



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON POLIDOCANOL COMO AGENTE
ESCLEROSANTE DEL EPIDÍDIMO E INDUCTOR DE INFERTILIDAD EN
MACHOS BOVINOS Y OVINOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

ALYN ACOSTA GONZÁLEZ

TUTORES:

DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR

MPA. HÉCTOR BASURTO CAMBEROS



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Mayo 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica.PAPIITT IN220012. Agradezco el apoyo del programa de ayudantes del Sistema Nacional de Investigadores, CONACYT.

A mis padres por darme educación y apoyarme en todas mis decisiones, además de estar conmigo en todo momento y siempre ayudarme.

Al Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar, por la confianza, apoyo incondicional, enseñanzas y atención durante este periodo.

Al Dr. Héctor Basurto Camberos, por el apoyo que me brindo en todo el tiempo que estuve en el CEIEGT, por sus enseñanzas y el tiempo dedicado.

Al Dr. Cristino Cruz Lazo, por el apoyo con los borregos para el Proyecto, por todo lo que me enseñó durante mi estancia en el rancho y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Laura Romero Romero por acercarme al Laboratorio de Patología Clínica para poder realizar las tinciones y los cortes histológicos.

Al CONACYT por el financiamiento y apoyo brindado y por difundir la ciencia en México.

A Lety y Betty por convertirse en mi familia durante nuestra estancia en “El Clarín”, gracias por estar a mi lado y darle sabor a mi estancia, gracias por que compartieron risas, alegrías, tristezas, decepciones, derrotas y lo mejor triunfos. Las quiero.

A Luis “Limón”, Tory, Zule y Nancy muchas gracias por su amistad por los días increíbles a su lado, por permitirme ser cómplice en tantas de sus locuras, por ser las personas que en todo momento me escucharon, aun que a veces no dejaba de hablar; por mostrarme que así como trabajamos también hay tiempo para divertirse. Simplemente gracias por los días tan increíbles a su lado, hicieron que los últimos meses de mi trabajo fueran los mejores en verdad gracias por convertirse en mi familia.

DEDICATORIA

A mis padres, Ramón Acosta Alamilla y Celina González Ulloa, quienes me han dado las bases para ser la persona que soy ahora, gracias por estar siempre a mi lado, tal vez no soy de muchas palabras pero ustedes no imaginan lo agradecida que estoy por todo el esfuerzo que hacen para que estemos cada día mejor y para que Alain Amed y yo cumplamos nuestras metas, gracias mamá y papá, los amo con todo mi ser.

A mis hermanos Alain y Amed, con quienes comparto mis alegrías, enojos, tristezas y mi locura, porque siempre me han dado consejos en todo momento y han soportado mi mal genio, si que los amo.

A mi familia por apoyarme de una u otra manera, por ayudarme a levantarme cuando era necesario y festejar si se ameritaba, además de siempre aconsejarme.

A ti abuelita Celia por que se que serías una de las personas más felices por verme titulada, gracias por haber sido una abuelita alegre, la mejor, la que siempre nos consintió.

A Karen y Guadalupe, por estar conmigo en las buenas, las malas y las peores por más lejos que estemos se que tu estas a mi lado. Gracias por demostrarme que la amistad si existe.

ÍNDICE

	Página
Índice.....	III
I.- Introducción.....	4
II.- Justificación.....	10
III.- Hipótesis.....	10
IV.- Objetivo general	10
V.- Material y Métodos.....	11
VI.- Análisis estadísticos.....	21
VII.- Resultados	22
VIII.- Discusión.....	29
IX.- Conclusiones.....	32
X.- Referencias	33

I.- Introducción

La Inseminación Artificial (IA) es una biotecnología fundamental para el mejoramiento genético de los hatos ovinos y bovinos (Rorie *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2005). No obstante, aun existen obstáculos en su implementación. Entre las principales limitantes se pueden citar la problemática de detección de celos y las dificultades para la aplicación oportuna del servicio de inseminación. También, pueden considerarse factores que limitan el empleo de esta biotecnología, como los largos periodos de anestro postparto y el arribo tardío a la pubertad (Baruselli *et al.*, 2002). Lo anterior ocasiona un bajo desempeño reproductivo que repercute en pérdidas económicas para los productores (Alonso, 2005).

En la producción de los ovinos, la detección de estros depende del uso de machos celadores ya que esta especie no muestra signos característicos que puedan detectarse sin la presencia del macho, tales como el comportamiento homosexual. En el caso de los bovinos existen numerosas herramientas que facilitan la detección de calores como son: parches en la grupa, crayoneo en la grupa, podómetros y machos celadores, entre otros (Morgan y Dawson, 2008; Wolfe, *et al.*, 2009). Sin embargo, al comparar las diferentes herramientas o ayudas para la detección del celo tanto en ovinos como bovinos, se confirmó que la mayor efectividad se tiene cuando la observación es acompañada de la utilización de un macho celador (Bespín, *et al.*, 2007).

Los machos celadores tienen el potencial de identificar un celo verdadero, incluyendo a aquellas hembras con baja o débil signología, así como a las que disminuyen su actividad antes de la época de empadre. Adicionalmente, el uso de machos puede incrementar la actividad sexual en el hato, reduciendo los días para que la vaca y/o la borrega entren en estro (bioestimulación), siendo reconocido este estímulo como efecto macho y es una forma barata y eficaz para el control del empadre (Zalesky *et al.*, 1984; Stumpf *et al.*, 1992; Zicarelli *et al.*, 1997; Rekwot *et al.*, 2001).

Así como se muestra en el estudio de Córdova Izquierdo *et al.*, (2008), en donde se muestra la importancia de algunos procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovinos; como la exposición a un animal celador por 48 horas o más para incrementar la producción de LH, iniciando la ovulación sin estro (estro silencioso) en pocos días.

Anatomía e histología del epidídimo

Los órganos genitales del macho están compuestos por una serie de segmentos ubicados uno detrás de otro que tienen a su cargo la formación, la maduración, el transporte y la transmisión de las células germinales masculinas, los espermatozoides. Así en las glándulas germinales, los testículos, se producen los espermatozoides y hormonas. En el conducto del epidídimo los espermatozoides son almacenados hasta su maduración definitiva y luego su transportación.

El epidídimo está compuesto por: cabeza (*Caput epididymidis*), el cuerpo (*Corpus epididymidis*) y la cola (*Cauda epididymidis*). Formado por un epitelio pseudoestratificado ciliado, tiene células principales con estereocilios, células basales y linfocitos intraepiteliales. Se compone también de tres capas de músculo liso en la cola, y una capa en la cabeza y el cuerpo.

Cabeza del epidídimo. Se encuentra unida con los testículos, ingresan los conductillos eferentes del testículo para reunirse en el canal o conducto del epidídimo (*Ductus epididymidis*). El conducto, ligeramente contorneado, forma el cuerpo del epidídimo.

Cuerpo del epidídimo. Aquí terminan de madurar los espermatozoides, se reabsorbe el líquido testicular, se fagocitan fragmentos celulares y se secretan sustancias nutritivas para los espermatozoides.

Cola del epidídimo. Está fijada por ligamentos por una parte al testículo mediante el ligamento propio del testículo, y por otra parte a la base del proceso vaginal mediante el ligamento de la cola del epidídimo. Después de abandonar la cola del epidídimo el conducto del epidídimo se continúa como conducto deferente.

Después de un recorrido por el conducto deferente estas células alcanzan la parte pélvica de la uretra, sitio en donde se mezclan las secreciones de las glándulas genitales accesorias de manera que se forma el semen.

El conducto deferente conecta el epidídimo con las vesículas seminales; es el segmento más largo de la vía espermática, se constituye de músculo liso y epitelio

pseudoestratificado con células basales y células cilíndricas con microvellosidades (König y Liebich, 2012).

Preparación de machos celadores

Existen diferentes técnicas para preparar machos celadores, entre las cuales se encuentran métodos quirúrgicos y químicos. En ambos métodos se debe permitir que el macho monte sin que le cause malestar, pero deben evitar que el animal concrete la cópula. Además, no debe interferir con la libido que es esencial para una adecuada detección de celos (Wenkoff, 1975; Zicarelli *et al.*, 1997; Wolfe *et al.*, 2009).

Métodos quirúrgicos

Entre las técnicas quirúrgicas de preparación de machos celadores están: la translocación del pene, que se realiza por la adhesión del pene en posición retraída; o bien la prevención de la erección, que se realiza por: la trombosis artificial del cuerpo cavernoso, la penectomía y la fijación de pene. Cada procedimiento tiene ventajas y desventajas en términos de costo, confiabilidad, complicaciones posquirúrgicas y la facilidad de la técnica (Wolfe *et al.*, 2009). En general estas intervenciones evitan la penetración del pene a la vagina, previniendo la transmisión de enfermedades venéreas y la gestación (Wolfe *et al.*, 2009).

También existen técnicas quirúrgicas que no previenen la penetración pero que logran la esterilización del macho. Morgan y Dawson (2008), en una revisión mencionan a la vasectomía y la epididectomía bilateral como los métodos quirúrgicos más comunes para la preparación de machos celadores. Si bien la vasectomía no altera la concentración plasmática de testosterona en el macho, su libido puede bajar como consecuencia de una orquitis o de granulomas espermáticos en la cola del epidídimo (Wolfe *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha sugerido que la presencia de machos vasectomizados es ventajosa para la inducción del celo (Ferreira de Quadros y Piva Lobato, 2006).

