexual, inducir oligo y teratospermia en perros (*Canis familiaris*) machos y evaluar su efecto sobre el conteo espermático.

### **7.1 Objetivos específicos**

Evaluar el efecto de la administración oral de coumestrol a dosis única de 600 µg/Kg de peso en perros machos adultos sobre su comportamiento sexual al ser sensibilizados con la feromona artificial.

Determinar el efecto del coumestrol administrado por vía oral en una dosis de 600 µg/Kg de peso sobre algunas características físicas y microscópicas del eyaculado de semen (espermatobioscopía) de los grupos experimentales.

Determinar el efecto que tiene el tratamiento con coumestrol a dosis única de 600 µg/Kg de peso sobre el tamaño testicular de los perros tratados.

## **8.0 Justificación**

El comportamiento antisocial de los perros es causa importante para que en ocasiones sean abandonados en las calles, lo que trae como consecuencia que estos coman en basureros, defequen en las calles y lo más importante la sobrepoblación de perros callejeros; de los cuales la mayoría no se encuentran esterilizados y por lo tanto aumenta este tipo de población. Por ello es necesario buscar métodos de esterilización que permitan disminuir este tipo de conductas, además de que sean de fácil aplicación.

## 9.0 Material y Métodos

### 9.1 Animales

Se utilizaron 8 perros (*Canis familiaris*) machos de raza indistinta con peso promedio de  $16 \pm 5.23$  Kg, los criterios de inclusión para el trabajo fueron:

- a) Perros machos con edades entre 1 a 5 años, la cual fue determinada por la dentadura según la metodología descrita por (Blank, 1974) y confirmada por los dueños de los perros.
- b) Perros clínicamente sanos; para lo cual se realizó un examen clínico general en el cual se verificó que el peso correspondiera a la talla y edad del animal; que se encontraran en una condición corporal adecuada, basada en la escala utilizada por ProPlan\* (Figura 1).

Se verificó que la frecuencia cardiaca y respiratoria se encontrara dentro de los parámetros fisiológicos normales, así como un buen funcionamiento del aparato locomotor, prestando especial atención a la integridad de los miembros posteriores, columna vertebral y las articulaciones (Birchard, 1994).

Se examinaron los órganos genitales; para esto se verificó que el escroto se encontrara suave no engrosado y que no estuvieran adheridos los testículos al mismo; que los testículos tuvieran forma ovoide y en posición oblicua, con la cola del epidídimo hacia atrás, de consistencia firme y turgente (Galina, 2006).

\*Empresa dedicada a la elaboración de alimento para pequeñas especies

Se palpó el epidídimo en todo su trayecto, revisando particularmente la cola la cual debía sentirse llena; que el prepucio cubriera por completo el pene y que permitiera la salida completa de este; se revisó por vía rectal que la próstata fuera simétrica y que no existiera dolor al momento de la palpación.

Por otra parte en los machos se verifico su libido antes de ser tratados con coumestrol, para lo cual se impregno a una perra ovariosalpingohisterectomizada con feromona artificial para verificar que los perros mostraran interés “deseo sexual” el cual se describió como el acto de detectar, dominar, montar, desvainar e intentar penetrar a la perra (Galina, 2006), antes de ser tratados con el coumestrol.

De manera previa, se realizó un conteo espermático para verificar que los perros tuvieran un conteo espermático al menos de 170 millones de espermatozoides por mL (Johnston, 2001).

La muestra fue dividida en dos grupos, el primero compuesto por 5 perros los cuales recibieron el tratamiento de coumestrol a dosis única de 600 µg/Kg y un grupo de 3 perros los cuales recibieron un placebo dimetil sulfoxido (DMSO\*)

## **9.2 Preparación de feromona artificial**

En un vaso de precipitados se realizó una dilución de 1 parte de Methyl 4-hydroxybenzoate por 400 partes de agua purificada (Sigma Aldrich), para ser utilizado como feromona artificial en perros, siguiendo la metodología propuesta por Goodwin.(1979). Posteriormente se coloco en un frasco estéril.

\* Aldrich Chemical Company Ind LQ Lote No. 18525JQ

### **9.3 Preparación y administración de coumestrol**

En tubo Eppendorf (1.5 mL) se colocaron 50 mg de coumestrol puro (Fluka St Louis; MO) el cual fue diluido con DMSO para obtener una concentración final de 100 µg/µl. Posteriormente se colocó la dosis calculada para cada animal en un “premio” el cual se proporciono a cada perro y se verifico que lo ingiriera en su totalidad.

### **9.4 Evaluación del comportamiento canino**

El experimento se realizó en una habitación de 9 m<sup>2</sup>, en la que se colocaron dos frascos de plástico, uno contenía la feromona artificial (metil 4 hidroxibenzoato) la cual se encontraba contenida en un algodón dentro del frasco estéril y el otro frasco contenía algodón impregnado con solución salina fisiológica. Teniendo una distancia de 3 metros entre los frascos (Kiddy, 1984)

Cada semana se evaluó el comportamiento del perro en la habitación durante 5 minutos, registrándose con cronómetro el tiempo en que se tardó en acercarse al frasco que contenía la feromona artificial; también se registró el número de veces que se acerco a cada uno de los frascos, tenía que ser por más de 5 segundos. Además de registrar el número de veces que orino en el cuarto, después de oler alguno de los frascos. Antes de ingresar a otro perro para su evaluación el cuarto fue desinfectado con hipoclorito de sodio y ventilado por al menos dos horas antes de hacer la evaluación del siguiente perro.

### **9.5 Obtención del eyaculado**

Para obtener el semen se estimuló al perro con la feromona artificial la cual se coloco en un frasco a 15 cm cerca del perro y de esta forma obtener el eyaculado. Se



colocó al perro sobre una mesa de exploración y se limpió el prepucio con solución salina fisiológica, posteriormente se dio masaje de forma constante sobre el bulbo del pene, y cuando comenzó el congestionamiento se retrajo el prepucio en dirección caudal; para que el pene quedara completamente expuesto, se continuó con la presión en el bulbo; para posteriormente colocar un cono colector de semen desechable de vinilo con punta cerrada. Cuando el perro presento erección completa, se permitió que el perro saltara el brazo del colector para simular el bloqueo genital, el cual ocurre de manera natural cuando se realiza la monta con una hembra, en este momento se rota 180° caudalmente el pene y se continúa con la presión en el bulbo, proporcionando estímulos pulsátiles hasta obtener el eyaculado, únicamente se colecta la primera y segunda fracción del eyaculado canino.

Finalmente se retiró el cono de colección y se proporcionó un masaje leve con lubricante para asegurarse que el pene se descongestionara e invaginará dentro del prepucio.

. El intervalo entre cada colección de semen fue de 7 días como lo recomienda Freshman (2002), y así obtener un eyaculado de buena calidad; y con esto se evita encontrar anomalías en los espermatozoides.

### **9.5.1 Evaluación del eyaculado canino.**

Color: Este se determinó por observación directa del cono colector después de terminar la colección del semen. La coloración normal del eyaculado canino es blanco lechoso (Galina, 2006).

Motilidad: Se tomó una gota del eyaculado con una pipeta Pasteur directamente del cono colector y se colocó en un portaobjetos, fue calentado previamente en una

parrilla a una temperatura de 37°, cubriéndose inmediatamente por un porta objetos el cual también tenía la misma temperatura y se reviso en un microscopio Olympus de contraste de fases a 200X y 400X para evaluar la motilidad. Esta fue determinada por rangos como lo indica Freshman (2002), los cuales son: mayor o igual a 75% de motilidad, mayor o igual al 50%, mayor o igual al 25% y sin motilidad. Siendo la motilidad ideal mayor o igual al 75% y con movimiento progresivo (Galina, 2006).

