

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

INHIBICIÓN DE LA OVULACIÓN EN PALOMAS (*Columba livia*) POR MEDIO DE
LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE UN ANTAGONISTA DE TESTOSTERONA O
UN INHIBIDOR DE AROMATASA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JOSÉ ANTONIO SOLANO GARCÍA

ASESORES

Dra. Lucía Eliana Rangel Porta

Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar

México, DF.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, fruto de la culminación de mis años de estudio y preparación como universitario, a todos aquellos que de manera directa o indirecta intervinieron en mi desarrollo, tanto profesional como personal, para llegar a este punto y convertirme cada día en un mejor ser humano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sobre todo y de manera muy especial a mi familia, por apoyarme en cada decisión e impulsarme siempre a seguir creciendo.

También quiero expresar mi gratitud a la Dra. Lucía E. Rangel Porta, quien me asesoró en cada paso para el desarrollo de este trabajo, porque sin su guía no me habría sido posible concluir de manera satisfactoria este proyecto, por enseñarme que debo cuestionarlo todo y seguirme preparando siempre pero, sobre todo, por mostrarme lo hermosa e interesante que puede ser la investigación.

De igual modo agradezco todo el apoyo y enseñanzas recibidas, de forma directa e indirecta, de mis demás profesores y amigos, ya que con su ayuda me ha sido posible trabajar diariamente para convertirme en mejor persona y médico.

Agradezco de manera particular a todas aquellas personas que de alguna manera tomaron medidas para dificultar mi desarrollo, ya que gracias a ello he aprendido a no dejarme vencer por ningún obstáculo, sin importar lo difícil que este sea.

Por último, agradezco a todos los seres con plumas que he tenido la fortuna de encontrar en mi práctica como profesional, por ayudarme a ser mejor médico veterinario.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Reproducción de las palomas.....	3
Esteroidogénesis.....	4
Endocrinología.....	5
Contracepción.....	8
HIPÓTESIS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
Establecimiento de dosis.....	12
Efecto de la medicación repetida en una dosis semanal.....	13
Efecto de la medicación repetida cada tercer día o diariamente.....	14
Consumo voluntario.....	15
RESULTADOS.....	16
Establecimiento de dosis.....	16
Efecto de la medicación repetida en una dosis semanal.....	17
Efecto de la medicación repetida cada tercer día o diariamente.....	18
Consumo voluntario.....	19
DISCUSIÓN.....	21
REFERENCIAS.....	25

RESUMEN

SOLANO GARCÍA JOSÉ ANTONIO. Inhibición de la ovulación en palomas (*Columba livia*) por medio de la administración oral de un antagonista de testosterona o un inhibidor de aromatasa (Bajo la dirección de: Dra. Lucía Eliana Rangel Porta y Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar).

En la convivencia entre humanos y animales, algunos de estos últimos son considerados plagas debido a su excesiva población ya que son causantes de daños económicos, ambientales o epidemiológicos. Debido a esto se ha intentado desarrollar métodos para controlar el crecimiento de poblaciones aviares nocivas. Sin embargo, estos métodos presentan inconvenientes como baja eficiencia, vías de administración de difícil acceso y daños colaterales. Por tal motivo, este trabajo tuvo el propósito de probar dos medicamentos que mediante una administración sencilla puedan inhibir la postura en palomas.

Se realizaron tres estudios para establecer las dosis adecuadas y la frecuencia de administración de los medicamentos: letrozol (un inhibidor de aromatasa) y flutamida (un antagonista de testosterona). La medicación se realizó por vía oral en hembras adultas con historial previo de ovoposición. Se determinó el efecto del tratamiento sobre la postura, durante y después del tratamiento. El cuarto experimento tuvo el objetivo de evaluar el medicamento que mejores resultados presentó en los estudios previos, mezclándolo con el alimento para determinar el consumo voluntario y su efecto sobre la postura y el desarrollo folicular.

Los resultados mostraron que la medicación con flutamida no logró inhibir exitosamente la postura en palomas con las dosis y esquemas de administración evaluados, mientras que el letrozol siempre causó reducciones significativas en la postura de los animales tratados. Finalmente, con una administración diaria de 0.5 mg de letrozol en 30 g de alimento por animal durante un mes, se logró inhibir el desarrollo folicular, evitando la postura en promedio hasta por 45 días después de terminado el tratamiento. Con estos resultados se puede mostrar que la medicación con letrozol es eficiente para controlar la reproducción en palomas.

INTRODUCCIÓN

Los asentamientos humanos han desestabilizado algunas poblaciones animales, las cuales en ciertos casos son consideradas como plagas debido a que causan daños económicos, ambientales o a la salud de animales y personas. Entre las especies consideradas plagas se encuentran diferentes vertebrados, incluyendo algunas aves que se consideran nocivas debido a que pueden afectar cultivos, transmitir enfermedades tanto a animales como a humanos y causar daños a los inmuebles en los que anidan (Del Villar-González, 2000).

Entre las aves consideradas como plagas se encuentran las palomas, que pertenecen a la familia *Columbidae*. Estas aves son animales de hábitos diurnos que pueden llegar a vivir más de diez años y tienen una gran capacidad de proliferación (Del Hoyo, *et al.*, 1997). Debido a su rusticidad se adaptan con éxito a varios tipos de climas y sobreviven fácilmente en lugares públicos (Sharp, 1996).

Las palomas pueden transmitir diversas enfermedades al hombre, como tuberculosis, salmonelosis, clamidiosis y campilobacteriosis, entre otras (Acha, 2003 (a); Acha, 2003 (b); Yuri, *et al.*, 2011). Además, facilitan la diseminación de enfermedades aviares como la enfermedad de Newcastle, las infecciones por herpesvirus y la encefalitis de San Luis, entre otras (Tudor, 1991; Aldous, *et al.*, 2004; Marlier y Vindevogel, 2006; Torres, *et al.*, 2008).

Debido a lo anterior se han desarrollado diversos métodos de control de la población de aves nocivas. Sin embargo, su eficiencia es limitada, pueden causar problemas a la salud de los animales y su administración implica un manejo

directo de las aves. Este trabajo está orientado a encontrar un método químico efectivo y de fácil administración para la anticoncepción en palomas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Reproducción de las palomas

Las palomas, al ser sedentarias, tienen periodos de reproducción más prolongados (todo el año) que las especies migratorias, las cuales presentan periodos reproductivos estacionales (Dijkstra, *et al.*, 2010). Además, no cuentan con un periodo de fotorrefractoriedad como el de otras aves, por lo cual pueden reproducirse en cualquier momento del año, dependiendo la disponibilidad de alimento (Del Hoyo, *et al.*, 1997; Dijkstra, *et al.*, 2010).