Métodos químicos

Inmunoesterilización

Consiste en la inducción de anticuerpos contra las hormonas endógenas o tejidos reproductivos. En la castración inmunológica, los animales son inmunizados contra la

hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), molécula clave en el control de la reproducción de mamíferos.

En un estudio realizado por Basulto *et al.* (2003) se evaluaron clínicamente los efectos de la administración del preparado vacunal sintético GnRHm1-TT sobre la concentración de testosterona en suero, la calidad del semen y la morfología testicular en perros beagles adultos. Concluyeron que la concentración de testosterona en el suero de los animales inmunizados disminuyó después de la primera y la segunda administración del preparado vacunal, los animales inmunizados mostraron daños en la estructura de los testículos, lo que pudiera indicar que la GnRH endógena fue bloqueada por los anticuerpos detectados en la seroconversión hacia GnRH.

Inmunoesterilización en bovinos

En la especie bovina Pfizer fue pionero generando una vacuna recombinante con especificidad a esta especie denominada Bopriva®, en un estudio realizado en 1600 toros de engorda en el estado de Sonora, por el área de Salud Animal de Pfizer, se demostró el efecto de la vacuna análoga de GnRH, en la supresión de los niveles de testosterona hasta el día 147 del estudio y disminuyó el peso testicular de los toros expuestos a esta vacuna (Amatayakul-Chantler *et al.*, 2012).

Los métodos químicos se han propuesto como una alternativa a los métodos quirúrgicos, evitando así las desventajas de la cirugía como costo y cuidado posoperatorio. Estos métodos incluyen la inyección bilateral de sustancias irritantes dentro de las colas de los epidídimos, cuya reacción cicatricial, que se da en el tejido epididimario en el sitio de la inyección, bloquea el paso de los espermatozoides al conducto deferente. Un riesgo es que se pueden llegar a desarrollar áreas necróticas y úlceras en el escroto cuando la solución es depositada dentro de la cavidad escrotal (Reyes, 1997).

Se realizó un estudio en México, en el cual se utilizó metilcianoacrilato para aplicación en la cola del epidídimo de los perros; arrojando como resultado la azoospermia del 86.7% de los perros estudiados, por lo cual se concluyó que es un método sencillo y fácil para inducir esterilidad en machos (Galvan *et al.*, 1994).

En México se diseñó un producto llamado Repcon JLDH de Cyta Laboratorios, el cual se aplica directamente en la cola del epidídimo de los perros machos, lo que tuvo como

consecuencia la paralización inmediata de los espermatozoides con los que tuvo contacto el compuesto. Se observó que los perros que recibieron el producto disminuyeron progresivamente su concentración de espermatozoides hasta llegar a quedar azoospermicos.

El empleo de esclerosantes ha sido una forma de castración química, realizada por una inyección con agente esclerosante en el testículo, epidídimo o conducto deferente del animal, causando infertilidad mediante la inducción de azoospermia; ejemplo de lo anterior es el trabajo de Jana y Samanta (2011) quienes aplicaron una inyección intratesticular de cloruro de calcio al 5%, 10% y 20% en 30 gatos machos de 9 a 12 meses de edad, en donde los resultados mostraron una reducción significativa de la concentración de espermatozoides, siendo más notoria la disminución en las concentraciones de 10 y 20%. Este tratamiento mostró cambios degenerativos en tejido testicular, tanto en los túbulos seminíferos y las células intersticiales de Leydig, dando lugar a una esterilización permanente.

Los esclerosantes se han usado para tratar las várices, y ha sido una opción en el arsenal terapéutico de esta enfermedad, que ha estado marcado por avances y retrocesos de diferente naturaleza, y que, en los últimos años, ha tenido un resurgimiento muy prometedor. En sus inicios, la escleroterapia fue considerada como un posible sustituto de la cirugía (Wollmann, 2004 y Bergan *et al.*, 2006). Actualmente es un tratamiento eficiente y seguro con evidencias científicas que lo soportan (Guex, 2005).

Uno de los esclerosantes más popularmente empleados es el polidocanol (hydroxy-polyethoxy-dodecano), que es un ácido graso sintético de cadena larga, el cual actúa dañando el epitelio, mediante la interacción con los lípidos de la superficie celular. Este agente tiene un efecto anticoagulante basado en la desnaturalización de proteínas. Los cambios histopatológicos demuestran disociación del tejido epitelial acompañado de una parcial desaparición de la capa basal. Posteriormente se forma fibrina, seguida de un trombo hialino adherido al epitelio lo que ocluye los vasos. Las dosis utilizadas dependen del tipo de lesión que se pretende esclerosar. Inicialmente fue utilizado como anestésico local y actualmente lo emplean los angiólogos para el tratamiento de venas varicosas. Este compuesto tiene aprobación por parte de la FDA desde el 2010 para su utilización en soluciones al 0.5% y 1% (Jensen *et al.*, 2013), con uso en forma líquida o en forma de espuma mezclada con bióxido de carbono o aire. Diversos reportes sugieren que la

esclerosis con espuma ha demostrado ser, al menos en los grandes troncos venosos, más eficaz que la realizada con líquido y parece ser también eficaz en vasos de pequeño calibre y telangetasias (Hamel-Desnos *et al.*, 2003 y Zimmet, 2003).

Según los estudios de Ouvry *et al.*, (2008) y Jensen *et al.*, (2013), la forma espumosa alcanza un mayor contacto con el epitelio (Alós *et al.*, 2006; Mann, 2011; Hamel *et al.*, 2003, 2007; Ouvry *et al.*, 2004), así, se comprobó que pacientes tratados para la eliminación del reflujo venoso en el tronco de la vena safena, 40 de 47 mostraron respuesta al tratamiento en espuma, mientras que solo 17 de los 48 tuvieron efectos positivos a la presentación líquida.

El polidocanol también ha logrado causar estenosis en otros tejidos, por ejemplo aplicado por vía intrauterina causó la oclusión de los oviductos en ratas y macacos (Jensen *et al.*, 2004).

II.- Justificación

La dificultad en la detección de estros en ganado bovino y ovino es uno de los factores que ha dificultado la implementación de la inseminación artificial (I.A.). El método más eficiente para la detección de estros es por medio de machos celadores con buena libido y estériles. Sin embargo, para ganado ovino y bovino los métodos de esterilización son quirúrgicos y aún se requiere un método de esterilización económico y de fácil aplicación. En esta tesis se prueba la aplicación de una sustancia esclerosante directamente en el epidídimo y se evalúa la producción de semen y libido, así como los cambios histológicos en el epidídimo de machos ovinos y bovinos.

III.- Hipótesis

El polidocanol inyectado en la cola de cada epidídimo, provocará la esclerosis y estenosis del mismo, impidiendo el transporte de espermatozoides en el eyaculado y por lo tanto la esterilización por azoospermia en carneros y toros.

IV.- Objetivo general

Evaluar el empleo del agente esclerosante polidocanol, administrado en la cola del epidídimo, para causar estenosis del epidídimo esterilizando a los animales, sin afectar la libido de los mismos.

V.- Material y Métodos

Localización del estudio

El trabajo se realizó en el Módulo de Producción de Ovinos “El Cenzontle”, que pertenece al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT, FMVZ-UNAM) donde se trabajaron a los carneros y en el rancho “El Ventilador” donde se trabajaron los toros.

Ambas unidades de producción se encuentran en Martínez de la Torre, Veracruz y tienen clima cálido – húmedo con una temperatura promedio de 23.4 °C y una precipitación anual de 1840 mm (García, 1988).

Animales experimentales

Se utilizaron 9 carneros Pelibuey que durante el estudio se mantuvieron en pastoreo rotacional, suplementados con 100 gr de concentrado comercial y cascarilla de cítrico. Además, se emplearon 8 toros (*Bos taurus x Bos indicus*) igualmente mantenidos en pastoreo rotacional. En ambos casos los animales tenían por lo menos 30 cm de circunferencia escrotal, condición corporal igual o mayor a 3 (escala 1 al 5 de acuerdo a Oliveira, *et al.*, 2011 y de Lucas, 2009), y ser animales púberes con al menos 1 año de edad y con producción de semen.

Mediciones en los animales experimentales

Para un mejor manejo y evitar estrés durante el procedimiento, los toros se contuvieron mediante la prensa ganadera y se tranquilizaron con Xilacina al 2%, a dosis de 0.1-0.3 mg/kg vía IM. A los carneros se les administró 0.05-0.01 mg/kg de Xilacina al 2% vía IV y fueron sujetados por una persona.

El diámetro testicular se midió de acuerdo al método descrito por Galina y Valencia (2008). Brevemente, los testículos se desplazaron hacia la parte distal del escroto y se midió la circunferencia escrotal con una cinta metálica (tipo flexómetro), **Imagen 1**.



Imagen 1. Medición de la circunferencia escrotal.

La consistencia de los epidídimos se estimó por palpación clasificándolos como: 1=duro y muy fibroso, 2=fibroso, 3=firme, 4=firme y elástico (normal) y 5=suave gelatinoso (Bavera y Peñafort, 2005).