Volumen: Se midió la cantidad del eyaculado con una pipeta estéril. El volumen del eyaculado canino es de 2 a 30 ml dependiendo del tamaño del animal (Galina, 2006).

pH: Este se midió colocando una gota de semen sobre una tira reactiva para medir pH y posteriormente se comparó con la tabla contenida en el frasco. El pH adecuado se encuentra entre el rango de 6.5 a 7 (Galina, 2006).

Concentración de espermatozoides/mL: Para calcular la concentración de espermatozoides, se realizó una dilución 1:20 esto fue adicionando 50  $\mu$ L de eyaculado de semen tomado directamente del cono colector en 95  $\mu$ L de solución fijadora (espermaticida) la cual está preparada con 1 mL de formaldehido al 35 % en 99 mililitros de solución salina fisiológica estéril (Hafez, 1993). La concentración debe ser superior a 100 millones de espermatozoides/ml (Galina, 2006).

Para realizar el conteo se utilizó un hemocitómetro de Neubauer se le colocó un cubreobjetos sobre cada una de sus dos cámaras, se tomó con una pipeta micrométrica de 10  $\mu$ L la dilución previamente homogenizada y se llenó con ella el espacio comprendido entre las cámaras y el cubreobjetos el cual es de 0.1 mm en cada una de las cámaras, se dejó reposar la preparación por 30 minutos en una cámara húmeda para que los espermatozoides sedimentaran y se realizó el conteo de las células con un microscopio de contraste de fases a 400X.

Morfología: Se colocó una gota de eyaculado previamente fijado con la solución espermática en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y posteriormente se evaluaron 200 espermatozoides al microscopio de contraste de fases a 400X de amplificación total, para el conteo de anormalidades (Hafez, 1993; Freshman, 2002)

## **9.6 Morfometría testicular**

Para medir los testículos se colocó al perro en posición vertical sobre los miembros posteriores y se midió el diámetro de ambos testículos con un vernier (Figura 2). Cabe mencionar que el examinador era el mismo en cada una de las mediciones, para evitar variables en las medidas y en los resultados.

## **9.7 Análisis estadístico**

Todas las variables de comportamiento y espermatobioscopía fueron medidas de manera repetida cada 7 días. Se elaboró una base de datos en Excel 2007 de Microsoft con los datos obtenidos de los perros con y sin tratamiento.

Utilizando el programa “SPSS 10.0 for Windows” se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Pagano, 2001) se observó que no tenían distribución normal, por lo que se analizaron los datos con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Pagano, 2001) para comparar ambos grupos.

## **10.0 Resultados**

### **10.1 Evaluación del comportamiento**

#### **Tiempo en que tardo en acercarse a la feromona**

En los perros con tratamiento en promedio el tiempo que tardaron en acercarse a la feromona artificial en la primera semana sin tratamiento fue de  $32.6 \pm 28$  segundos y para la semana ocho después del tratamiento fue de  $33.6 \pm 25.79$  segundos. Mientras que en los perros sin tratamiento en promedio el tiempo que tardaron en acercarse a la feromona artificial en la primera semana sin tratamiento fue de  $162 \pm 51.1$  segundos y para la semana ocho después de la administración del placebo fue de  $224 \pm 38.1$  segundos(Gráfica 1).

#### **Número de veces que se acercó a la feromona**

En los perros con tratamiento en promedio el número de veces que se acercaron a la feromona artificial en la primera semana sin tratamiento fue de  $2.8 \pm 0.84$  y para la semana ocho después del tratamiento fue de  $2.6 \pm 0.55$ . Mientras que en los perros sin tratamiento en promedio el número de veces que se acercaron a la feromona artificial en la primera semana sin tratamiento fue de  $10 \pm 0.6$  y para la semana ocho después de la administración del placebo fue de  $4 \pm 0.6$  (Gráfica 2).

#### **Número de veces que se acercó a la solución salina fisiológica (SSF)**

En los perros con tratamiento en promedio el número de veces que se acercaron a la SSF en la primera semana sin tratamiento fue de  $1.2 \pm 1.3$  y para la semana ocho después del tratamiento fue de  $0.8 \pm 0.84$ . Mientras que en los perros sin tratamiento en promedio el número de veces que se acercaron a la SSF en la primera semana sin tratamiento fue de  $2 \pm 0.6$  y para la semana ocho después de la administración del placebo fue de  $2 \pm 0.6$  (Gráfica 3).

## **Orina**

El número de veces que orinaron los perros al ser expuestos a la feromona se observa en el Cuadro 2.

## **10.2 Evaluación del eyaculado canino**

**Color:** Se determinó por observación directa en donde se ordenaron de mayor a menor claridad, para lo cual se dio la siguiente clasificación; blanco lechoso, blanco opaco, blanco grisáceo y cristalino (Gráfica 4 y Figura 3).

**Motilidad:** El porcentaje de motilidad se observa en la Grafica 5

**Volumen:** El volumen del semen obtenido en los perros con tratamiento paso de  $1.88 \pm 1.07$  ml en la semana cero a  $1.86 \pm 1.15$  mL en la semana ocho, en los perros testigos el volumen de semen inicial fue de  $0.9 \pm .36$  mL en la semana cero y para la semana ocho el volumen fue de  $0.83 \pm 0.28$  mL (Gráfica 6).

**pH:** En cuanto al pH no se observaron cambios en ninguno de los grupos, en todos los perros el pH se mantuvo constante comparando la medición inicial, con las mediciones subsecuentes.

En el grupo control el pH se mantuvo en promedio en 6.5, y en el grupo de animales tratados el promedio fue de 6.7 debido a que dos perros mostraron pH de 7 antes y durante el tratamiento. Al comparar ambos grupos no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos (Cuadro 1).

**Concentración de espermatozoides/ml:** En los perros testigos la concentración de espermatozoides/ml paso de  $4.4 \pm 6.4 \times 10^8$  a  $4.8 \pm 8.1 \times 10^8$  y en los perros con tratamiento la concentración de espermatozoides/ml paso de  $5 \pm 2.21 \times 10^8$  a  $4.3 \pm 1.2 \times 10^8$ . (Gráfica 7)

**Morfología:** El porcentaje de morfología normal en los perros sin tratamiento en la semana cero fue de  $82.66 \pm 2.75$  % para la semana ocho fue de  $86 \pm 5.5$  % y en los perros tratados con coumestrol en la semana cero fue de  $81.6 \pm 6.36$ % y para la semana ocho fue de  $71.60 \pm 6.22$  % (Gráfica 8).

El porcentaje de morfología anormal en los perros sin tratamiento en la semana cero fue de  $17.34 \pm 2.75$  % para la semana ocho fue de  $14 \pm 5.5$  % y en los perros tratados con coumestrol en la semana cero fue de  $18.4 \pm 6.36$ % y para la semana ocho fue de  $28.4 \pm 6.22$  % (Gráfica 9 y Figura 4)

### **10.3 Evaluación del tamaño testicular**

En cuanto al tamaño testicular no se observaron cambios en ninguno de los grupos, en todos los perros el tamaño testicular se mantuvo constante comparando la medición inicial, con las mediciones subsecuentes. Al comparar ambos grupos no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos (Cuadro 1).

## 11.0 Discusión

Los caninos machos requieren de la exposición a la testosterona antes e inmediatamente al nacimiento para poder llevar a cabo un desarrollo normal y un comportamiento sexual adecuado en la etapa adulta (Kustritz, 2005). Para que un animal responda adecuadamente a los estrógenos y a la testosterona es necesario tener la exposición previa a estos, la falta de esta exposición podría causar un retraso en la pubertad (Kustritz, 2005). Es por ello que en este estudio se utilizaron perros adultos para confirmar que tuvieran un comportamiento sexual adecuado.