Esta especie pone de uno a dos huevos por ciclo ovulatorio (Del Hoyo, *et al.*, 1997; Dijkstra, *et al.*, 2010), con un intervalo de 40 a 44 hrs entre ovoposiciones (Whitton, 2000; Pollock y Orosz, 2002). Si los huevos se retiran prematuramente, el intervalo entre una postura y otra es de diez días en promedio (Askew, *et al.*, 1997). En la incubación de los mismos, que dura de 16 a 19 días, participan ambos padres (Vatnick y Foertsch, 1998). Quince días después de la eclosión de los pichones la hembra es capaz de poner otros dos huevos fértiles, de forma que puede cuidar a los pichones al mismo tiempo que incuba una nueva nidada (Del Hoyo, *et al.*, 1997). Por otro lado, cuando las hembras se encuentran separadas de los machos, el ingreso de estos a la parvada estimula el desarrollo folicular y la ovulación, la cual normalmente ocurre diez días después (Whitton, 2000).

Los pichones al nacer son ciegos y tienen un fino plumón. Durante los primeros tres días de vida son alimentados únicamente con una sustancia producida en el buche de los padres conocida como “leche de buche”. Al cuarto día comienzan una alimentación sólida a base de granos siendo asistidos por los padres durante los primeros 30 días de vida (Del Hoyo, *et al.*, 1997). Abandonan el nido entre los 35 y 37 días de edad, alcanzando la madurez sexual entre los tres y los cinco meses de edad (Askew, *et al.*, 1997). Al año, una pareja puede llegar a tener en promedio de 12 a 14 pichones, pero se han registrado hasta 22 (Del Hoyo, *et al.*, 1997).

Esteroidogénesis

La producción de esteroides gonadales es esencial en el proceso reproductivo de las aves. Al igual que en mamíferos, la síntesis de esteroides inicia con el colesterol, el cual es transportado a la membrana interna de la mitocondria por la proteína StAR, donde es convertido en pregnenolona por medio de la citocromo P-450_{scc}. Posteriormente, es transformada en progesterona debido a la acción de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; la 17 α -hidroxilasa convierte a la progesterona en 17 α -hidroxiprogesterona, la cual posteriormente es transformada en androstenediona. La 17-hidroxiesteroide-deshidrogenasa actúa sobre la androstenediona para producir testosterona, la cual es transformada por la enzima aromatasa a estradiol (Mathews, 2002; Gómez *et al.*, 1998).

Las hormonas esteroides participan tanto en el proceso ovulatorio, como en el desarrollo folicular, por lo que la alteración de su producción y/o de su acción

puede ser un método eficiente para controlar la reproducción de las aves (Etches, *et al.*, 1983).

Endocrinología

Las aves en general son animales estacionales, que se reproducen principalmente en primavera y verano, cuando los días son más largos (Etches, *et al.*, 1983). Sin embargo, debe considerarse que en lugares cercanos al Ecuador existen aves que se denominan oportunistas, ya que pueden reproducirse todo el año mientras la disponibilidad de alimento y las condiciones climáticas sean adecuadas (Sharp, 1996).

La estacionalidad reproductiva está controlada por la duración diaria de la estimulación con luz, a esto se le conoce como fotoperiodo. En la respuesta al fotoperiodo participan en forma cíclica tres estados fisiológicos básicos: Fotosensibilidad, fotoestimulación y fotorrefractoriedad (Hahn, 2004).

- En la fotosensibilidad el sistema neuroendocrino es sensible a la estimulación de la luz, la cual cuando los días son demasiado cortos (otoño e invierno) no causa una estimulación reproductiva (Hahn, 2004).
- Durante la fase de fotoestimulación el fotoperiodo supera la estimulación umbral y la activación neuroendocrina comienza. En un estudio reciente realizado en pavos se encontró que la luz estimula directamente al hipotálamo, específicamente a nivel de las neuronas DA – MEL, las cuales se encargan de producir melatonina (durante horas de oscuridad) y dopamina (durante horas de luz), sugiriéndose que esta melatonina local controla la estacionalidad en

aves (El Halawani, *et al.*, 2009). Por otro lado, cuando las concentraciones de melatonina se elevan se produce la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) la cual se encarga de inhibir la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por ende, las concentraciones de la hormona luteinizante (LH) disminuyen, de esta forma se ve disminuida la actividad reproductiva. Cuando las horas de luz aumentan baja la liberación de melatonina y se incrementa la secreción de dopamina, que estimula la producción de GnRH (El Halawani, *et al.*, 2009; Tsutsui, *et al.*, 2012). Una vez que aumenta la concentración de GnRH los niveles sanguíneos de LH también se muestran un incremento.

- En el periodo de fotorrefractoriedad la estimulación prolongada a los días largos provoca una disminución en la actividad del eje reproductivo, que incluye la involución de las gónadas (Hahn, 2004). Se ha propuesto que lo anterior ayuda a las especies de aves migratorias, al minimizar la masa de los órganos reproductivos cuando no son esenciales (Dawson y Sharp, 2007).

A pesar de que en México los cambios estacionales no son tan evidentes, algunas especies de aves continúan siendo afectadas por el fotoperiodo, como el caso de las gallinas que requieren incrementos en la cantidad de horas luz, para aumentar su reproducción (Quintana, 2011). Sin embargo, las palomas no son muy influenciadas por el fotoperiodo, lo cual, aunado a las condiciones de sedentarismo de la especie les permite reproducirse a lo largo de todo el año en nuestro país, con dos picos en primavera y otoño (Mejía, 2014).

Para el desarrollo folicular, la GnRH induce la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la LH, las cuales estimulan el desarrollo de los folículos prejerárquicos y jerárquicos. En el caso de la gallina los niveles de FSH aumentan 15 horas antes de la ovulación, mientras que los de LH comienzan a incrementarse en las tres semanas previas a la primera ovulación, y existe un pico entre seis y ocho horas antes de la ovulación (Pollock y Orosz, 2002). La LH sirve para estimular la producción de esteroides foliculares (Etches, *et al.*, 1983). El estradiol el principal producto de los folículos prejerárquicos y alcanza un pico entre seis y ocho horas antes de la ovulación, mientras que los folículos jerárquicos, principalmente el folículo preovulatorio, producen mayor cantidad de progesterona (Robinson y Etches, 1986). Por otro lado, la testosterona es producida por ambos grupos foliculares, su secreción se incrementa con la madurez folicular, siendo el tercer folículo jerárquico el principal productor (Robinson y Etches, 1986; Rangel, *et al.*, 2014). El pico de testosterona se presenta entre seis y ocho horas antes de la ovulación (Pollock y Orosz, 2002).