Adicionalmente, en cada cola del epidídimo se midió la longitud de los ejes Medio-Lateral (M-L), Cráneo-Caudal (C-C) y Dorso-Ventral (D-V) con un vernier. **Imagen 2**

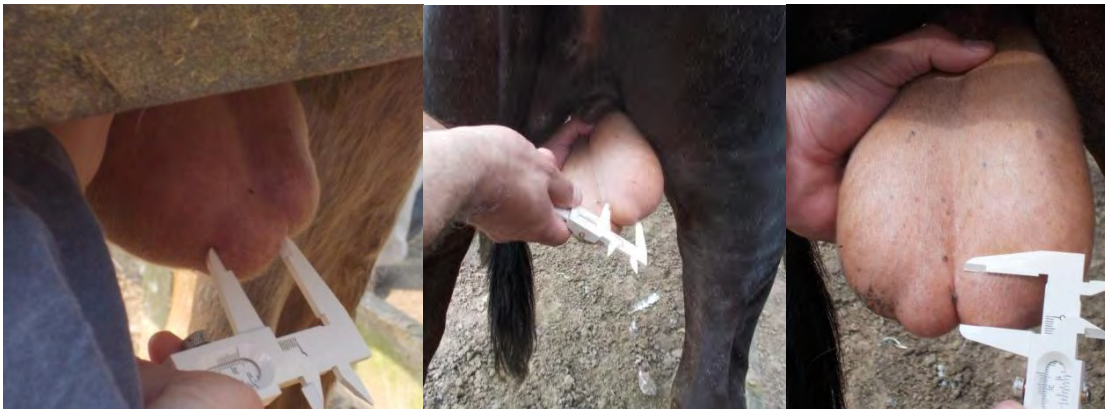


Imagen 2. Mediciones de la cola del epidídimo. A la izquierda el eje Medio-Lateral (M-L), al centro el eje Cráneo-Caudal (C-C) y a la derecha el eje Dorso-Ventral (D-V).

Por último, se colectó un eyaculado con la ayuda de un electroeyaculador (Electrojac 5 Ideal Instruments®, Neogen Company; **Imagen 3**) y se evaluó la apariencia, concentración espermática y morfología espermática del semen, así como la presencia de células de inflamación.



Imagen 3. Electroeyaculador, Electrojac 5 Ideal Instruments®, Neogen Company.

El electroeyaculador se lubricó, y se introdujo en el recto previamente evacuado (**Imagen 4**), orientando los electrodos ventralmente directamente sobre las glándulas sexuales accesorias. La eyaculación se logró estimulando a través de 32 pulsos (dos segundos de pulso y dos segundos de descanso) iniciando con un voltaje de baja intensidad (2 a 4 voltios) que incrementaron en intensidad gradualmente (8 a 10 voltios). Este patrón rítmico se repitió hasta obtener el eyaculado (**Imagen 5**) (Ruiz *et al.*, 2007).



Imagen 4. Colocación del Electroeyaculador.



Imagen 5. Colección de semen por electroeyaculación.

El semen se colectó en un cono plástico y evaluó de acuerdo a lo descrito por Galina y Valencia (2008), con los siguientes criterios:

- Apariencia del semen: se clasificó en un rango de 0 a 5, donde: 5=cremosa espesa, 4= cremosa, 3= cremosa tenue, 2= lechosa, 1=nebulosa, 0=clara o acuosa.
- Concentración de espermatozoides: Se tomó una muestra de 0.5 μ l con una pipeta de Thoma y se diluyó 1:200 con formol al 1%. Se cubrieron los extremos de la pipeta y se agitó suavemente con movimientos de muñeca durante dos minutos. Las tres primeras gotas del contenido de la pipeta se eliminaron y las siguientes gotas se depositaron en la Cámara de Neubauer. Los espermatozoides se contaron bajo el microscopio con el objetivo 40X. El número de espermatozoides presentes se calculó con el promedio de las dos secciones de la cámara (Mocé y Graham, 2006), usando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (x10}^6 \text{ espermatozoides/ml)} = (\bar{x}) (200) (5) (10000)$$

\bar{x} = promedio de espermatozoides de las dos secciones de la Cámara de Neubauer.

200= factor de dilución

5= campos contados en la cámara de Neubauer

10000= factor de conversión del volumen de la cámara (0.01mm³) a ml (1cc)

Los animales fueron clasificados como oligoespérmicos cuando la concentración espermática fue menor a 2000-3500 millones de espermatozoides/ml en carneros y 800-

2000 millones de espermatozoides/ml en bovinos, y/o azoospermicos cuando hay ausencia de espermatozoides (0 espermatozoides). Para dicha clasificación nos basamos en los criterios de la OMS para humanos (Sarabia, 2012) donde se considera azoospermia cuando la concentración espermática no alcanza el mínimo normal que es de 15 millones de espermatozoides/ml (concentración total 39×10^6) (Sarabia, 2012).

- **Morfología:** se evaluó junto con la presencia de células de inflamación (Nieto, 2011) mediante dos frotis hechos por empalme (“Squash”), teñidos con Diff Quik (Manual de Prácticas de Patología Clínica de la FMVZ-UNAM) o con Papanicolaou modificada (de Buen *et al.*, 2003). El frotis por empalme se realizó depositando una gota de eyaculado en el centro de un portaobjetos, extendiéndola con otro portaobjetos hasta que se consiguió un frotis uniforme. Para la tinción de Diff Quik el frotis se fijó al aire, y para la de Papanicolaou se fijó en alcohol etílico al 96% durante 10 minutos. El porcentaje de anomalías espermáticas se estimó analizando con el objetivo 40X, cinco campos de los frotis de semen obtenidos en los días, 0 y 133 en el caso de los carneros y en los días 0 y 125 en los toros.

Todas las mediciones y observaciones antes mencionadas se realizaron en los carneros los días 0, 21, 61, 112 y 133 (**Figura 1**) y en los toros en los días 0, 26, 40 y 125 (**Figura 2**).

Inyección intraepididimal de Polidocanol

El escroto se desinfectó previo a la aplicación del tratamiento con cloruro de benzalconio. En el caso de los borregos el escroto fue rasurado antes de su desinfección. Para aplicar el tratamiento, la cola del epidídimo se localizó por palpación y se le inyectó 1ml de Polidocanol al 3% en forma de espuma (Venofresh 3%, Mesoesthetic®) al epidídimo derecho con una aguja de calibre #25G teniendo cuidado de no acercarse demasiado al testículo para evitar su inoculación accidental. La aguja se reposicionó durante la inyección para distribuir el Polidocanol dentro de la cola del epidídimo teniendo cuidado de no dirigirla verticalmente, para evitar la inoculación del testículo **Imagen 6**.



Imagen 6. Desinfección de la cola del epidídimo (panel de la izquierda) e inyección intra-epididimal de 1 ml de polidocanol al 3% (panel de la derecha). Ambos epidídimos fueron inoculados.

Efecto agudo de la inyección de polidocanol en la temperatura de los epidídimos

Para estimar el efecto inflamatorio agudo causado por la inyección con polidocanol se midió la temperatura cutánea en el área sobre la cola de los epidídimos en siete corderos con una cámara térmica (FLIR® i7). La temperatura cutánea sobre el epidídimo derecho (epidídimo tratado) fue comparada contra la temperatura cutánea del epidídimo izquierdo que no fue tratado. Las mediciones se tomaron previo a la inyección (hora 0), una hora después de la inyección y a las 22, 26 y 36 h después (**Imagen 7**). Una vez terminadas estas mediciones el epidídimo izquierdo fue tratado como se indicó anteriormente. En el caso de los bovinos (n=8) las mediciones de la temperatura se hicieron previo al tratamiento y una hora después del mismo.



Imagen 7. Medición de la temperatura en cola del epidídimo con cámara de imagen térmica.

Prueba de libido

La libido de los machos se evaluó en 5 carneros tratados y 5 controles midiendo el tiempo que toma al macho en localizar a una hembra en celo y realizar la primera monta, a partir del momento en que entra al corral de evaluación (Orihuela, 2014). Para esta prueba se colocaron en un corral un grupo de 161 hembras vacías, de las cuales, por lo menos dos se encontraban en estro. Durante la evaluación los carneros tenían un mandil que cubría el vientre y evitaba la penetración y la eyaculación del carnero.

Colección de muestras y evaluación histopatológica

Los animales fueron sacrificados en rastro cinco meses después del tratamiento, según la NOM-033-ZOO-1995, y los testículos fueron recolectados. Se obtuvieron muestras de tejido testicular (1cm^3) y del epidídimo (1cm^3) de cada testículo. Las muestras fueron fijadas en formol al 10% durante 72 horas. Posteriormente, las muestras se procesaron en un histoquinete automático y se incluyeron en bloques de parafina.

Para la evaluación histológica se efectuaron cortes de 3 a 5 μm de grosor con un micrótopo, se montaron en portaobjetos y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E) para su observación y análisis.

En las **Figuras 1 y 2** se muestra el flujo de actividades para los toros (Figura 1) y los borregos (Figura 2). En el día 0 se realizó la colección de semen para su evaluación, se midió la circunferencia escrotal, consistencia de los epidídimos y los ejes Medio-Lateral, Cráneo-Caudal y Dorso-Ventral de los epidídimos. Posterior a estas mediciones se inyectó 1ml de polidocanol en el epidídimo derecho en ovinos y bovinos y el epidídimo izquierdo se inyectó 24h después. Posterior al tratamiento se evaluó el semen en los días 21, 61, 112 y 133 para los carneros y en los días 26, 40 y 125 para los toros, se midió la circunferencia escrotal, la consistencia de epidídimos y las dimensiones del epidídimo. Al día 152 se sacrificaron los animales y se colectaron los testículos.