Los receptores de andrógenos y de estrógenos son importantes en el control neuroendocrino del comportamiento sexual en machos (Phillips, 2008) En roedores el uso de isoflavonoides afecta el comportamiento sexual al actuar de igual forma en hipotálamo y pituitaria. En los caninos se han encontrado receptores estrogénicos alfa y beta en regiones que están relacionadas con el comportamiento sexual como son: ER $\alpha$  en el núcleo ventro medial y el hipotálamo medio (Whitten, 2001) y ER $\beta$  en el núcleo ventro medial, amígdala, bulbo olfatorio y región preóptica (Bodo and Rissman, 2006). El comportamiento de los caninos machos, como el marcaje de territorio y la agresividad pueden causar problemas de salud pública; por lo que se han hecho estudios para conocer la influencia de la castración en los comportamientos inconvenientes de los caninos machos adultos (Neilson et al. 1997)(Maarschalkerweerd et al. 1997). Estos estudios han demostrado que el comportamiento sexual inadecuado disminuyó de un 60 a 90 %, aun cuando algunos perros continuaron presentando comportamiento sexual, mientras que el marcaje de territorio disminuyó en un 16% y las agresiones en casa disminuyeron en un 26% y 52% fuera de casa; es importante mencionar que estos estudios se realizaron por medio de cuestionarios vía telefónica después de seis a doce meses de haber realizado la castración (Maarschalkerweerd, et al 1997). En un estudio en donde se administraron 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de coumestrol

durante cuatro semanas por vía oral a perros machos, se observaron cambios en el comportamiento reproductivo (Pérez-Rivero. et al 2009). En este estudio al administrar una única dosis de 600 µg/kg de coumestrol no se observaron cambios inmediatos en el comportamiento, los cambios observados en el marcaje de territorio fueron únicamente en la primera y sexta semana, en cuanto al tiempo que tardaron en acercarse a la feromona se observaron los cambios en la primera y tercera semana posterior a la administración del coumestrol y el número de veces que se acercaron a la feromona se afectó hasta la semana 8 después de la administración del coumestrol; por ello es importante mencionar que en estudios donde se evaluó el comportamiento sexual en caninos machos, se ha observado que este se desvanece poco a poco después de la castración; por lo que es adecuado valorar el comportamiento seis meses después de haber realizado la castración.

La testosterona en sangre influye en la intensidad de los estímulos olfativos, por lo que si se disminuyen los niveles de testosterona en sangre, es necesario que el estímulo sea fuerte para evocar un comportamiento (Maarschalkeweerd, et al 1997). Tomando en cuenta que el coumestrol ocupa los receptores estrogénicos y que esto tiene como consecuencia que disminuya la concentración de testosterona en sangre, sería conveniente para posteriores estudios medir la concentración de la testosterona y evaluar el comportamiento sexual exponiendo al perro con una hembra en celo para que el estímulo sea mayor; ya que de esta forma podrá realizar un examen de la libido que comprende en detectar, dominar, montar, desvainar, penetrar (Galina, 2006)

Existen estudios que mencionan las alteraciones que causan los fitoestrogenos en el tracto reproductivo de los machos como es la disminución en la maduración y motilidad de los espermatozoides en toros (Romero et al. 1997) y disminución en la cuenta de espermatozoides eyaculados en perros (Pérez-Rivero. et al. 2007). Esto es por que inhiben el desarrollo y proliferación del tracto reproductivo causando un efecto negativo en la espermatogénesis (Serrano et al. ,2007). Como en otros estudios, en este trabajo se observó que



hubo disminución en el porcentaje de motilidad en la quinta y octava semana, después de administrar el coumestrol y que aumentó el número de espermatozoides anormales. Sin embargo, en este estudio no se presentaron cambios en la concentración de espermatozoides/ml; debido a que conforme pasó más tiempo desde la administración, los animales fueron recuperando el número de espermatozoides, además de que el volumen del eyaculado no se vio afectado.

Conjuntamente no se encontraron cambios en el tamaño testicular de los perros después de la administración del coumestrol, sin embargo, otros estudios mencionan que el tamaño testicular está relacionado con la promiscuidad que puedan llegar a tener los mamíferos y no a la talla, peso o cantidad de testosterona que pueda tener el individuo (Woodall et al, 1988)

## **12.0 Conclusión**

Son pocos los trabajos que hablan del efecto que tiene el coumestrol sobre el comportamiento sexual y la espermatogénesis en caninos machos, por lo que el presente estudio proporciona información importante para conocer los efectos del coumestrol al ser administrados en dosis única. Los resultados mostraron cambios en el porcentaje de motilidad, alteraciones en la morfología espermática, y en el tiempo que tardaron en acercarse a la feromona. Sin embargo no mostraron cambios significativos en el volumen eyaculado, pH en la concentración espermática y el tamaño testicular de ambos testículos. Por lo que se puede concluir que una sola dosis de 600  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso de coumestrol no produjo cambios significativos en el comportamiento sexual, sin embargo produce cambios en el porcentaje de motilidad y morfología espermática. Por lo que sería conveniente continuar con más estudios enfocados a la dosis y frecuencia de administración del coumestrol.

### 13.0 Literatura Citada

1. 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.
2. Bichard, Stephen., Sherding Robert. Manual Clínico de Pequeñas Especies. Volumen 1, Capitulo 2. McGraw-Hill, Interamericana. México 1996:96.
3. Blank H I J. El Maravilloso Mundo de los perros. Capitulo 20. Librería de Manuel Porrúa S.A México. 1974:264-268.
4. Bodo C., Rissman E., F New roles for estrogen receptor  $\beta$  in behavior and neuroendocrinology. *Front Neuroendocrinol* 2006;27:217-232.
5. Burroughs CD. Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally with coumestrol. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208(1):78-81
6. Couse, J.F., Mahato, D. Molecular mechanism of estrogen action in the male: insights from the estrogen receptor null mice. *Reprod Fertil Dev* 2001;13:211-219.
7. Diario Oficial de la Federación el 3 de Julio del 2000 en México D.F., pag. 2.
8. Fahim, M.S., Wang M, Stucu MF, Fahim Z, Youngquist RS. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception* 1993; 47: 107-122.
9. Freshman, J.L. Semen Collection and Evaluation. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002; 17(3):104-107.
10. Galina C, Valencia J. Reproducción de Animales Domésticos. Segunda Edición, Capitulo 25, Editorial Limusa. 2006:488-495.

11. Galindo Maldonado, Trujillo Orihuela, *Etología Aplicada*, Universidad Nacional Autónoma de México; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2004 Capitulo 10 y 14.
12. Gobierno del Distrito Federal. *Primero los Pobres Universo de Salud*, Órgano de difusión de la Secretaria de Salud Del Gobierno Del Distrito Federal, volumen 3, Año 3/número 23, Septiembre del 2003.
13. Goodwin M, Gooding KM, Regner F. Sex pheromone in the dog. *Science* 1979;203:559-561.
14. Hafez ESE. Semen evaluation. In *Reproduction in farm animals*. Philadelphia, Lea&Febiger, 1993. pp 450-423.
15. Howe LM. Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 2006;66:500-509.
16. Immegart HM, Threlfall WR. Evaluation of intratesticular injection of glicerol for nonsurgical sterilization of dogs. *AJVR* 2000;61(5):544-549.
17. Johnston SD, Root Kustriz MV, Olson PNS. *Canine and Feline Theriogenology*. WB Saunders Co.: Philadelphia; 2001.
18. Kiddy CA, Mitchell DS, Hawk HW. Estrus-related odors in body fluids of dairy cows. *J Dairy Sci* 1984;67:388-391
19. Kustriz MVR. Reproductive behavior small animals. *Theriogenology* 2005;64:734-746.
20. Kutzler M A, Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 2006;66:514-525.