El estradiol sensibiliza al hipotálamo para que la progesterona actúe y de esta forma la concentración de progesterona se va incrementando una semana antes de la ovulación, y al igual que la LH tiene un pico entre seis y ocho horas antes de la ovulación. De hecho el pico de progesterona es necesario para que se presente el pico de LH, interactuando en un sistema de retroalimentación positiva (Johnson, *et al.*, 1985; Sharp, *et al.*, 1990). La testosterona estimula la producción y, por ende, el pico de progesterona; además de inducir la expresión de StAR, de P450scc y de los receptores para LH en las células de la granulosa en el folículo preovulatorio (Rangel, *et al.*, 2009; 2014). Entre 15 a 30 minutos antes de la

ovulación se libera prostaglandina F2 α de los folículos jerárquicos, causando contracciones uterinas preovulatorias (Pollock y Orosz, 2002).

Contracepción

Debido al creciente aumento de ciertas poblaciones aviares, incluidas las palomas, se han buscado distintas maneras de inhibir su reproducción y manipular los procesos demográficos con el fin de influir en la trayectoria de una población determinada (Elphick, *et al.*, 2007). La tendencia actual de estos métodos está enfocada a no dañar el medio ambiente, no afectar la salud de los individuos tratados, ser reversible, así como facilitar su administración y acceso.

Dentro de los métodos químicos se han probado varios medicamentos para tratar de controlar o impedir la postura en las aves; estos métodos entre los que se encuentran hormonales, inhibidores de la esteroidogénesis y algunos antagonistas. A continuación se mencionan algunos de ellos.

Hormonales

- ***Levonorgestrel***. Es un progestágeno que al ser inyectado en una sola dosis de 40mg/Kg en codornices inhibió la postura durante 67.1 días en promedio. A pesar de que en otras especies se han reportado efectos secundarios de éste medicamento, como el aumento de peso, la lipidosis hepática y la diabetes mellitus, ninguno de estos efectos fue observado en las codornices (Tell, *et al.*, 1999).
- ***Acetato de Medroxiprogesterona***. Tell *et al.*, en 1999, lograron inhibir la postura en cinco de siete codornices durante 5.8 ± 2.3 días, mientras que

en las dos restantes la inhibición duró 19 y 49 días. El progestágeno se administró por vía intramuscular en una sola ocasión en dosis de 40mg/Kg. En dicho trabajo no se encontraron efectos secundarios. Sin embargo, otros investigadores han descrito efectos adversos en aves como: aumento de peso, letargo, lipidosis hepática, poliuria, polidipsia, tromboembolias, inmunosupresión y eventual cirrosis, mencionándose que los efectos pueden ser transitorios o permanentes (Joyner, 1994).

- **Ornisteril.** Es un progestágeno que administrado en el alimento (maíz) a una concentración de 0.1%, y proporcionado en dos periodos al año durante 150 días en total, disminuyó en 49.1% la población de palomas en Ljubljana, Slovenia, en un periodo de cinco años (1999 – 2004) (Dobeic, 2011).

Inhibidores de la esteroidogénesis

- **20,25-Diazacolesterol.** Éste compuesto inhibe la formación de esteroides al bloquear la formación del colesterol. Cuando se administró a codornices en una concentración del 0.1% en el alimento, disminuyó la postura en un 80–90% (Johnston, *et al.*, 2003). Sin embargo, en ocasiones se pueden observar signos de intoxicación como apatía, pérdida de peso, dificultad para respirar, ataxia, lipidosis hepática y muerte (Yoder, *et al.*, 2004).
- **Fadrozol.** Es un inhibidor de aromatasa que en canarios disminuye la respuesta de las hembras ante el canto del macho, así como la postura, al ser administrado una vez al día por vía subcutánea, durante 10 días, a una dosis de 50µg (Leboucher, *et al.*, 1998).

Antagonistas

- **Tamoxifen.** Este antagonista de estradiol es utilizado para el tratamiento de cáncer mamario en mujeres. El tamoxifen Inhibe el ciclo reproductivo en gallinas, cuando se administra a una dosis de 2mg/Kg IM, aplicado cada 24 hrs (Wilson y Cunningham, 1981). Sin embargo, Lupu, en el 2000, encontró que dicha dosis de tamoxifen indujo leucopenia en la mayoría de los periquitos australianos tratados.

Además de la presentación de efectos secundarios adversos en los tratamientos químicos administrados para el control de las aves, se encuentra el inconveniente de la necesidad de realizar administraciones inyectadas, que en muchas ocasiones son repetidas.

Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento oral de un antagonista de testosterona y de un inhibidor de aromatasa, administrados en forma separada, en hembras de palomas para Inhibir la ovoposición.

Hipótesis

La administración de flutamida o letrozol por vía oral inhibirá la postura en hembras de paloma mensajera (*Columba livia*).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el palomar del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se utilizaron 30 parejas de palomas mensajeras (*Columba livia*) adultas y con historial de nidadas previas. Cada pareja se mantuvo en un cubículo de madera de 30 cm * 40 cm * 30 cm, con un nido de plástico, sustrato de periódico y fibra de coco, para facilitar la reproducción y posteriormente la postura. Los alojamientos se limpiaron diariamente y se permitió a los individuos salir para entretenimiento, así como ser liberados una vez por semana para socializar y bañarse.

Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*, excepto en el último estudio en donde se controló la cantidad exacta de alimento ofrecido. Se utilizó una mezcla de diferentes granos, tales como maíz, avena, arroz, chícharo, mijo, nabo, trigo, cártamo, sorgo, lenteja y alpiste, para asegurar un adecuado suministro de nutrientes.

En los primeros estudios, la administración del medicamento se realizó sujetando el dorso de la paloma con una mano y con los dedos índice y pulgar se detuvo la mandíbula, mientras el resto del cuerpo del ave se apoyaba contra el abdomen del manejador; con la otra mano se procedió a abrir el pico y administrar el medicamento.