Figura 1.
Cronograma de toma de muestras después de la inoculación del polidocanol al 3% en los epidídimos (Día 0) y sacrificio de los carneros para la colección de testículos.

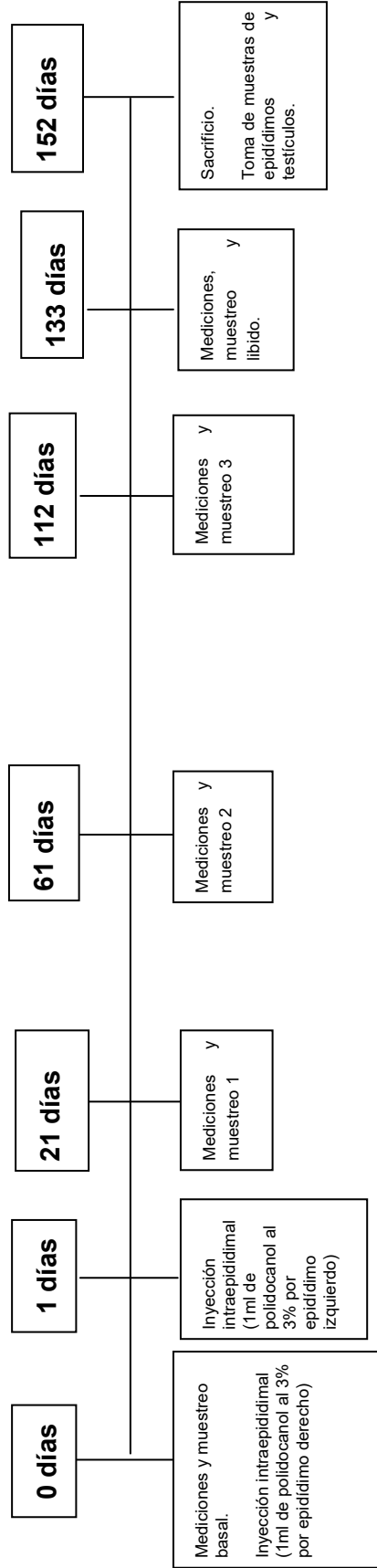
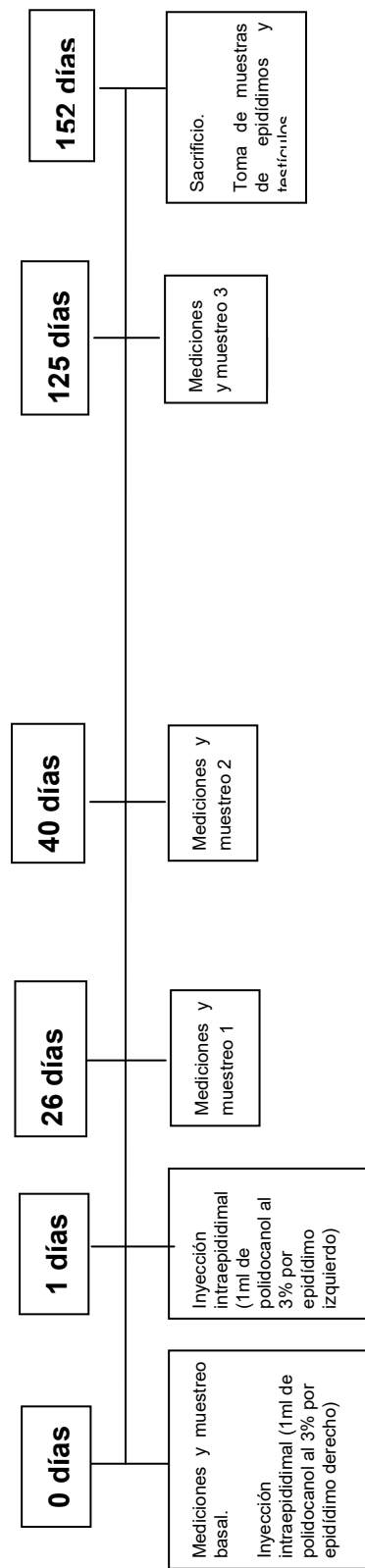


Figura 2.
Cronograma de toma de muestras después de la inoculación del polidocanol al 3% en los epidídimos (día 0) y sacrificio de los toros para la colección de testículos.



VI. Análisis estadísticos

El efecto de la inyección de polidocanol sobre la circunferencia escrotal, concentración espermática y las mediciones del epidídimo (M-L, C-C y D-V), se evaluó por análisis de varianza con mediciones repetidas, contrastando las mediciones del día 0 contra las mediciones posteriores mediante diferencia mínima significativa (least significant difference, LSD). La concentración de espermatozoides fue analizada posterior a la transformación logarítmica de la concentración para corregir la heterogeneidad de la varianza. La temperatura de la piel sobre los epidídimos se vió afectada por la temperatura ambiental, por lo que el análisis del efecto de la inyección del polidocanol se realizó comparando la temperatura cutánea del testículo tratado (derecho) contra la del testículo testigo (izquierdo) tomando el tiempo de medición como un bloque. La consistencia del epidídimo y la apariencia del semen, fueron analizadas por la prueba de Kruskal-Wallis de un solo sentido.

VII.- Resultados

Inmediatamente posterior a la inyección de polidocanol se notó un aumento en el tamaño y la consistencia de la cola del epidídimo causado por la presencia del polidocanol dentro del epidídimo, tanto en carneros como en bovinos. Sin embargo, los animales no tuvieron cambios de comportamiento que indicaran signos de malestar posterior a la inyección, ni durante el resto del estudio.

Efectos en la concentración de espermatozoides

La concentración espermática de los carneros al día 0 fue de 1579.9×10^6 /ml. La inyección intraepididimal redujo significativamente ($p < 0.001$) la concentración espermática del eyaculado a partir del día 21 post-tratamiento a 17.6×10^6 /ml. Un solo animal presentó un incremento de la concentración espermática al día 112, y no podemos decir que es un aumento significativo (Cuadro 1).

El tratamiento con polidocanol redujo la concentración espermática en todos los carneros. Se consideró que el 77.7% de los carneros respondió al tratamiento con polidocanol quedando azoospermicos, mientras que 22.3% sufrieron oligospermia.

En el caso de los toros la concentración espermática en la muestra previa al tratamiento con polidocanol fue de 2,646.8 millones de espermatozoides/ml, y el tratamiento intraepididimal redujo la concentración espermática del eyaculado ($p < 0.005$) a partir del día 26 y hasta el día 125, quedando en 1.9 millones de espermatozoides/ml. Se consideró que el 25% de los toros respondió al tratamiento quedando azoospermicos y el 75% restante sufrió oligospermia (Cuadro 2).

Cuadro 1. Circunferencia escrotal, concentración espermática y medidas de los ejes Cráneo-Caudal (C-C), Dorso-Ventral (D-V) y Medio-Lateral (M-L) de los epidídimos derecho e izquierdo de carneros Pelibuey (n=9) previo al tratamiento (día 0) y en los días, 21, 61, 112 y 113 después de la inyección intra epididimal de 1ml de polidocanol al 3%.

Día	Circunferencia escrotal (cm)	Concentración espermática(X10 ⁶ /ml)	Mediciones de epidídimo (cm)		
			C-C	D-V	M-L
0	30.73 ^c	1579.9 ^c	2.85 ^a	2.7 ^a	2.67 ^a
21	31.42 ^b	17.6 ^b	2.89 ^a	3.52 ^b	2.80 ^a
61	30.76 ^c	71.5 ^b	2.78 ^a	3.34 ^b	2.58 ^a
112	31.1 ^b	105.0 ^b	3.83 ^b	2.80 ^a	3.06 ^b
133	*	50.6 ^b	*	*	*
Error estándar de la diferencia	0.74	384.8	0.14	0.24	0.13
P	0.68	<0.001	<0.001	0.001	0.016

* (Sin dato)

Cuadro 2. Circunferencia escrotal, concentración espermática y medidas de los ejes Cráneo-Caudal (C-C), Dorso-Ventral (D-V) y Medio-Lateral (M-L) de los epidídimos derecho e izquierdo de toros 8 toros *Bos tauros x Bos indicus* (n=8), previo al tratamiento (día 0) y en los días, 26, 40 y 125 después de la inyección intraepididimal de 1ml de polidocanol al 3%.

Día	Circunferencia escrotal (cm)	Concentración espermática(X10 ⁶)	Medición de epidídimo (cm)		
			C-C	D-V	M-L
0	30.51 ^c	2646.8 ^c	2.56 ^a	1.85 ^a	2.53 ^a
26	31.7 ^b	189.9 ^b	3.47 ^b	3.34 ^b	3.35 ^b
40	32.2 ^b	86.6 ^b	2.86 ^a	2.82 ^b	2.90 ^a
125	32.75 ^b	1.9 ^b	2.49 ^a	2.89 ^b	2.81 ^a
Error estándar de la diferencia	0.29	742.3	0.16	0.21	0.21
P	<0.001	0.005	<0.001	<0.001	<0.001

Apariencia del semen

La apariencia del semen en los carneros y toros se mostró cremosa (4) o cremosa tenue (5) en el día 0. Sin embargo, a partir del muestreo del día 21 en carneros y 26 en bovinos, el semen tuvo un cambio en su apariencia hacia 0=clara o acuosa

Morfología

La evaluación morfológica de los espermatozoides en los eyaculados del día 0 mostró 10.2% de anomalías en carneros y 10.6% de anomalías en los toros. Para los días 125 y 133 se encontraron 66.6% y 20.4% de espermatozoides anormales en los toros y carneros respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de espermatozoides anormales en los eyaculados de carneros y toros tratados con una inyección intraepididimal de polidocanol al 3%, las anomalías se evaluaron en frotis del eyaculado teñidas con Diff-Quik en los días 133 de los carneros y 125 de los toros.