21. Ley de protección a los animales del Distrito Federal, disponible:  
<http://www.ordenjuridico.gob.mx/Estatal/Distritofederal/Leyes/DFLEY>
22. Maarschalkerweerd,R.J., Endenburg, N. Influence of orchietomy on canine behavior. *Vet Rec* 1997; 140: 617-619.
23. Manteca VX. Etiología clínica veterinaria del perro y del gato. Ed. Multimedia, España 2003:57-66.
24. Mertens Petra. A. Reproductive and sexual behavioral problems in dog. *Theriogenology* 2006;66:606-609.
25. Neilson, J.C., Eckstein, R.A. Effects of castration on problem behaviors in male dogs with reference to age and duration of bahavior. *J Am Vet Med Assoc* 1997 15;211(2):180-182
26. Opalka M, Kaminska B, Piskula MK, Puchajda-Skowronska H, Dusza I. Effects of phytoestrogens on testosterone secretion by Leyding cells from Bilgoraj ganders. *Br Poult Sci* 2006 47(2):237-245.
27. Oscar Velázquez, Conferencia de prensa sobre “La semana nacional de vacunación antirrábica ofrecida por el Doctor Oscar Velázquez Monroy, Director general del centro nacional de vigilancia epidemiológica y control de enfermedades de la secretaria de salud; 24 de Marzo 2006, disponible:  
[http://www.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala\\_noticias/discursos/2006\\_03\\_24-perros.htm](http://www.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala_noticias/discursos/2006_03_24-perros.htm)
28. Pagano, M. Y Gauvreau, K.: Fundamentos de Bioestadística. 2ª ed. Thomson Learning. México. 2001.
29. Pérez Rivero, J.J., Aguilar-Setién, A., et al. Los fitoestrogenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos. *Agricultura Técnica (Chile)* 2007;67(3):324-331.

30. Pérez Rivero, J.J., Martínez Maya, J.J. et al. Phytoestrogen treatment induces testis alterations in dogs. Potential use in population control. *Vet Res Commun* 2008 Jan;33(1):87-95.
31. Pérez Rivero, J.J., Martínez Maya, J.J. et al. Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral. *Vet Mex* 2009;40(1)
32. Phillips-Farfán. B.V., Romano-Torres M. Anabolic androgens restore mating after sexual satiety in male rats. *Pharmacology, Biochem and Be* 2008;89:241-246.
33. Robinson-Rechavi M, Escribia H, Laudet V. The Nuclear Receptor Superfamily. *Journal of cellscience* 2003;116:585-586.
34. 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.
35. Serrano H., Pérez-Rivero J.J, et al. Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:470-472.
36. Sorribas C.E, Atlas de reproducción canina. Ed. Inter-médica 2005: 117-236.
37. Suk Kim, Dong Soo. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex Nested PCR. *J Vet Med Sci* 2006;68(6):615-618.
38. Torres Villegas Claudia. P, "Distribución, abundancia y comportamiento de perros y gatos en la isla de Cozumel", Tesis de Maestría UNAM 2006.
39. Whitten Patricia L., Patisaul H.B. Neurobehavioral actions of coumestrol and relates isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol Teretd* 2002;24:47-54.

40. Woodall P. F., Johnstone I. P. Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). J Reprod Fertil Suppl 1988;82:603-609.

## 14.0 Cuadros y figuras

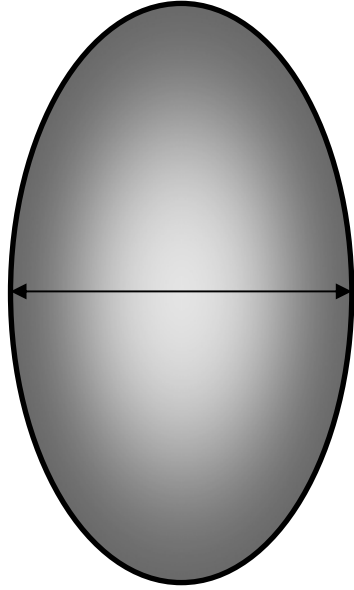


**Figura 1.** Escala diseñada por Proplan\* para evaluar la condición corporal en perros.

Esta tabla es utilizada por Proplan\* para evaluar la condición corporal óptima en perros. La condición adecuada se encuentra entre la escala 4 y 5, en donde las costillas son fáciles de palpar, cintura visible y abdomen contraído.

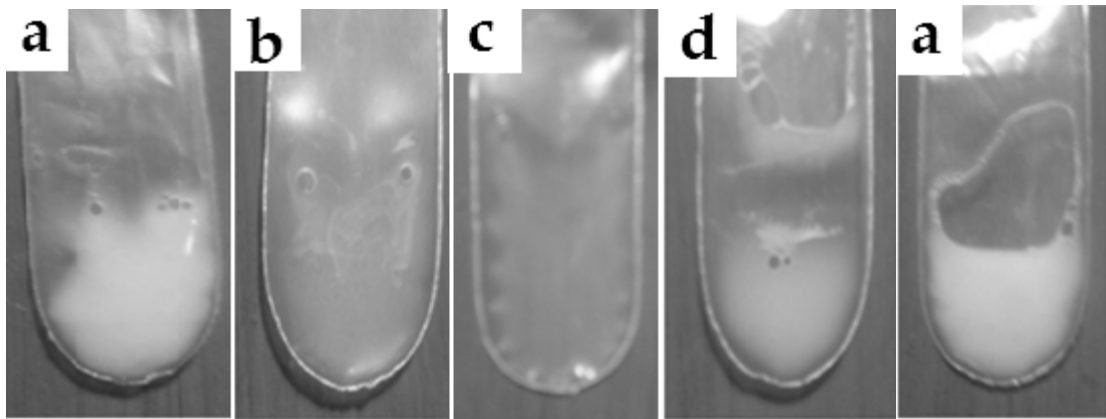
\*Empresa dedicada a la elaboración de alimento para pequeñas especies





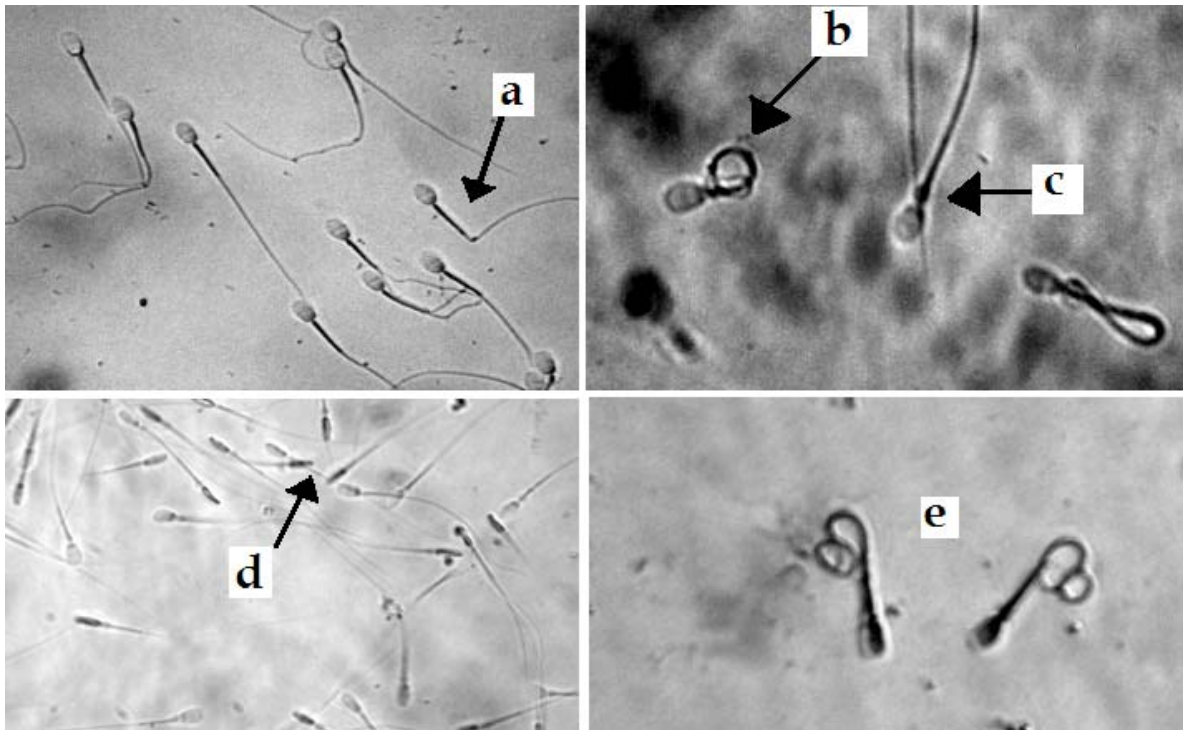
**Figura 2. Morfometría testicular.**

El diámetro testicular se midió colocando el vernier en la parte media del testículo hasta llegar al primer tope del vernier.