Establecimiento de dosis

El primer estudio tuvo la finalidad de establecer la dosis adecuada de cada medicamento a probar. Para ello, se tuvieron tres grupos de parejas de palomas mensajeras, y únicamente se medicó a las hembras.

- Grupo flutamida: n=9 parejas, divididas en tres parejas por dosis de tratamiento. Las dosis que se probaron fueron 50 mg, 25 mg, 12.5 mg, las cuales se administraron oralmente cada ocho horas, durante un día.
- Grupo letrozol: n=9 parejas, distribuidas homogéneamente en tres dosis de tratamiento. Las dosis probadas fueron 0.50 mg, 0.25 mg y 0.13 mg, administrándose en una sola toma por vía oral a las 19 hrs.
- Grupo control: n=4 parejas, las cuales fueron sometidas a las mismas condiciones que los grupos tratados, recibiendo un placebo de igual modo que el grupo letrozol, para descartar efectos del manejo sobre la inhibición de la ovulación.

Para los tratamientos se prepararon cápsulas con las dosis respectivas, a partir de tabletas de 2.5mg de letrozol (Femara[®], Novartis) y de 250mg de flutamida (Eulexin[®], Teva Pharmaceutical Industries).

Antes de iniciar el tratamiento, se permitió que las parejas establecidas pusieran los huevos correspondientes a una nidada (1-2 huevos) y todos fueron retirados el mismo día para sincronizar en las hembras un nuevo ciclo ovulatorio. Este manejo se realizó en todos los estudios incluidos en este trabajo.

El tratamiento se administró el día siete post retiro de los huevos, estimando que la fecha de ovulación fuera el día ocho y la postura del mismo ocurriera en el día diez del ciclo.

En todos los casos se evaluó el efecto del tratamiento sobre la postura de una nidada completa, es decir dos huevos, considerando que el tratamiento fue exitoso cuando inhibió la postura de al menos un huevo o si esta ocurrió tres días después de la fecha esperada. Si los animales pusieron dos huevos iniciando en el día diez del ciclo o antes, se consideró que el tratamiento no fue exitoso. Los resultados fueron analizados por medio de la prueba exacta de Fisher.

Efecto de la medicación repetida en una dosis semanal (a)

De acuerdo a los resultados obtenidos del primer estudio, en los cuales la dosis mayor de letrozol fue la única que causó una reducción significativa en la postura, se decidió realizar un estudio en el que se incrementará la frecuencia de dosificación. Adicionalmente, se propuso emplear las dosis mayores ya probadas para cada medicamento, y agregar un grupo con el doble de la concentración.

En esta ocasión los tratamientos se administraron una vez por semana durante 28 días. Para ello se utilizaron cinco grupos de animales con seis parejas cada uno, de los cuales: un grupo fue control, dos grupos fueron destinados para el tratamiento con flutamida (50 y 100mg, en dosis repetidas 3 veces al día) y dos grupos al tratamiento con letrozol (0.5 y 1.0mg). Únicamente se medicó a las hembras. El tratamiento se inicio al momento del retiro de los huevos de una postura previa. En todos los grupos, si ocurría postura, los huevos se retiraban el

día de la segunda postura o al tercer día si sólo pusieron un huevo. Con el objetivo de analizar el reinicio de postura postratamiento, ésta continuó registrándose hasta que ocurriera la postura de los huevos correspondientes a la nidada esperada. Las parejas se liberaban conforme realizaban la puesta de dicha nidada.

Los porcentajes de postura durante el tratamiento se analizaron de la misma forma que en el primer estudio. El reinicio de postura una vez terminado el tratamiento se evaluó por análisis de varianza.

Efecto de la medicación repetida cada tercer día o diariamente (b)

Analizando los resultados obtenidos en el experimento anterior, en los cuales el éxito de los tratamientos estudiados fue bueno, pero un gran número de animales no tuvo una inhibición completa, se procedió a realizar un estudio adicional, aumentando la frecuencia de administración de la dosis a intervalos de tres días o en dosis diarias. En esta ocasión, considerando que el nivel de medicamento se incrementaría por la mayor frecuencia de dosificación, se utilizaron las dosis de 0.5mg de letrozol y 50mg de flutamida.

Nuevamente los tratamientos se iniciaron al momento del retiro de los huevos de una postura previa. También se analizó el reinicio de postura, con los mismos criterios del estudio previo.

Los resultados se analizaron de la forma establecida para el estudio anterior.

Consumo voluntario

El último experimento se realizó con la finalidad de verificar el consumo voluntario del medicamento cuya dosis e intervalo tuvo mejores resultados de acuerdo a lo establecido en los estudios anteriores. El medicamento seleccionado fue el letrozol, a una dosis de 0.5mg, en una administración diaria. Se tuvieron dos grupos: uno control y otro tratado, cada uno con diez parejas.

Para ambos grupos se consideró una cantidad de 30 g de alimento por individuo. En el caso del grupo tratado el alimento se humedeció y se espolvoreó el medicamento, permitiendo su adhesión al momento del secado. El alimento medicado se ofreció a las parejas por un lapso de 28 días. En este caso, por cuestiones de manejo, se medicó tanto a las hembras, como a los machos.

En forma similar a los estudios anteriores se analizó la inhibición de la postura durante la administración del tratamiento y hasta que la última pareja puso una nidada completa después de finalizada la medicación. En el grupo control, durante el periodo de estudio, cada vez que ocurría postura los huevos se retiraban el día de la ovoposición del segundo huevo o al tercer día si sólo pusieron un huevo por nidada.

Al término del estudio se procedió al sacrificio de la mitad de las hembras de cada grupo para observar los cambios en las estructuras del sistema reproductivo.

El sacrificio se realizó por el método de dislocación cervical como indica la NOM – 033 – ZOO – 1995 (sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres). Posteriormente, se retiró y midió el oviducto; también se removió el ovario para la identificación de los folículos presentes. Esta información se analizó por medio de

una T de Student para el tamaño del oviducto, y por una prueba exacta de Fisher para los folículos jerárquicos.