	Carneros		Toros	
	Día 0	Día 133	Día 0	Día 125
Cola enrollada	4%	7.1%	1.6%	2.13%
Cola doblada	0%	0.1%	0%	0.50%
Cola quebrada	6.2%	11%	9%	59.25%
Cabeza o cola suelta	0%	2.2%	0%	0.88%
TOTAL	10.2	20.24%	10.6%	66.63%

Además, se encontraron células de descamación y escasos macrófagos en los frotis realizados (**Imagen 8**).

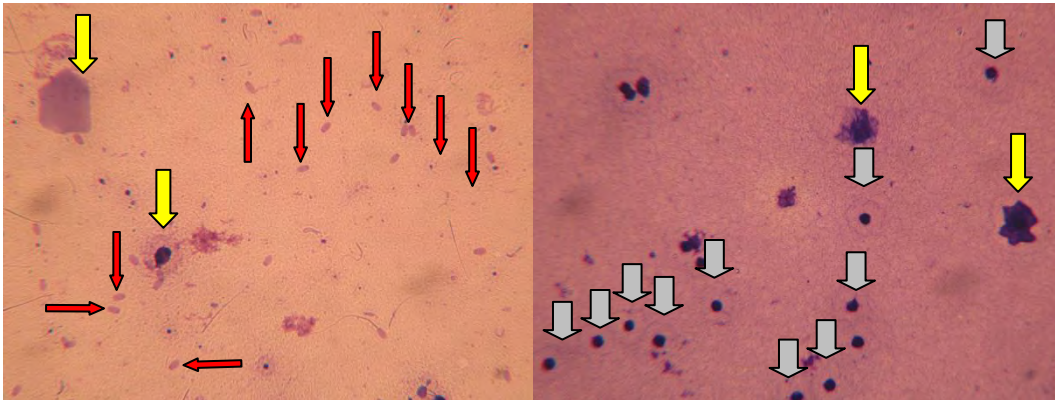


Imagen 8. Frotis (Papanicolaou, 10x) en donde se observan espermatozoides con anomalías tanto en cabeza como en cola ↓, así como células de descamación ↓ células mononucleares ↓ (panel izquierdo), frotis por empale teñido con Diff-Quik

Circunferencia escrotal

La circunferencia escrotal promedio previa a la inyección intraepididimal de polidocanol (día 0) fue de 30.73 cm y 30.5 cm para carneros y toros respectivamente (cuadro 1).

En el caso de los toros se presentó un incremento en la circunferencia escrotal ($p < 0.001$) a partir del día 40 (cuadro 2).

Consistencia de los epidídimos

La consistencia de los epidídimos derecho e izquierdo previa a la inyección en el día 0 fue firme y elástico (calificación 4 normal) para los carneros y los toros.

En los carneros se mostró un cambio de consistencia de los epidídimos al día 21 de normal (clasificación= 4) a fibroso (clasificación = 2), mostrándose los epidídimos duros y muy fibrosos (clasificación 1) al día 112 y regresando a fibrosos (calificación 2) al día 133 ($P < 0.001$).

En el caso de los toros, la consistencia de los epidídimos cambiaron a duros y muy fibrosos (clasificación=1) al día 26, regresando a fibrosos (calificación 2) al día 125, difiriendo ($p < 0.01$) de la consistencia presente al inicio del estudio.

Mediciones del epidídimo

En el cuadro 1 se presentan las mediciones que se realizaron en los epidídimo derecho e izquierdo de los carneros, mostrando aumentó de dimensiones en los ejes D-V ($p < 0.001$) que en el día 21 y 61 y en el eje C-C ($p < 0.001$) y M-L. ($p < 0.016$) al día 112.

En el caso de los bovinos (cuadro 2) se puede observar un aumento en las medidas C-C, D-V y M-L al día 26 ($p < 0.001$).

En el cuadro 4 se muestran los tiempo a la primer monta de animales sin tratamiento y con tratamiento, en donde podemos observar que los animales tratados tuvieron menor tiempo en su primer monta a pesar de su tratamiento con polidocanol, se observa que su libido no disminuyó o no se vió perjudicada.

Cuadro 4. Tiempo a la primer monta de animales tratados y no tratados.

Controles	Tiempo 1er monta	Tratados	Tiempo 1er monta
1	3 min 28 seg	1	1 min 40 seg
2	5 min	2	1 min 36 seg
3	3 min 36 seg	3	13 seg
4	2 min 52 seg	4	37 seg
5	16 seg	5	1 min
\bar{x}	2min86seg		1min12seg
Desviación estándar	1.76		0.26

Cambios histológicos

El tratamiento con Polidocanol al 3%, causó cambios degenerativos en los epidídimos de los toros y carneros. El examen histológico mostró, epididimitis linfoplasmática discreta multifocal invadiendo membrana basal, además, presentaron fibrosis intersticial difusa con células mononucleares destruyendo los conductos eferentes, epididimitis piogranulomasa multifocal en todos los animales, mostrando en su interior abundantes acúmulos de espermatozoides siendo fagocitados por los macrófagos. Esta invasión provocó una

reacción celular reparativa, en forma de infiltrados linfocíticos, células plasmáticas y células inflamatorias alrededor de los vasos sanguíneos.

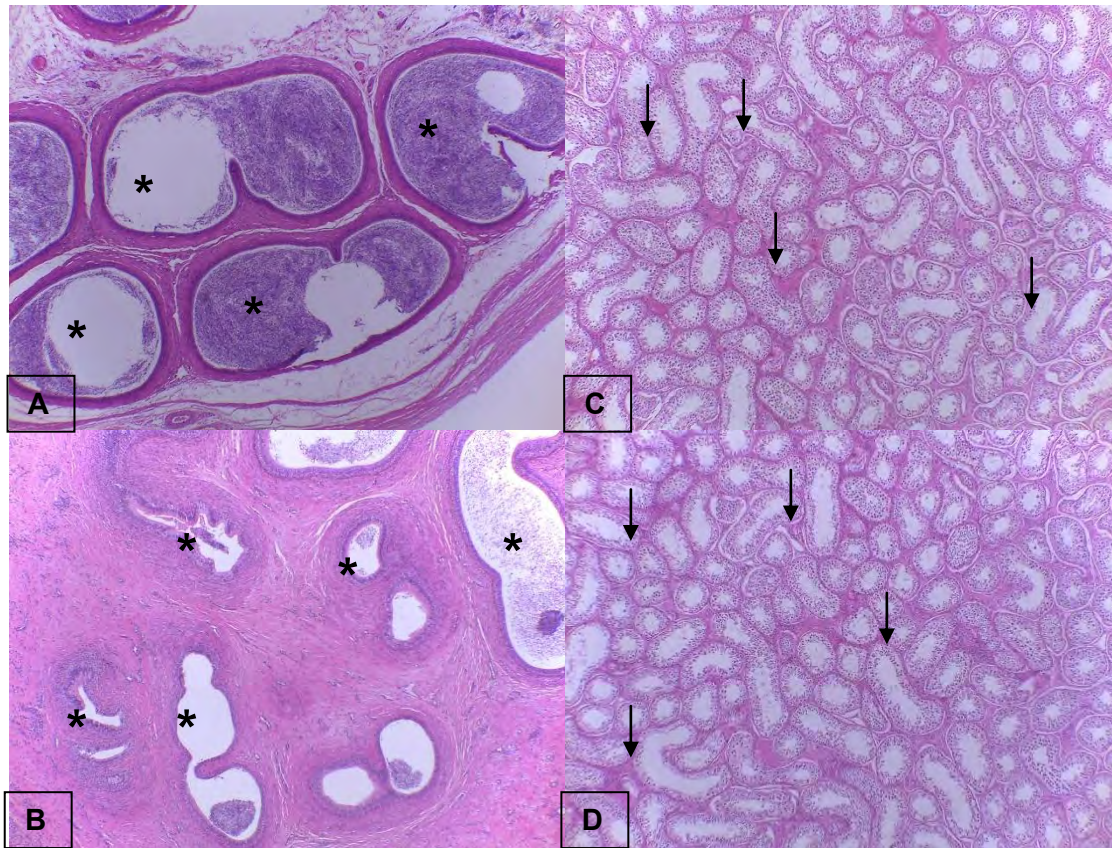
En ocasiones el mismo corte de tejido mostraba conductos del epidídimo ocupados por restos celulares y otros desocupados.