**Figura 3. Evaluación de la coloración del semen eyaculado de los perros tratados con coumestrol.**

En esta figura se observa el cambio que tiene el color del semen de los animales tratados con coumestrol; inicialmente se observaba blanco lechoso (a) esto es cuando al animal aún no se le proporcionaba el tratamiento, una semana después de haber proporcionado el tratamiento este se observaba blanco opaco (b), solo en uno de los animales tratados de observo el color cristalino (c) y con forme avanzaron las semanas este se torno blanco grisáceo (d), en cuanto más se alejaban las observaciones a la semana de tratamiento, estos fueron recuperando el color inicial blanco lechoso (a).



**Figura 4. Alteraciones en la morfología espermática en los perros tratados con coumestrol.**

- (a) Espermatozoide con cola doblada, (b) Espermatozoide con nudo proximal,
- (c) Espermatozoide con gota proximal, (d) Espermatozoide con cabeza de flama,
- (e) Espermatozoides con nudo distal.

	SEMANAS								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Evaluación del Eyaculado</b>									
% Motilidad	P 0.43	P 0.01	P 0.01	P 0.01	P 0.04	P 0.23	P 0.43	P 1.0	P 1.0
Volumen	P 0.29	P 0.36	P 0.44	P 0.44	P 0.36	P 0.36	P 0.29	P 0.36	P 0.29
pH	P 0.23	P 0.23	P 0.60	P 0.23	P 0.60	P 0.23	P 0.23	P 0.23	P 0.23
[ ]/ml	P 0.45	P 0.88	P 0.05	P 0.29	P 0.10	P 0.65	P 0.88	P 0.45	P 0.65
Morfología normal	P 0.76	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.45
Morfología anormal	P 0.76	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02	P 0.02
<b>Evaluación del Comportamiento</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAF	P 0.36	P 0.02	P 0.25	P 0.02	P 0.10	P 0.05	P 0.10	P 0.05	P 0.10
NVAF	P 0.33	P 0.32	P 0.43	P 0.63	P 0.15	P 0.87	P 0.12	P 0.87	P 0.04
NVASSF	P 0.63	P 0.49	P 0.51	P 0.19	P 0.49	P 0.86	P 0.73	P 0.19	P 0.87
<b>Morfometría Testicular</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Tamaño Testicular Der.	P 0.29	P 0.29	P 0.29	P 0.29	P 0.29	P 0.29	P 0.29	P 0.29	P 0.29
Tamaño Testicular Izq.	P 0.44	P 0.65	P 0.65	P 0.65	P 0.65	P 0.65	P 0.65	P 0.65	P 0.65

[ ]/ml= Concentración de espermatozoides/ml

TAF=Tiempo que tardo en acercarse a la feromona

NVAF= Número de veces que se acerco a la feromona

NVASSF= Número de veces que se acerco a la SSF

Izq=Izquierdo

Der=Derecho

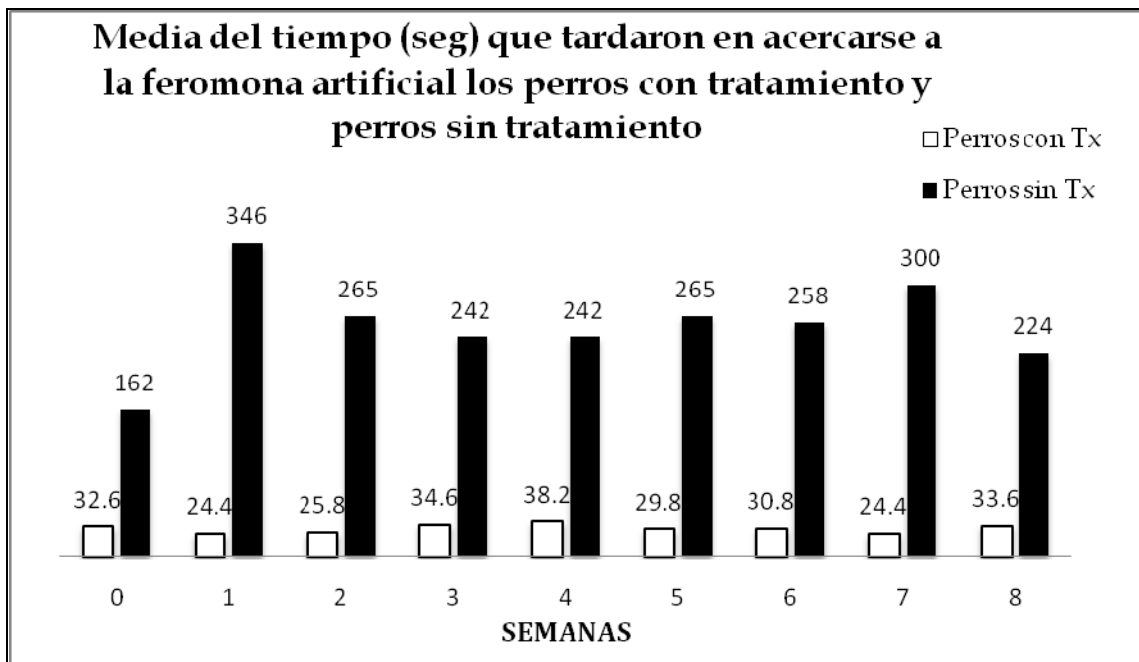
**Cuadro 1. Resultados de la Prueba de Mann-Whitney**

Perros con o sin Tx	Orino	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
Con Tx	Si	3	1	2	3	3	2	4	3	3
	No	2	4	3	2	2	3	1	2	2
Sin Tx	Si	3	2	1	1	2	2	1	2	1
	No	0	1	2	2	1	1	2	1	2