RESULTADOS

Establecimiento de dosis

Los resultados del efecto de los tratamientos sobre la postura, probando diferentes dosis de medicamentos se muestran en la figura 1:

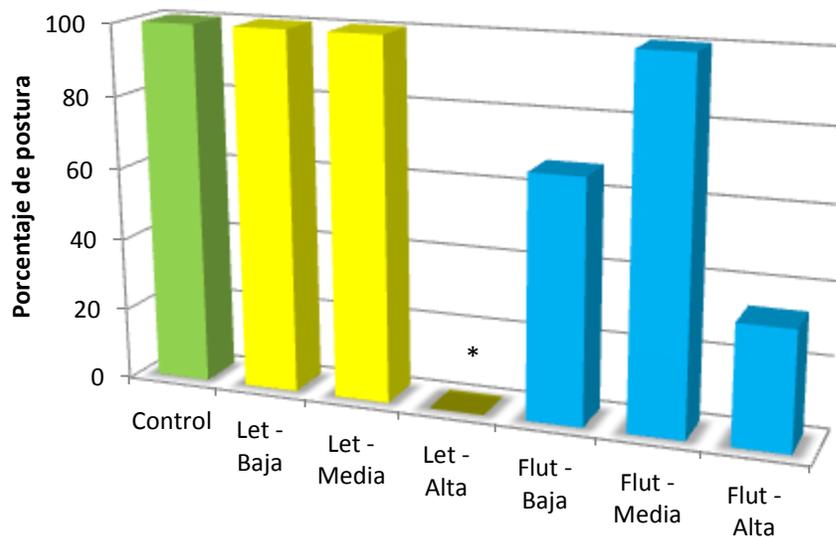


Figura 1. Porcentaje de postura en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de un inhibidor de aromatasa (Letrozol) y un antagonista de testosterona (Flutamida), sobre la postura de palomas (*Columba livia*). Las dosis de letrozol empleadas fueron: alta = 0.5mg, media = 0.25mg y baja = 0.13mg, administradas en una sola toma. Mientras que las de flutamida fueron: alta = 50mg, media = 25mg y baja = 12.5mg, repitiendo la administración cada 8 horas. Ambos medicamentos se dieron por vía oral. El * muestra las diferencias significativas contra el grupo control ($p=0.029$).

La dosis 0.5mg de letrozol causó un mayor efecto, difiriendo significativamente del grupo control ($p=0.029$). Sin embargo, debido a que el efecto solamente se observó sobre la postura de un huevo de la nidada, para el segundo estudio se empleó la dosis más alta (0.5mg) y se agregó una dosis del doble de la

concentración (1mg). Lo anterior con la finalidad de lograr una inhibición completa de la postura.

Efecto de la medicación repetida en una dosis semanal (a)

En la figura 2 se muestran los porcentajes de postura y el retraso de la misma, de acuerdo a cada grupo.

En los animales tratados con letrozol a una dosis de 1 mg se tuvo el mayor número de posturas inhibidas o retrasadas, siendo el porcentaje de postura significativamente menor al compararlo con el grupo control ($p=0.0076$). El resto de los grupos tratados no difirieron del grupo control ($p>0.05$).

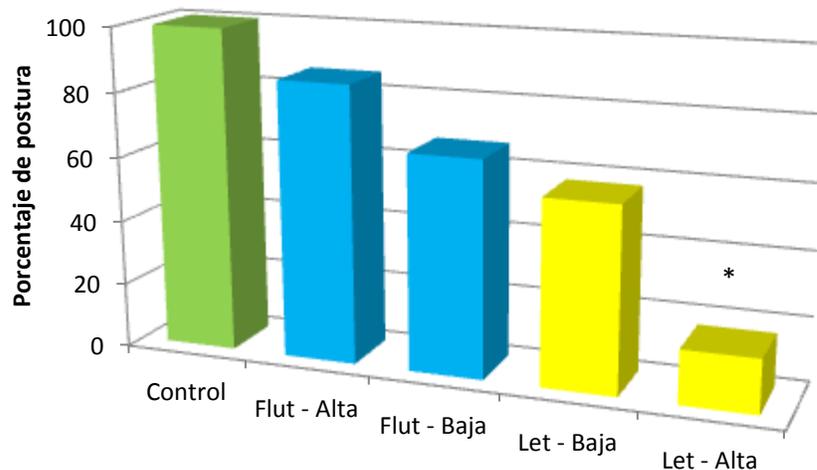


Figura 2. Porcentaje de postura en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de un inhibidor de aromatasa (Letrozol) y un antagonista de testosterona (Flutamida), sobre la postura de palomas (*Columba livia*). Las dosis de letrozol empleadas fueron: alta = 1mg y baja = 0.5mg, administradas en una sola toma. Mientras que las de flutamida fueron: alta = 100mg y baja = 50mg, repitiendo la administración cada 8 horas. Ambos medicamentos se dieron por vía oral, una vez a la semana, durante 28 días. El * muestra las diferencias significativas contra el grupo control ($p=0.0076$).

Al evaluar el tiempo transcurrido entre posturas, se observó un promedio de 8.8 días en el grupo control. El grupo tratado con letrozol a una dosis de 1mg tuvo un

promedio de intervalo entre posturas de 19.66 días, mostrando un retraso significativo al compararlo con el grupo control ($p=0.047$). Los demás grupos no presentaron cambios significativos en comparación con el grupo control ($p>0.05$).

Efecto de la medicación repetida cada tercer día o diariamente (b)

Los resultados obtenidos al incrementar la frecuencia de tratamiento a medicaciones cada tercer día o diariamente, se observan en la figura 3:

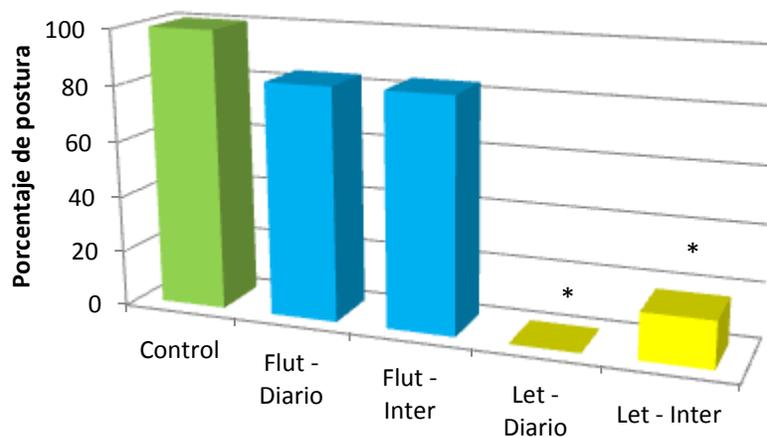


Figura 3. Porcentaje de postura en respuesta al tratamiento con diferentes intervalos de administración de un inhibidor de aromatasa (Letrozol) y un antagonista de testosterona (Flutamida), sobre la postura de palomas (*Columba livia*). La dosis de letrozol empleada fue de 0.5mg, administradas en una sola toma al día. Mientras que la de flutamida fue 50mg, repitiendo la administración cada 8 horas al día. Ambos medicamentos se dieron por vía oral en un intervalo de 3 días o diariamente, durante 28 días. El * muestra las diferencias significativas contra el grupo control (Diario $p<0.001$; Cada tercer día $p=0.004$).