Análisis histológico de los testículos

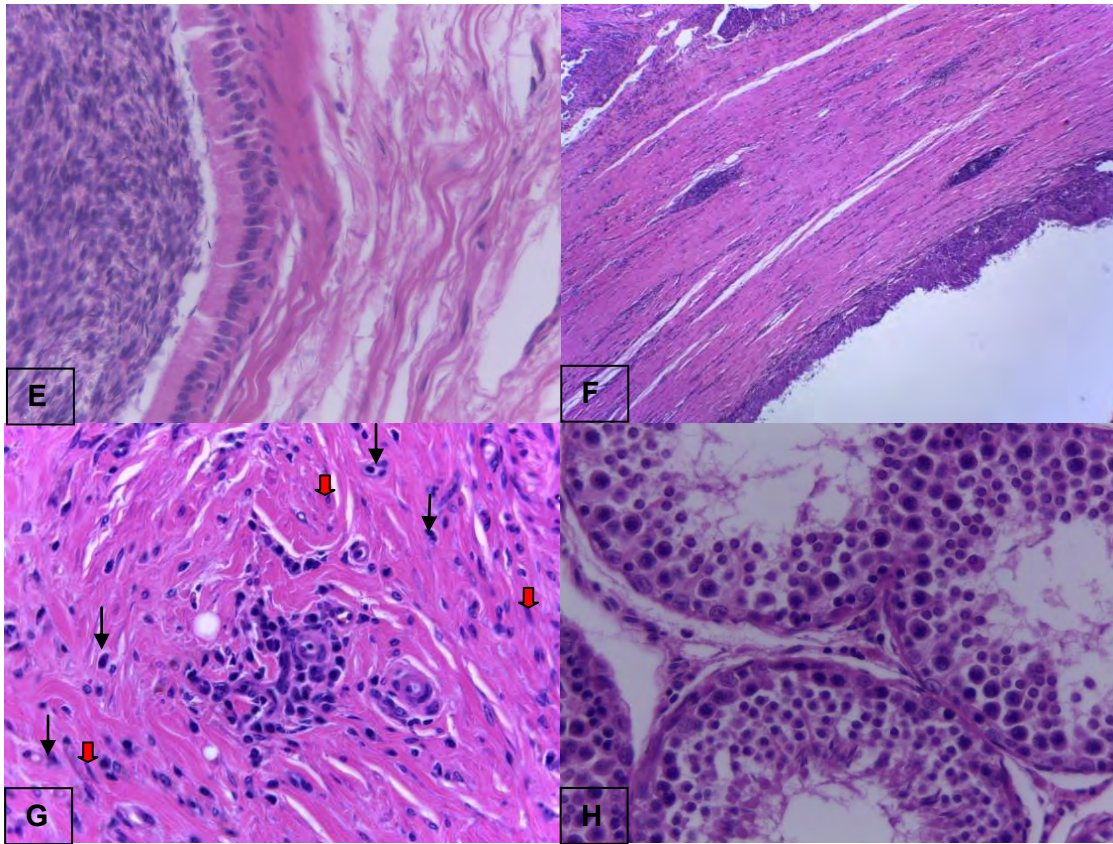
A pesar de que los tratamientos fueron aplicados en los epidídimos, en 5 (55.5%) de los carneros y 2 (25%) de los toros tratados se presentaron cambios histológicos en los testículos principalmente por la atrofia de células germinales.

En aquellos animales con cambios a nivel del testículo, se encontró atrofia con algunos túbulos con solo células de Sertoli, una ligera dilatación de la luz y fibrosis peritubular. Infiltración de leucocitos y la eliminación de las células germinales, de espermatozoides y células de Sertoli, además de mostrar zonas con tejido fibroso. Sin embargo, el daño inducido fue variable y los túbulos seminíferos no se vieron afectados de manera uniforme.

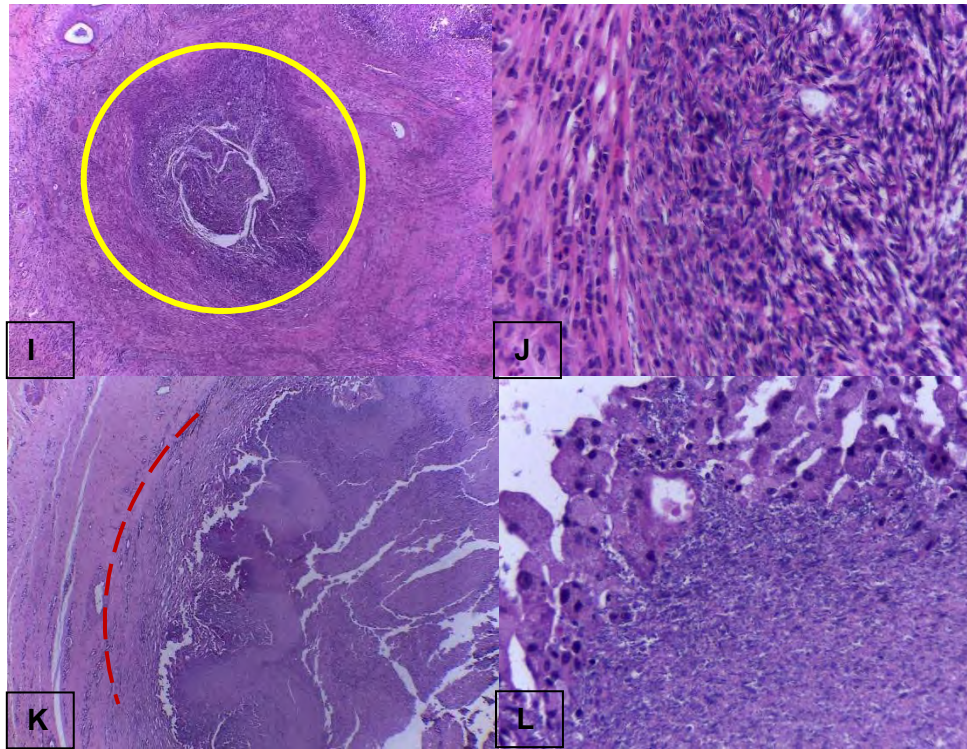
Cambios histopatológicos



Microfotografías Hematoxilina-Eosina (4X). **(A)** Sección histológica de la cola del epidídimo de borrego control en el que se ven con detalle los conductos eferentes (*) y un tejido conjuntivo homogéneo. **(B)** Sección histológica de la cola de epidídimo de borrego tratado en donde se observa fibrosis del tejido conjuntivo abarcando el espacio de los conductos eferentes (*). Sección de testículo de borrego donde podemos observar con detalle los túbulos seminíferos ↓**(C)** y tratado **(D)** el tejido intersticial en ambos sin cambios.



Microfotografía HE 40X (**E**). Se puede ver el epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios. Se observan el tejido conectivo en buen estado sin fibrosis además se aprecian los espermatozoides en conducto eferente. (**F**) Microfotografía HE 10X podemos observar un conducto eferente sin epitelio cilíndrico pseudoestratificado (**G**) Microfotografía HE 40X. Tejido fibrosado donde vemos fibroblastos (↓) y células mononucleares (↓). (**H**) Microfotografía HE 40X. Se pueden apreciar las células de Leydig, una fina capa de células mioepiteliales que es el revestimiento de los túbulos seminíferos y en el interior de los túbulos se observan núcleos basofílicos, escaso citoplasma que corresponden a espermátidas y algunos a espermatocitos secundarios que están más próximos a la luz del túbulo.



I) Microfotografía 10x tejido conectivo de epidídimo con Granuloma delimitado en color amarillo. **J)** Microfotografía 40X acercamiento del Granuloma de la imagen anterior, en donde podemos observar espermatozoides y células inflamatorias. **K)** Microfotografía HE 4X. Granuloma en epidídimo con necrosis delimitado por la línea punteada color rojo. **L)** Microfotografía HE 40X se puede observar el contenido del Granuloma con espermatozoides, y alrededor del Granuloma macrófagos que lo están delimitando.

Temperatura

El tratamiento intraepididimal con polidocanol al 3% no causó variaciones significativas en la temperatura cutánea en la región de la cola del epidídimo tratado comparado con la del epidídimo no tratado, en ninguna de las especies tratadas.

VIII.- Discusión

Los resultados indican que la inyección de polidocanol en la cola del epidídimo es un método sencillo para inducir infertilidad en carneros y toros, pues ocasiona azoospermia en el 77.7% de los carneros y 25% de los toros.

El método no es efectivo del todo, pues en el 22.3% de los carneros y 75% de los toros se observaron espermatozoides en el eyaculado a lo largo de la investigación (133 y 125 días). Esto pudo deberse a una baja cantidad administrada que no causó una fibrosis lo bastante grave para obstruir el conducto deferente de la cola del epidídimo o causar la atrofia de todos los túbulos (Galván *et al.*, 1994), por lo tanto solo se ocasionó una oligospermia.

A pesar de que los animales no mostraron signos de malestar, probablemente por los antecedentes del uso de este producto como anestésico local (Jensen *et al.*, 2013), el agente esclerosante utilizado en esta investigación modificó la concentración de espermatozoides, la apariencia del semen, la estructura en los espermatozoides y ocasionó daños en epidídimo y testículo.

Las reacciones reportadas en la literatura, a pesar que no todos los autores usaron polidocanol en sus estudios solo Jensen, fueron prurito, dolor, decaimiento; las cuales usualmente se presentan, pero no de manera exclusiva. Algunos autores especulan que las reacciones están asociadas a una inapropiada técnica de aplicación de las sustancias, que genera la activación de las terminaciones de los nervios aferentes asociados a la sensación de dolor (Kutzler, 2006 y Levy *et al.*, 2008). Probablemente la cantidad administrada en este estudio no fue la adecuada para provocar ese tipo de reacciones o su efecto como anestésico local inhibió las reacciones antes mencionadas.