**Cuadro 2. Número de veces que orinaron los perros al ser expuestos a la feromona artificial**

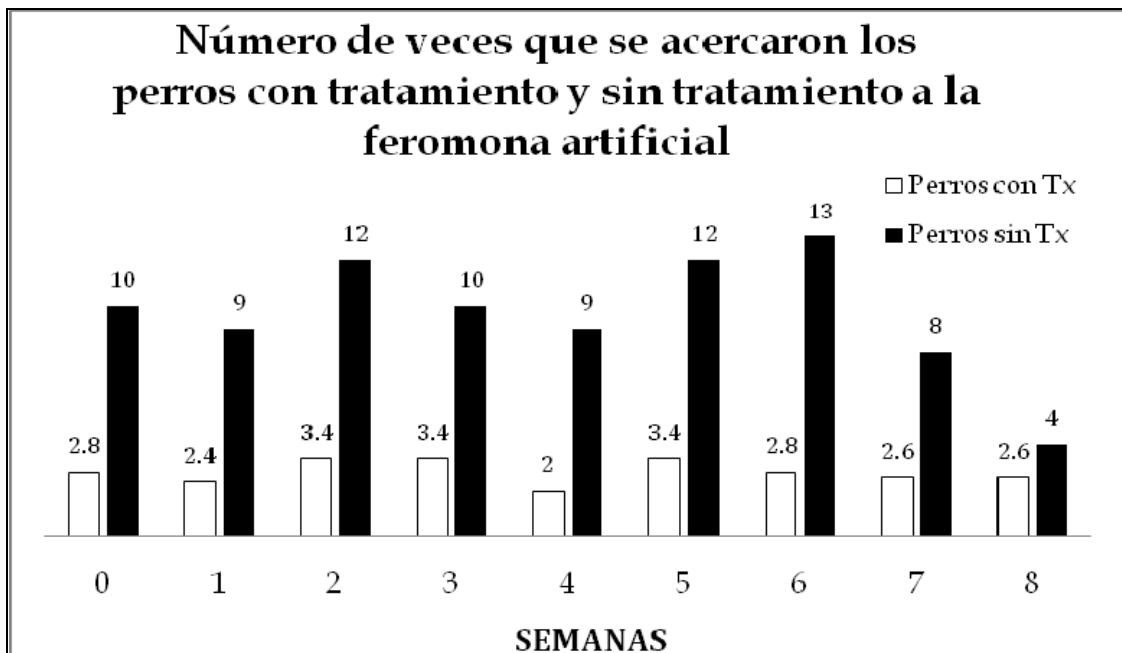
En este cuadro se observa que los perros con tratamiento al ser expuestos a la feromona artificial disminuyeron el número de veces que orinaron en la primera y sexta semana, después de haber administrado el coumestrol.

En los perros que se administró el placebo no se observó mucha variación en cuanto al número de veces que orinaron.



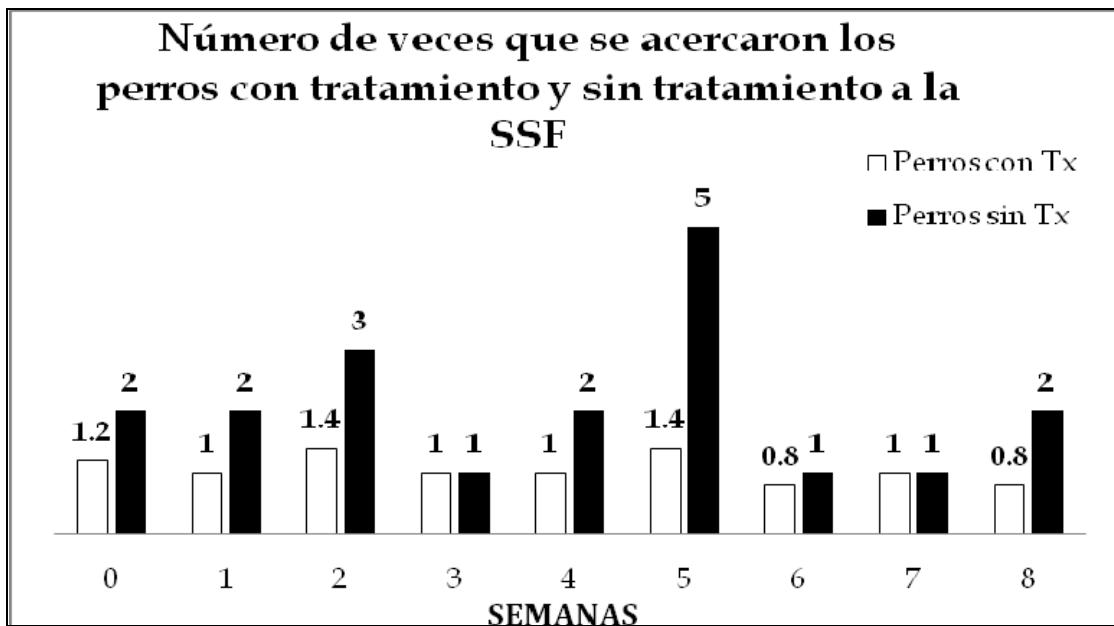
**Gráfica 1. Media del tiempo (segundos) que tardaron en acercarse a la feromona artificial los perros con tratamiento y perros sin tratamiento**

Al comparar el grupo de animales tratados con los animales sin tratamiento solo se encontró diferencia significativa en la primera semana después del tratamiento y en la tercera semana ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 1).



**Gráfica 2. Número de veces que se acercaron los perros con tratamiento y sin tratamiento a la feromona artificial.**

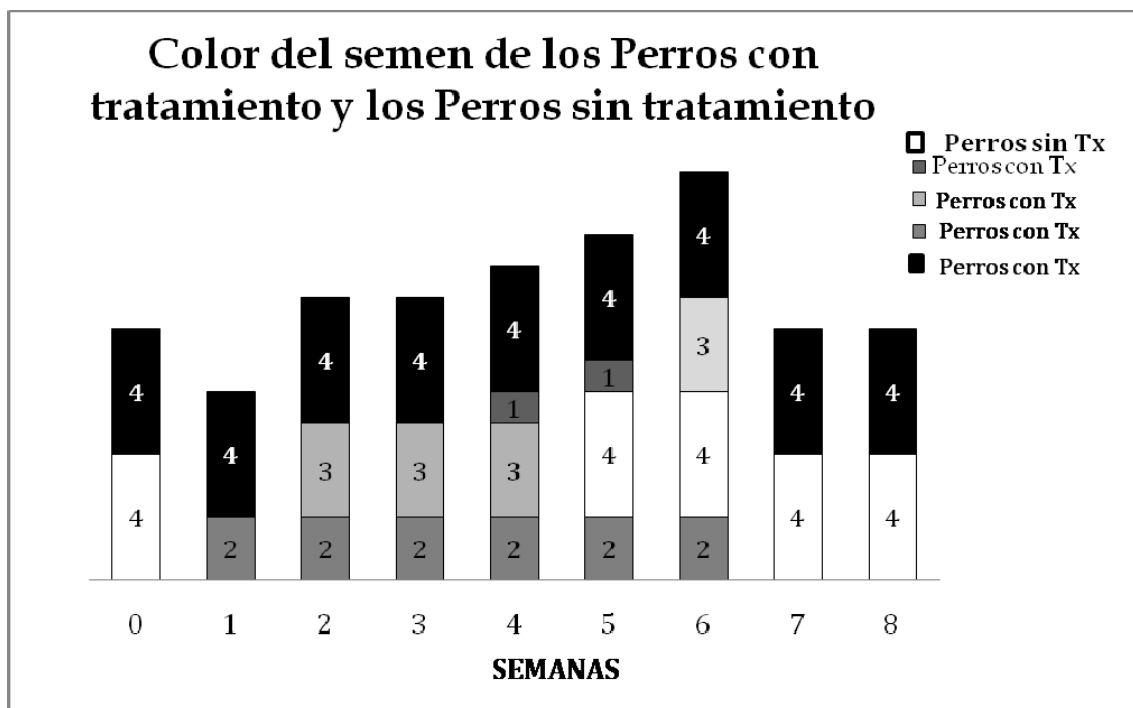
Al comparar el grupo de animales tratados con los animales sin tratamiento solo se encontró diferencia significativa en la semana 8 ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 1).