La postura en ambos grupos tratados con letrozol fue significativamente menor en comparación con el control (Diario $p<0.001$; Cada tercer día $p=0.004$), mientras que los grupos tratados con flutamida no difirieron ($p>0.05$). La administración diaria de letrozol durante cuatro semanas causó una inhibición del 100% de la

postura, mientras que la inhibición fue del 83% cuando la administración del medicamento se realizó cada tercer día, sin embargo, la reducción en la postura entre ambos grupos no mostró diferencias estadísticas ($p>0.05$).

El tiempo transcurrido entre posturas fue de 9.6 días en promedio en el grupo control, sin diferencias significativas con los grupos tratados con flutamida ($p>0.05$). Sin embargo, en los grupo tratado con letrozol el promedio de intervalo de postura fue de 43 y 32 días para la administración diaria y a intervalos, respectivamente, siendo estadísticamente diferentes del grupo control y entre ellos ($p<0.001$).

Nota: durante los dos estudios anteriores se descubrió que la mayoría de los huevos que eran puestos durante el tratamiento con letrozol eran más pequeños y más frágiles en comparación con aquellos de los grupos controles o tratados con flutamida.

Consumo voluntario

Los resultados de la prueba de la medicación por consumo voluntario indican una inhibición del 100% en la postura de los animales que recibieron el tratamiento con letrozol a una dosis diaria de 0.50mg por animal, mientras que el 100% de los animales control pusieron normalmente ($p<0.001$).

Al evaluar el aparato reproductivo en las hembras tratadas durante 28 días, se observó una reducción significativa en el tamaño del oviducto del grupo tratado (5.72cm en promedio), en comparación con el grupo control (13.54 cm en promedio) ($p<0.012$).

De igual manera se observó una diferencia en la presencia de folículos de ambos grupos, ya que en el caso del grupo tratado las únicas estructuras presentes eran pequeños folículos prejerárquicos, mientras que el grupo control se encontraron de uno a dos folículos jerárquicos por animal ($p < 0.024$).

Al evaluar el intervalo del reinicio de postura en el resto de los animales, esta ocurrió más tarde en las hembras tratadas (45 días en promedio) que las hembras control (10 días en promedio) ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Los estudios realizados en este trabajo mostraron que la administración oral de letrozol fue efectiva para inhibir la postura en palomas (*Columba livia*). Más aún, al mezclarlo en el alimento para permitir un consumo voluntario, el medicamento bloqueó de manera efectiva la postura por 43 días en promedio, cuando se administró a una dosis diaria de 0.5mg por animal durante 28 días.

El letrozol es un inhibidor de aromatasa no esteroidal de tercera generación con una eficiencia mayor al 96% en diferentes mamíferos (Haynes, *et al.*, 2003). Por ejemplo, es eficaz en la regresión de tumores de glándula mamaria en ratas, ratonas y mujeres postmenopáusicas (Haynes, *et al.*, 2003), e induce la ovulación en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (He y Jiang, 2011). En la literatura no encontramos reportes de su uso en aves, sin embargo, en un trabajo no publicado realizado por nuestro laboratorio se encontró que su administración en gallinas ligeras inhibió la postura.

En este estudio en los animales tratados con letrozol se observó una reducción significativa en el número de folículos jerárquicos presentes a nivel ovárico (estudio de consumo voluntario). Lo anterior puede explicarse debido a que en mamíferos se ha observado que este medicamento impide la formación de estradiol a partir de testosterona al bloquear a la enzima aromatasa (Haynes, *et al.*, 2003) y se asume que en aves debe actuar de la misma manera. Adicionalmente, el estradiol producido en la teca externa de los folículos prejerárquicos (Robinson y Etches, 1986; Porter, *et al.*, 1989) promueve la formación del vitelo en el hígado (Pollock y Orosz, 2002), por lo cual, al bloquearse

la producción de dicha hormona los folículos ováricos no debieron ser capaces de crecer y madurar.

Por otro lado, el estradiol ayuda al crecimiento del oviducto, la formación de sus glándulas y la síntesis de proteínas oviductales (Pollock y Orosz, 2002). En este trabajo se encontró que los animales tratados diariamente con letrozol por 28 días tuvieron una reducción en el tamaño del oviducto en comparación con animales que no recibieron tratamiento alguno, de modo que la baja en la producción de estradiol pudo ser la causante del menor desarrollo oviductal.

Un hallazgo fortuito que se observó durante el estudio fue que en los animales tratados con letrozol que llegaron a poner un huevo, ese huevo la mayor parte de las veces era más frágil y más pequeño que lo normal. El menor tamaño del huevo pudo ser ocasionado tanto por la disminución en la estimulación de la producción de vitelo como por el menor desarrollo del oviducto, ambos explicados anteriormente. Por otro lado, la fragilidad del cascarón pudo ser ocasionada porque el estradiol también participa en el metabolismo del calcio, necesario para la formación del huevo (Pollock y Orosz, 2002).

La administración de letrozol aparentemente no causó problemas de palatabilidad en las palomas mensajeras, como han demostrado otros medicamentos (Yoder, *et al.* 2004), lo cual facilita su administración y reduce el estrés causado por el manejo de los animales.

A pesar de que el letrozol logró inhibir la postura hasta por dos meses cuando se administró por vía oral durante 28 días, aparentemente sus efectos no son permanentes, ya que el 100% de las parejas de palomas tratadas reestableció su postura al término de la medicación. Este efecto difiere de lo reportado para el

mestranol, el α -clorohidrin y el trietilen melamina, que causaron esterilidad en diferentes aves (Yoder, *et al.*, 2004). Sin embargo, esta observación no puede ser considerada como una prueba concluyente de que el letrozol no cause esterilidad en aves, debido a que solo fue administrado por un periodo de 28 días, lo que sugiere la necesidad de realizar más estudios para verificar los efectos en medicaciones más prolongadas.