Se observaron cambios en todos los epidídimos de los animales, sin embargo, a pesar de que el polidocanol no se inyectó en testículo se observaron cambios histopatológicos, lo que podemos comparar con estudios realizados en perros que fueron inyectados con gluconato de zinc en testículo por Oliveira, *et al.*, (2007 y 2012) en los que también se observan cambios en las zonas más cercanas de la inyección. En este estudio, los cambios observados en el epidídimo y testículo se podrían relacionar a la concentración utilizada en esta especie, que en comparación a las concentraciones utilizadas en estudios realizados en perros (Oliveira, *et al.*, 2007, Oliveira, *et al.*, 2012 y Oliveira, *et al.*,

2013) es menor, ya que en los perros se llegan a inyectar hasta 0.55ml. Por lo tanto de acuerdo a lo anterior podemos decir que en este estudio la cantidad administrada (1ml por epidídimo) a los animales pudo ser baja de acuerdo al tamaño de sus epidídimos, ocasionando que no se obtuviera azoospermia en todos los animales.

Se sabe que si aumentamos la concentración de productos esclerosantes podemos inducir una reacción inflamatoria, que se caracteriza por la presencia de células mononucleares. Por lo tanto, la reacción inflamatoria observada en epidídimo y algunos testículos, podría ser responsable de la muerte de las células germinales y por consiguiente causar la esterilidad o no. Asimismo, ser la responsable de un aumento en el tamaño de los epidídimos (Russel, *et al.*, 1990). Además, la fibrosis puede ser la causa del aumento de colágeno, depositado por los fibroblastos activos y los que proliferan. La inyección también provocó los cambios en las células germinales así como algunas zonas de necrosis.

Estudios previos realizados por Wieve (2009), muestran que las células inflamatorias tenían actividad fagocítica y citotóxica elevada después del tratamiento, por lo tanto es razonable concluir que la reacción inflamatoria observada es responsable de las lesiones en el epitelio, de la muerte de las células germinales y de la infertilidad. Fahim *et al.*, (1993) demostraron en su estudio de esterilización en perros con inyección intra epididimal de arginina de zinc, que altas concentraciones de Zinc, sustancia que fue usada para causar infertilidad, inhiben la división y replicación de las células germinales, indujo a una atrofia de los túbulos y el deterioro de la espermatogénesis por consiguiente la disminución de la concentración de espermatozoides y el cambio de apariencia en el semen (de cremosa a clara) en los animales. Los túbulos seminíferos vacíos luego colapsan y el proceso de curación crea tejido cicatrizal que bloquea el desplazamiento de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos y rete de testis (Leatherm, 1970).

Basados en la histopatología reportada por Hyoung (2014) en donde hubo atrofia de los túbulos seminíferos y degeneración de células germinales, resultando en la ruptura de la barrera de las células de Sertoli. Así mismo, se observa la presencia de un tejido de cicatrización debido al incremento de depósito del colágeno generado por la presencia de fibroblastos, similar al estudio realizado por Fagundes (2013), lo que haría que el tejido se contraiga como en cualquier proceso de reparación tisular.

La eficiencia en cuanto a azoospermia fue en el 25% de los carneros y en el 77.7% de los toros de los animales tratados, fue apoyada por la inducción de fibrosis peritubular. Estos efectos son notables en otros estudios previos realizados con agentes químicos usados para la esterilización (Immegart y Threlfall, 2000; Johnson, 1997). La infiltración de leucocitos en los túbulos seminíferos y en espacios intersticiales después del tratamiento con polidocanol pudo haber sido causada por el daño del tejido testicular o por la degeneración, con lo que pudieron haberse liberado cantidades significativas de factores quimiotácticos responsables de la intervención de leucocitos (Heath y Arowolo, 1987).

Se puede suponer entonces que la degeneración testicular fue debida a la generación de radicales libres en el testículo, los cuales se ocasionan por procesos de estrés oxidativo, y además se consideran como inhibidores de la espermatogénesis (Alvarez y Story, 1984; Georgiou *et al.*, 1987; Aitken, 1994 y Jana *et al.*, 2002). Podemos suponer que pasó esto debido a que hubo degeneración testicular, por lo cual se provocó la producción de radicales libres los cuales afectaron también la función espermática.

Las anormalidades encontradas en los espermatozoides, se clasificaron en secundarias ya que son inespecíficas, lo que sugiere que ocurrieron en el tránsito por el epidídimo (Bálcazar y Porras). Lo anterior pudo deberse a que el epidídimo no se encontraba en buen estado, como lo demuestran los hallazgos de los cortes histológicos, donde se aprecian cambios degenerativos, fibrosis intersticial que abarca a los conductos eferentes y necrosis multifocal. Además de que el 100% de los animales, tanto carneros como toros, presentaron epididimitis piogranulomatosa.

IX. Conclusión

Este tratamiento no afectó la libido de los carneros tratados lo que resulta en una buena alternativa para tratar machos celadores, en los que es indispensable mantener su comportamiento sexual para una buena detección de celos, aunque para otras especies un anticonceptivo ideal sería hacerlos infértiles así como suprimir sus características sexuales, lo que no se desea en animales de producción en los que se quiere tener machos capaces de detectar y bioestimular hembras (Fagundes, *et al.*,2014).

La esterilización con agentes esclerosantes sería una opción aceptada ya que los dueños, sobre todo hombres, se niegan a retirar permanentemente los testículos de los animales con la errónea creencia de que el animal adquiere comportamientos asociados a las hembras. Bloomeberg (1996) y Soto *et. al.*, (2007) señala que la esterilización con agentes químicos al causar atrofia y disminuir la espermatogénesis disminuye el montaje y libido, pero en comparación con nuestro estudio pudimos observar que no disminuyo la libido.

Los resultados de este estudio muestran que se obtuvieron concentraciones de espermatozoides a niveles inferiores a los normales en carneros y toros. Sin embargo, dado a los cambios histológicos observados sería necesario evaluar si estos cambios testiculares no disminuyen la libido de los animales en un tiempo mayor al analizado en este estudio, y probar su fertilidad poniendo a los machos con las hembras.

X.- Referencias

- Aitken RJ. (1994). A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev*, 6,19-24
- Alonso L, (2005). Evaluación de la inseminación artificial a tiempo fijo (48 ó 72 horas) después de un tratamiento sincronizador sobre la tasa final de preñez en hembras *Bos indicus*. Tesis de licenciatura. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México.
- Alos, J.; Carreño P.; López, J.A.; Estadella, B.; Serra-Prat, M. y Marinello, J. (2006). Efficacy and Safety of Sclerotherapy Using Polidocanol Foam: A Controlled Clinical Trial. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 31(1), 101-107.
- Alvarez, J.G. and Story, B.T., (1984). Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 30, 323-331
- Amatayakul-Chantler S., Jackson J.A., Stegner J., King V., Rubio L.M.S, Howard R., Lopez E. y Walker J. (2011). Immunocastration of *Bos indicus* × Brown Swiss bulls in feedlot with gonadotropin-releasing hormone vaccine Bopriva provides improved performance and meat quality. *Journal of Animal Science*, 90 (11), 3718-3728.
- Basulto R., Milanes C., Rojas A., Fuentes F., Izquierdo N., Bertot J., Hernandez H., Sanchez D., Calzada L., Junco J. (2003). Efectos de la inmunización contra GnRh sobre la estructura y función testicular en perros adultos. *Biotecnología Aplicada*. (20), 20-24
- Baruselli P.S., Marques M.O., Calvalho N.A., Madureira E.H, Campos Filho E.P, (2002). Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vaca de corte lactantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 26(3), 218-221.
- Bavera, G.A., Peñafort, C. (2005). Examen reproductivo en toros. Obtenido el 03 de Octubre de 2015 en: http://www.produccion-animal.com.ar/información_tecnica/cria_toros/51-examen_reproductivo_completo_de_toros
- Bergan J, Pascarella L, Mekenas L, (2006). Venous disorders: treatment with sclerosant foam. *J Cardiovasc Surg*; 47:115-24

Bespin A, Rivero I. y Morgado A (2007). Historia y uso de la inseminación artificial en la agropecuaria “La Fundación”, Estado Guárico. Obtenido el 03 de Octubre de 2014, de http://www.avpa.ula.ve/eventos/i_simposio_tecnologias/pdf/articulo7.pdf

Bloomberg MS. (1996). Surgical neutering and non-surgical alternatives. *J Am Vet Med Assoc*; 208, 517–519

Córdova I. A.; Córdova J.M.S.; Córdova J.C.A. y Guerra L.J.E. (2008). Procedimiento para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras, 19 (1), 67-79.

De Buen de Agüero, N. (2011). *Citología Diagnostica Veterinaria*. México: Manual Moderno.

Fahim, M. S.; Wang, M.; Sutcu, M. F.; Fahim, Z. y Youngquist, R. S. (1993). Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, 47(1), 107-122.

Fagundes A. K. F., Oliveira E.C.S., Tenorio B.M., Melo C.C.S., Nery L.T.B., Santos F.A.B., Alves L.C., Douglas R.H., Silva V.A. (2014). Injection of a chemical castration agent, zinc gluconate, into the testes of cats results in the impairment of spermatogenesis: A potentially irreversible contraceptive approach for this species?. *Theriogenology*, 81, 230–236.

Ferreira de Quadros, S. A. y Piva Lobato, J. F. (2006). Bioestimulacao e comportamento reproductivo de vacas de corte. *Acta scientiarum. Animal sciences*, 28(4), 401-407.