**Gráfica 3. Número de veces que se acercaron los perros con tratamiento y sin tratamiento a la solución salina fisiológica.**

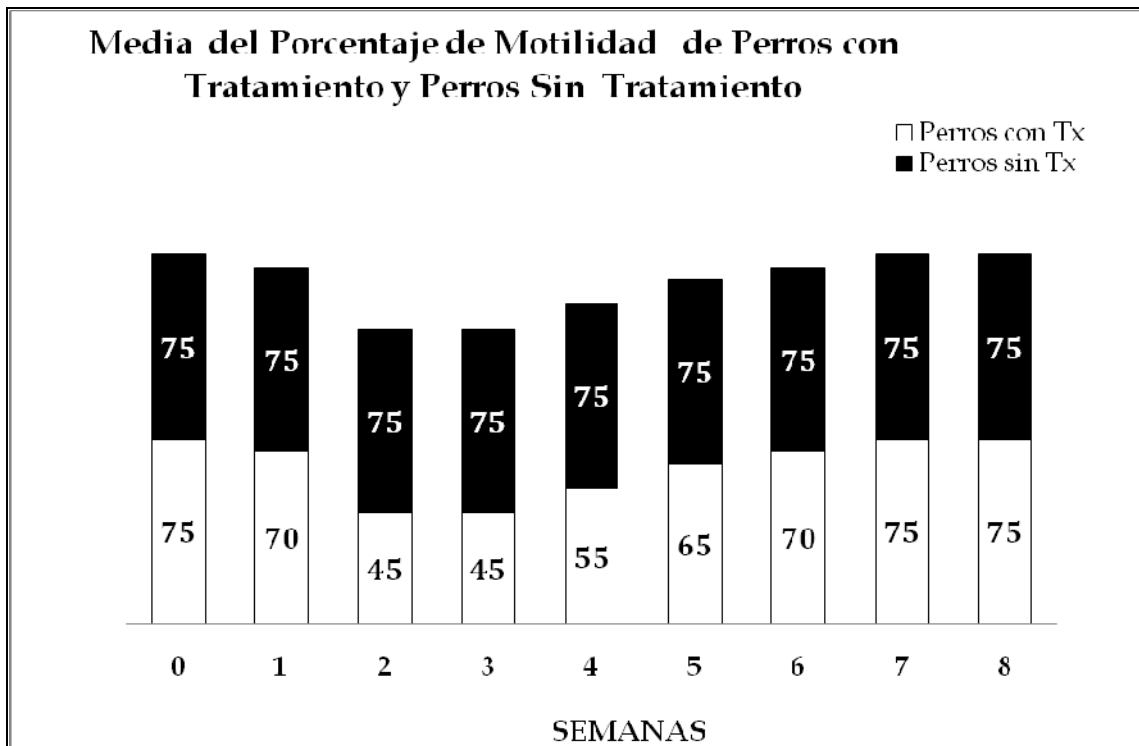
Al comparar el grupo de animales tratados con los animales sin tratamiento no se encontró diferencia significativa en ninguna de las semanas ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 1).





**Gráfica 4. Evaluación de la coloración del semen eyaculado de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.**

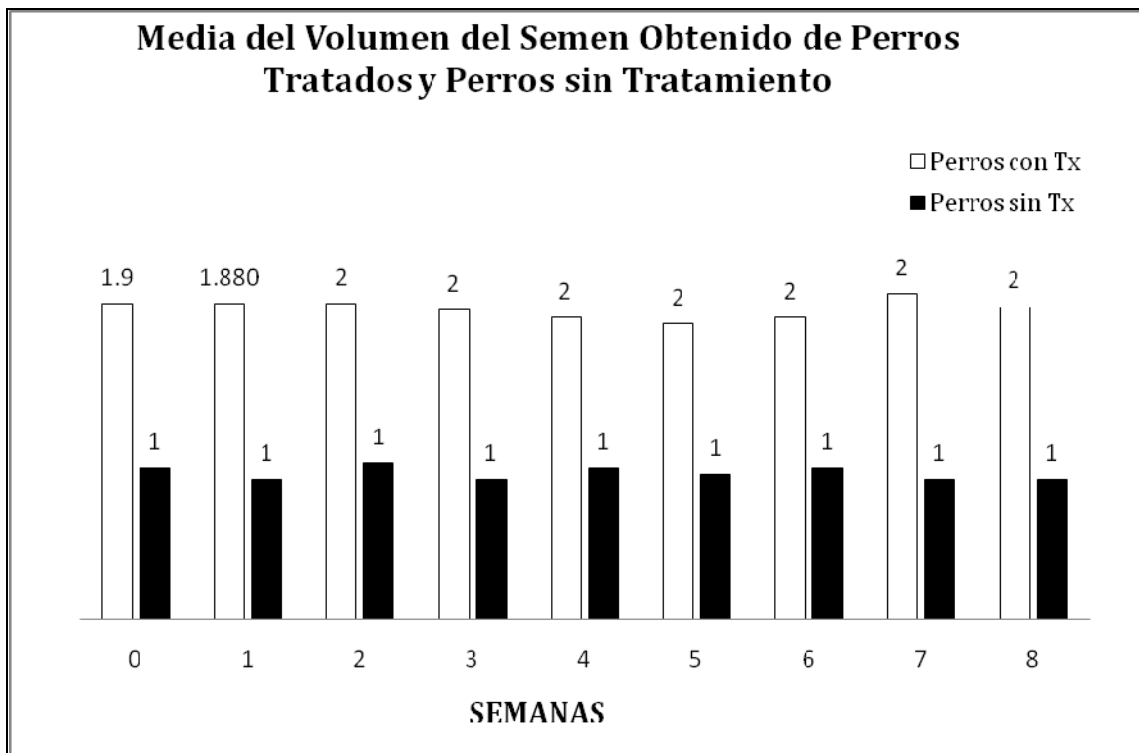
En los animales que no recibieron tratamiento no se encontraron cambios en la coloración del semen; en las semanas subsecuentes a la administración del placebo, este se mantuvo constante con un color blanco lechoso. En cuanto a los animales tratados se observó el cambio de coloración en el semen eyaculado (Figura 3).



**Gráfica 5. Evaluación del porcentaje de motilidad de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.**

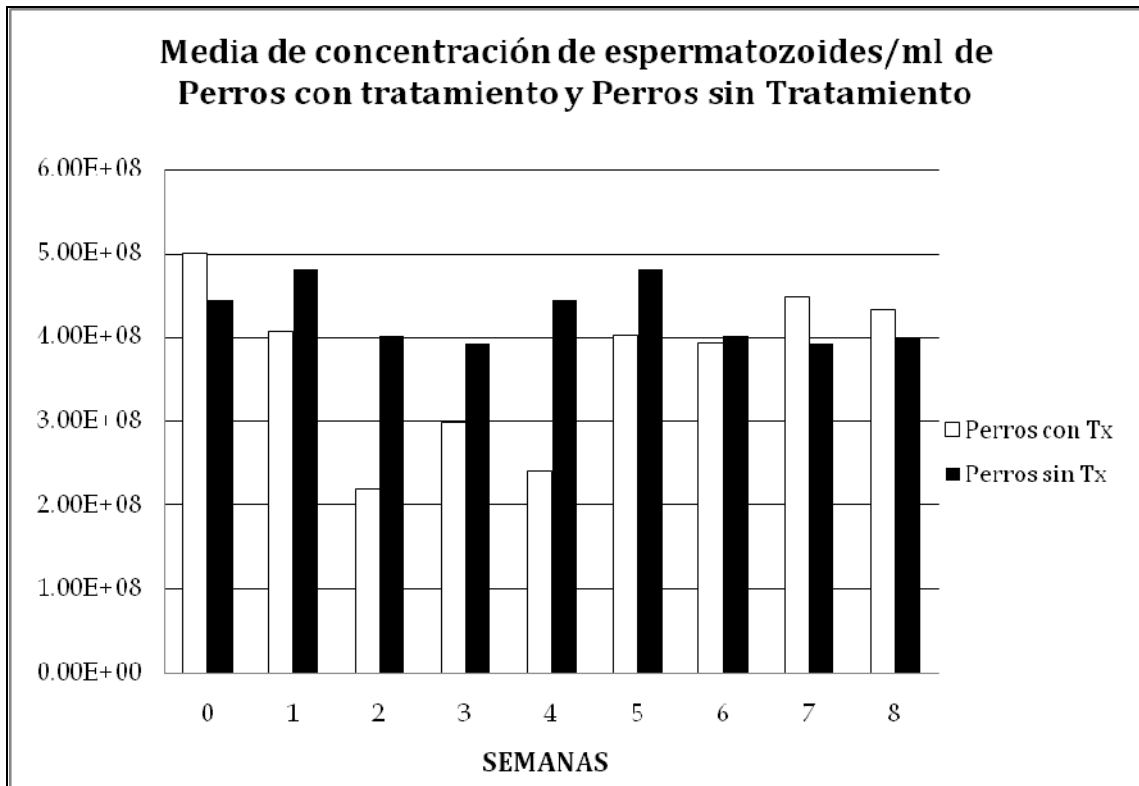
La motilidad inicial fue mayor o igual al 75% en ambos grupos; después de administrar el coumestrol en los perros tratados, la motilidad fue disminuyendo gradualmente a partir de la primera semana, en cuatro de los cinco perros tratados la disminución fue hasta de un 50% y solo uno presentó una disminución mayor o igual al 25%. Lo cual mostró una diferencia significativa de la primera semana hasta la cuarta semana ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 1). Cerca de la sexta semana posterior a la administración del coumestrol, los perros fueron recuperando la motilidad inicial; por lo que en la semana nueve ya se observaba una motilidad mayor o igual al 75%. Lo cual no mostró una diferencia significativa de la quinta a la octava semana ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 1)