El estudio no estaba encaminado a evaluar los daños colaterales que pudieran producir los medicamentos utilizados, sin embargo, no se presentaron signos que sugirieran la presentación de alguna enfermedad a pesar del tiempo de administración. Esto resulta otra ventaja del empleo de letrozol como método de control reproductivo, ya que medicamentos como el tamoxifen y el 20,25-diazacholesterol generan toxicidad en aves, e incluso la muerte, a pesar de que sea administrado únicamente en periodos de una semana (Lupu, 2000; Yoder, *et al.*, 2004).

En cuanto a la flutamida, que es un antagonista competitivo de testosterona, se ha visto que en mamíferos es muy efectiva para reducir la hiperplasia prostática dependiente de testosterona en perros (Neri y Peets, 1975) y humanos (Montironi, *et al.*, 2013). Además, disminuye los efectos del choque de calor en ratones (Lin, *et al.*, 2012). Este medicamento ha sido empleado previamente en aves. Así, se encontró que su administración subcutánea durante los primeros días post-eclosión disminuye el desarrollo del sistema del canto en finches (Grisham, *et al.*, 2007); mientras que al ser administrado *in ovo*, suprime en machos el crecimiento después del nacimiento (Henry y Burke, 1999). Por otro lado, su empleo en gallinas demostró inhibir la ovulación al afectar la presentación de los picos

preovulatorios de progesterona y LH (Rangel, *et al*, 2006). En ninguno de los trabajos mencionados se evaluaron efectos secundarios de la medicación con flutamida.

En este estudio, el número de animales inhibidos por el uso de flutamida fue muy reducido, y en ningún caso hubo diferencia con los grupos controles. Lo anterior difiere de lo demostrado por Rangel, *et al.*, 2006, quienes al administrar a gallinas (*Gallus domesticus*) 250 mg de flutamida por vía oral en 3 dosis, con intervalos de 8 h durante un día de tratamiento, inhibieron la postura correspondiente, es decir dos días post-tratamiento, cabe aclarar que ellos no evaluaron el tiempo que duró dicho bloqueo. La diferencia entre los resultados de este estudio y los de Rangel, *et al*, 2006, hace suponer que las palomas tienen un metabolismo más acelerado o que son menos sensibles que las gallinas al medicamento o a los efectos del bloqueo de testosterona. Sin embargo, sería necesario estudiar dichos supuestos para poder decir la causa verdadera de no haberse observado un efecto inhibitorio sobre la postura.

En conclusión, los resultados de este trabajo indican que el letrozol administrado en una concentración de 0.5 mg por animal por día, mezclados en 30 g de alimento durante un mes, es un método químico eficiente para evitar la postura y reducir la reproducción en palomas (*Columba livia*).

REFERENCIAS

1. ACHA P. (a). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. I. Bacteriosis y micosis. Organización Panamericana de la Salud. 3ra edición. Washington, EUA. 2003: 56 – 62, 240 – 254, 266 – 280.
2. ACHA P. (b). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. II. Clamidiosis, rickettsiosis y virosis. Organización Panamericana de la Salud. 3ra edición. Washington, EUA. 2003: 3 – 11, 124 – 132, 168 – 175.
3. ALDOUS EW, FULLER CM, MYNN JK, ALEXANDER DJ. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type I virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons. *Avian Pathology*. 2004; 33: 258 – 269.
4. ASKEW JA, GEORGIU GC, SHARP PJ, LEA RW. Localization of progesterone receptor in brain and pituitary of the ring dove: influence of breeding cycle and estrogen. *Hormones and Behavior*. 1997; 32: 105 – 113.
5. DAWSON A, SHARP PJ. Photorefractoriness in birds – photoperiodic and non – photoperiodic control. *General and Comparative Endocrinology*. 2007; 153: 378 – 384.
6. DEL HOYO J, ELLIOT A, SAGARTAL J. Handbook of the birds of the world, sandgrouse to cuckoos. Linx ediciones, Barcelona, España Vol. 4. 1997: 60 – 113.

7. DEL VILLAR – GONZÁLEZ D. Principales vertebrados plaga en México: situación actual y alternativas para su manejo. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 2000; 6: 41 – 54.
8. DIJKSTRA C, RIEDSTRA B, DEKKER A, GOERLICH V, DANN S AND GROOTHUIS T. An adaptive annual rhythm in the sex of first pigeon eggs. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 2010; 64: 1393 – 1402.
9. DOBEIC M, PINTARIC S, VLAHOCIV K, DOVC A. Feral pigeon (*Columba livia*) population management in Ljubljana, Slovenia. *Veterinarski Arhiv*. 2011; 81: 285 – 298.
10. EL HALAWANI ME, KANG S, LECLERC B, KOSONSIRILUK S, CHAISEHA Y. Dopamine – melatonin neurons in avian hypothalamus and their role as photoperiodic clock. *General and Comparative Endocrinology*. 2009; 163: 123-127.
11. ELPHICK CS, REED JM, DELEHANTY D. Applications of reproductive biology to bird conservation and population management. En *Reproductive Biology and Phylogeny of Aves (Birds)*. JAMIESON BGM (Ed.). Science Publishers, Enfield, New Hampshire. 2007: 367 – 399.
12. ETCHES RJ, MACGREGOR HE, MORRIS TF, WILLIAMS JB. Follicular growth and maturation in the domestic hen (*Gallus gallus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 1983; 67: 351-358.
13. GÓMEZ Y, VELÁZQUEZ PN, JUÁREZ - OROPEZA MA, PEDERNERA E. Steroid metabolism in granulosa and theca interna cells from preovulatory follicles of domestic hen (*Gallus domesticus*). *Animal Reproduction Science*. 1998; 52: 81 – 91.