Galina C .H.y J. Valencia (2008). *Reproducción de los animales domésticos*, México: Limusa.

Galván Pérez, M. del R. (1994). Esterilización en el perro por inyección del metilcianoacrilato en la cola del epidídimo, *Rev. Vet. Méx.*, 25, 3.

García, E. (1988). *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Georgiou, M., Parkins, L.M. and Payne, A.H., 1987. Steroid synthesis-dependent, oxygen-mediated damage of mitochondrial and microsomal cytochrome P-450 enzymes in rat Leydig cell cultures. *Endocrinology*, 121, 1390-1399

Guex JJ. (2005). Contra indications of sclerotherapy, update 2005 *J Mal Vasc.*;30:144-9.

Hamel-Desnos, C.; Desnos, P.; Wollmann, J. C. ; Ouvry, P.; Mako, S. y Allaert, F.A. (2003). Evaluation of the Efficacy of Polidocanol in the Form of Foam Compared With Liquid Form in Sclerotherapy of the Greater Saphenous Vein: Initial Results. *Dermatologic Surgery*, 29 (12), 1170-1175.

Hamel-Desnos, C.; Ouvry, P.; Benigni, J.P.; Boitelle, G.; Schadeck, M.; Desnos, P.; Allaert, F.A. (2007). Comparison of 1% and 3% polidocanol foam in ultrasound guided sclerotherapy of the great saphenous vein: a randomised, double-blind trial with 2 year-follow-ups. "The 3/1 Study". *Eur J Vasc Endovasc Surg.*, 34(6), 723-729.

Heath E, Arowolo R. (1987). The early histopathologic effects of intratesticular injection with hyperosmolar glycerol, glucose or NaCl solutions. *Androl*, 19, 654-661.

Hyoung k.P, Sung H.P., Hyeong k.G., Yong S.L. y Sang B. R. (2014). Induction of Contraception by Intraepididymal Sclerotherapy. *World J Mens Health*. 32(2), 83-86.

Immegart HM, Threfall WR. (2000). Evaluation of intratesticular injection of glycerol for non-surgical sterilization of dogs. *Am J Vet Res*, 61, 544-549.

Jana K, Samanta PK, Ghosh D. (2002) Dose dependent response to an intratesticular injection of calcium chloride for induction of chemosterilization in adult albino rats. *Vet Res Commun*, 26, 651-673.

Jana, K. y Samanta, P. K. (2011). Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. *BMC Veterinary Research*, 39 (7).

Jensen JT, Rodriguez MI, Liechtenstein-Zábrák J, Zalanyi S. (2004) Transcervical polidocanol as a nonsurgical method of female sterilization: a pilot study. *Contraception*, 70 (2), 111–115

Jensen, J.T.; Hanna, C.; Yao, S.; Micks, E.; Edelman, A; Holden, L. y Slayden, O.D. (2013). Blockade of tubal patency following transcervical administration of polidocanol foam: initial studies in rhesus macaques. *Contraception*, 89(6), 540-549

Johnson AD. (1997) The influence of cadmium on the testis. In: The testis. Volume 4. Edited by Johnson AD, Gomes WF. Academic Press: New York, 1191-2001.

Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS. (2001). Canine and feline theriogenology. Philadelphia, PA: WB Saunders.

König H.E., Liebich, H.G. (2012). Anatomía de los animales doméstico. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso: Texto y atlas a color. Tomo 2. México. Panamericana.

Kutzler M., Wood A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. Theriogenology. 66(5), 14–525.

Leathem J.H., Johnson A.D, Gomes M.R, Vandemark N.L. (1970). Nutrition in the testis. New York: Academic Press, vol. 3.

Levy J.K. , Crawford C, Appel L.D. (2008). Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. Am J Vet Res. 69(1), 140–1.

Mann, M.W. (2011). Sclerotherapy: it is back and better. Clinics in Plastic Surgery, 38(3):475-87.

Mocé, E . and I.K. Graham(2006). Cholesterol-loaderyd clodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. J . Anim. Scr. 8 (4), 826-833.

Moraes C. Figueira M, Ferrari A, Gonçalves V, Luiz R. (2005). Inseminación artificial con tiempo fijo (IATF) en bovinos de engorde. Memorias del I Congreso Internacional de Reproducción Bovina, Bogotá: Colombia, Intervet 97-102.

Morgan, G.L. y Dawson L.J. (2008). Development of teaser bulls under field conditions. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 24(3), 443-53.

Muñoz R.M.A, Vargas R.I.M y Soler-Tovar D. (2011). Métodos para el control de poblaciones caninas: una introducción. Revista Sapuvet de Salud Publica, 1 (2), 63-79.

Nieto, D. K.; Urbina, M.; Medina, R.; Benjamín, I.; Utrera, R. y Lerner, B. J. (2011). Comparación entre Testsimplets® y Diff-Quik para la evaluación de la morfología espermática. Rev Obstet Ginecol Venez, 71(1), 28-33.

Oliveira ECS, Moura MR, Silva Jr VA, Peixoto CA, Saraiva KL, de Sá MJ, *et al.* (2007) Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. *Theriogenology*, 68, 137–45.

Oliveira ECS, Muller PM, Silva FL, Nery LT, de Sá MJ, Guerra MM (2012). Oral administration of an anti-inflammatory does not compromise the efficacy of intra-testicular injection of zinc gluconate as a contraceptive for dogs. *Anim Reprod Sci*, 132, 207–12.

Oliveira, E. C.; Moura, M. R.; de Sá, M. J.; Silva, V. A.; Kastelic, J. P.; Douglas, R. H.; Marques, A. P. (2012). Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*, 77(6), 1056-1063.

Oliveira EC, Fagundes AK, Melo CC, Nery LT, Rêvoredo RG, Andrade TF (2013). Intratesticular injection of a zinc based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. *Vet J*, 197, 307–10.

Orihuela T. A. (2014). Ram's sexual behavior. Review. *Rev Mex Cienc Pec*. 5 (1), 49-89.

Ouvry, P. y Hamel-Desnos, C. (2004). Évaluation de l'efficacité du lauromacrogol sous forme de mousse versus forme liquide dans la sclérothérapie de la veine grande saphène. *Journal des Maladies Vasculaires*, 28.

Ouvry, P.; Allaert; Desnos, P. y Hame-Desnos, C. (2008). Efficacy of polidocanol foam versus liquid in sclerotherapy of the great saphenous vein: a multicentre randomised controlled trial with a 2-year follow-up. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 36(3), 366-70.

Rekwot, P. I.; Ogwu, D.; Oyedipe, E. O. y Sekoni, V. O. (2001). The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 65(3-4), 157-170.

Reyes M. (1997). Métodos anticonceptivos en caninos. *TecnoVet*. 3 (1). (en línea). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Consultado el 1 de Marzo de 2016. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507.html>.

Rorie, R.W.; Bilby T.R. y Lester T.D. (2002). Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology*, 57 (3), 137-148.

Russel LD, Ettlín RA, Sinhahikin AP, Clegg ED (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, FL, Cache River Press, 286.

Ruiz, S.B., H.J.G. Herrera, H.H. Ruiz, N.P. Mendoza, M. R. I. Rojas, G.A. Hernandez (2007). Evaluación reproductiva de sementales *Bos indicus* en un sistema de monta en la región central del estado, Chiapas. XLIII reunión nacional de investigación pecuaria. Sinaloa. Memoria.

Sarabia, V.L. (2010). Espermiograma. Según los criterios de la OMS 2010. Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo. Chile.

Soto, WG Viana, Mucciolo, Hosomi, Vannucchi, Mazzei, Eyherabide, C. de Fátima Lucío, Dias, SS de Azevedo. (2009). Evaluation of Efficacy and Safety of Zinc Gluconate Associated with Dimethyl Sulphoxide for Sexually Mature Canine Males Chemical Neutering. Journal compilation 44, 927-931.

Stmpf, T.T.; Wolfe, M.W.; Day, M.L.; Kittok, R.J. y Kinder, J.E. (1992). Weight changes prepartum and presence of bulls postpartum interact to affect of postpartum anestrus in cows. J. Anim. Sci. 70, 3133-3137.

Wenkoff, M. S. (1975). Problems associated with teaser bulls prepared by the pen-o-block method. 16(7), 181-186.

Wiebe V.J, Howard J.P. (2009). Pharmacologic advances in canine and feline reproduction. Theriogenology; 24:71

Wolfe, D.; Whitlock, H.R. y Whitlock, K.B. (Eds) (2009). Preparation of Teaser Bulls, Rams, and Bucks. Estados Unidos de América. Food Animal Practice.

Wollmann JC, (2004). The history of sclerosing foams. Dermatol Surg.30:694-703.

Zalesky, D.D., Day, M.L., García-Winder, M., Imakawa, K., Kittok, R.J., D'Ochio, M.J. y Kinder, J.E. (1984). Influence of exposure to bulls on resumption of estrous cycles following parturition in beef cows. J. Anim. Sci. 59, 1135-1139.

Zicarelli, L.; Esposito, L.; Campanile, G.; Di Palo, R. y Armstrong, D. T. (1997). Effects of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of Italian buffalo cows. *Animal Reproduction Science*, 47 (3), 171-180.

Zimmet SE. (2003) .Sclerotherapy treatment of telangiectasias and varicose veins. *Tech Vasc Interv Radiol. Sep;6(3):116-20*