En el caso de los perros testigo después de administrar el placebo el porcentaje de motilidad se mantuvo constante de mayor o igual al 75% durante las 8 semanas posteriores a la administración del placebo.



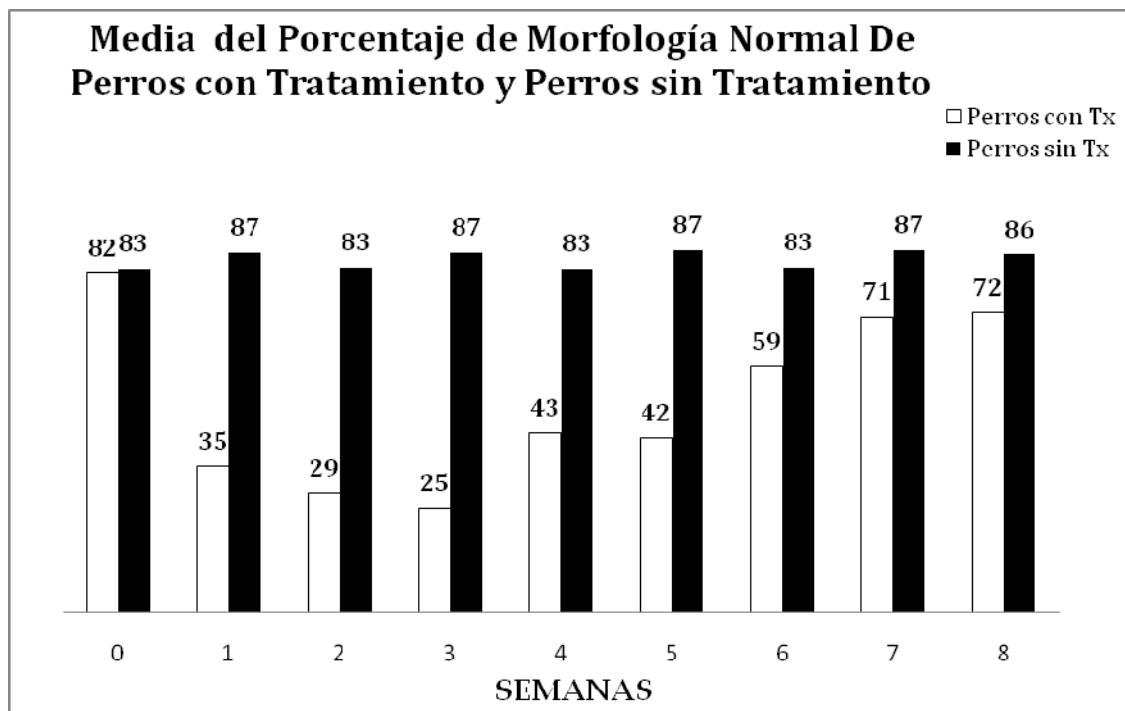
**Gráfica 6. Media del volumen del semen obtenido de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.**

En relación al volumen no se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de animales tratados con los animales testigos ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 1).



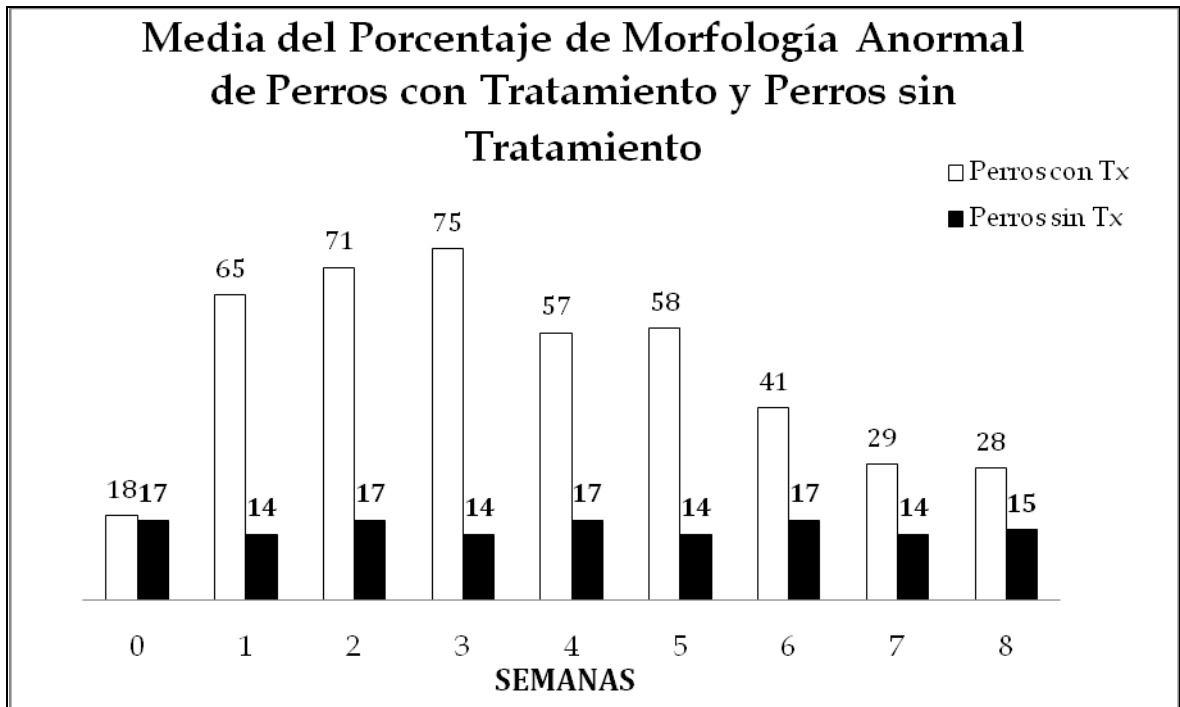
**Gráfica 7. Media de concentración espermatozoides/ml de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.**

Al comparar el grupo de animales tratados con los animales sin tratamiento no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 1).



**Gráfica 8. Media del porcentaje de morfología normal de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.**

Al comparar el grupo de animales tratados con los animales sin tratamiento se encontró diferencia significativa entre ambos grupos desde la semana 1 hasta la semana 8 ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 1).



**Gráfica 9. Media de porcentaje de morfología anormal de los perros tratados con coumestrol y los perros sin tratamiento.**

Al comparar el grupo de animales tratados con los animales sin tratamiento se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 1).