14. GRISHAM W, PARK S, HSIA J, KIM C, LEUNG M, KIM L, ARNOLD A. Effects of long-term flutamide treatment during development in zebra finches. *Neuroscience Letters*. 2007; 418: 92 – 96.
15. HAHN TP, PEREYRA ME, SHARBAUGH SM, BENTLEY GE. Physiological responses to photoperiodic in three cardueline finch species. *General and Comparative Endocrinology*. 2004; 137: 99 – 108.
16. HAYNES BP, DOWSETT M, MILLER WR, DIXON JM, BHATNAGAR AS. The pharmacology of letrozole. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 87: 35 – 45.
17. HE D, JIANG F. Meta-analysis of letrozole versus clomiphene citrate in polycystic ovary syndrome. *Reproductive Biomedicine Online*. 2011; 23: 91 – 96.
18. HENRY MH, BURKE WH. The effects of *In Ovo* administration of testosterone or an antiandrogen on growth of chick embryos and embryonic muscle characteristics. *Poultry Science*. 1999; 78: 1006 – 1013.
19. JOYNER KL. Theriogenology. En RITCHIE B, HARRISON B, HARRISON L. *Avian medicine: Principles and application*. Wingers Publishers Inc., Florida, EUA. 1994: 748 – 804.
20. JOHNSON PA, JOHNSON AL, VAN TIENHOVEN A. Evidence for a positive feedback interaction between progesterone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in the hen, *Gallus domesticus*. *General and Comparative Endocrinology*. 1985; 58: 478 – 485.
21. JOHNSTON JJ, GOODALL MJ, YODER CA, FURCOLOW CA, GOLDADE DA, KIMBALL BA, MILLER LA. Desmosterol: A biomarker for the efficient

- development of 20, 25 – diazacholesterol as a contraceptive for pest wildlife. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003; 51: 140 – 145.
22. LÉBOUCHER G, BEGUIN N, MAUGET R, KREUTZER M. Effects of fadrozole on sexual displays and reproductive activity in the female canary. Physiology Behavior. 1998; 65, 233 – 240.
23. LI C-Y, HSU C-C, LIN M-T, CHEN S – H. Flutamide, an androgen receptor antagonist, improves heatstroke outcomes in mice. European Journal of Pharmacology. 2012; 688: 62 – 67.
24. LUPU CA. Evaluation of side effects of tamoxifen in budgerigars. Journal of Avian Medicine and Surgery. 2000; 14: 237 – 42.
25. MARLIER D, VINDEVOGEL H. Viral infections in pigeons. The Veterinary Journal. 2006; 172: 40 – 51.
26. MATHEWS CK. Bioquímica. Editorial Pearson. 3° edición. Madrid, España. 2002: 774 – 778.
27. MEJÍA VM. Densidad poblacional de *Columba livia*, y costos asociados a su manejo en el campus central de la Universidad Nacional Autónoma de México y la reserva ecológica del pedregal de San Ángel. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, UNAM, México. 2014.
28. MONTIRONI R, BARTELS P, DECENSI A, PUNTONI M, HURLE R, DECOBELLI O, CARMIGNANI G, MAZZUCHELLI R, BARTELS H, ALBERTS D, MAFFEZZINI M. A randomized phase IIb presurgical study of finasteride vs. low-dose flutamide vs. placebo in men with prostate cancer.

- Efficacy monitored by karyometry. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2013; 31: 557–565.
29. NERI R, PEETS E. Biological aspects of antiandrogens. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1975; 6: 815 – 819
30. POLLOCK CG, OROSZ SE. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *The Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*. 2002; 5: 441 – 474.
31. PORTER FE, HARGIS BM, SILSBY JL, EL HALAWANI ME. Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology*. 1989; 125: 109 - 116
32. QUINTANA JA. Avitecnia: Manejo de las aves domésticas más comunes. Trillas. 4ª Edición. DF, México. 2011. 406 p.
33. RANGEL PL, SHARP PJ, GUTIERREZ CG. Testosterone antagonist (Flutamide) blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reproduction*. 2006; 131; 1109 - 1114
34. RANGEL PL, RODRÍGUEZ A, ROJAS S, SHARP PJ, GUTIERREZ CG. Testosterone stimulates progesterone production and StAR, P450 cholesterol side-chain cleavage and LH receptor mRNAs expression in hen (*Gallus domesticus*) granulosa cells. *Reproduction*. 2009; 138: 961 – 969.
35. RANGEL PL, RODRÍGUEZ A, GUTIÉRREZ K, SHARP PJ, GUTIERREZ CG. Subdominant hierarchical ovarian follicles are needed for

- steroidogenesis and ovulation in laying hen (*Gallus domesticus*). *Animal Reproduction Science*. 2014; 147: 144 – 153.
36. ROBINSON FE, ETCHES J. Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus gallus*). *Biology of Reproduction*. 1986; 35: 1096 – 1105.
37. SHARP PJ. Strategies in avian breeding cycles. *Animal Reproduction Science*. 1996; 42: 505 – 513.
38. SHARP PJ, TALBOT RT, MAIN GM, DUNN IC, FRAISER HM, HUSKISSON NS. Physiological roles of chicken LHRH-I and -II in the control of gonadotrophin release in the domestic chicken. *Journal of Endocrinology*. 1990; 124: 291 – 299.
39. WHITTON C. Sturkie's. *Avian Physiology*. Fifth edition. San Diego, EUA. 2000: 569 – 596.
40. TELL LT, SHUKLA A, MUNSON L. Comparison of the effects of slow release, injectable levonorgestrel and depot medroxyprogesterone acetate on egg production in Japanese quail. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 1999; 13: 23 – 31.
41. TORRES A, SEKI M, RASO T, PAULILLO C, PINTO A. Experimental infection of Newcastle disease virus in pigeon (*Columba livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. *Veterinary Microbiology*. 2008; 129: 89 – 96.
42. TSUTSUI K, UBUKA T, BENTLEY GE, KRIEGSFELD LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Discovery, progress and prospect. *General and Comparative Endocrinology*. 2012; 177: 305 – 314.

43. TUDOR DC. Pigeon health and disease. Iowa State University Press. EUA. 1991: 244.
44. VATNICK I, FOERTSCH S. Incubation temperature of the pigeon embryo (*Columba livia*). Journal of Thermal Biology. 1998; 23: 53 – 57.
45. WILSON SC, CUNNINGHAM F. Effects of an antiestrogen, tamoxifen (ICI, 46,474), on LH release and ovulation in the hen. Journal of Endocrinology. 1981; 88: 309 – 316
46. YODER CA, ANDELT WF, MILLER LA, JOHNSTON JJ, GOODALL MJ. Effectiveness of 20, 25 – Diazacholesterol, avian gonadotropin – releasing hormone, and chicken riboflavin carrier protein for inhibiting reproduction in Coturnix quail. Poultry Science. 2004; 83: 234 - 244.
47. YURI V, LANGONI H, VIEIRA A, BERGAMASCHI S, PERES A, COSTA R, PESSOA J. Chlamydophila psittaci and Toxoplasma gondii infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo state, Brazil. Veterinary Parasitology. 2011; 175: 9 – 14.