



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA**  
**PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO ORAL CON LETROZOL, INHIBIDOR DE**  
**AROMATASA, SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE PALOMAS MENSAJERAS**  
**(*Columba livia*)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**MVZ JOSÉ ANTONIO SOLANO GARCÍA**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DRA. LUCÍA ELIANA RANGEL PORTA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DR. JULIAN SANTIAGO MORENO**  
**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Noviembre 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **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 al Dr. Nestor Ledesma por la realización de las laminillas de los cortes histológicos que fueron la base de este estudio. Además por todos sus consejos y enseñanzas.

Agradezco al Dr. David Roberto Chavira Ramírez por facilitar las determinaciones hormonales que ayudaron a la realización de este trabajo.

Agradezco a CONACYT por la beca que me proporcionó, logrando que pudiera realizar mis estudios y mi superación profesional

Por último, agradezco a todos los seres con plumas que he tenido la fortuna de encontrar en mi práctica

## CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
<b>Revisión de literatura</b> .....	4
Reproducción de palomas.....	4
Reproducción del macho.....	5
Espermatogénesis.....	6
Esteroidogénesis.....	8
Métodos contraceptivos.....	8
<b>Hipótesis</b> .....	13
<b>Objetivos</b> .....	13
<b>Material y métodos</b> .....	13
Administración del tratamiento.....	15
Toma de muestras.....	15
Evaluación seminal.....	16
Evaluación histológica.....	17
Evaluación hormonal.....	22
Análisis estadístico.....	22
<b>Resultados</b> .....	22
Evaluación de la fertilidad.....	22
Evaluación macroscópica.....	23
Evaluación seminal.....	23
Evaluación microscópica del tejido testicular.....	26
Evaluación hormonal.....	39
Evaluación de hígado y riñón.....	40
<b>Discusión</b> .....	42
<b>Conclusiones</b> .....	48
<b>Anexos</b> .....	49
<b>Referencias</b> .....	50

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro 1.</b> Medidas de los túbulos seminíferos .....	<b>27</b>
<b>Cuadro 2.</b> Porcentaje de presentación de las distintas fases del ciclo del epitelio seminífero.....	<b>35</b>
<b>Cuadro 3.</b> Cambios histológicos observados en hígado y riñón.....	<b>41</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo del epitelio seminífero de la codorniz.....	<b>19</b>
<b>Figura 2.</b> Ciclo del epitelio seminífero de la gallina de Guinea.....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Motilidad progresiva.....	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Motilidad en masa.....	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Viabilidad espermática .....	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> Presencia de anomalías.....	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b> Ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b> Fase I del ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>29</b>
<b>Figura 9.</b> Fase II del ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>30</b>
<b>Figura 10.</b> Fase III del ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Fase IV del ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>31</b>
<b>Figura 12.</b> Fase V del ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>32</b>
<b>Figura 13.</b> Fase VI del ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>33</b>
<b>Figura 14.</b> Fase VII del ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>33</b>
<b>Figura 15.</b> Fase VIII del ciclo del epitelio seminífero de la paloma.....	<b>34</b>
<b>Figura 16.</b> Actividad espermatogénica.....	<b>36</b>
<b>Figura 17.</b> Tejido testicular de la paloma.....	<b>37</b>
<b>Figura 18.</b> Vacuolización del epitelio germinal.....	<b>38</b>
<b>Figura 19.</b> Presencia de descamación.....	<b>39</b>
<b>Figura 20.</b> Concentraciones plasmáticas de testosterona y estradiol.....	<b>40</b>

## RESUMEN

**José Antonio Solano García.** Efecto del tratamiento oral con letrozol, inhibidor de aromatasa, sobre la reproducción de palomas mensajeras (*Columba livia*) (bajo la dirección de la Dra. Lucía Eliana Rangel Porta).

La paloma común (*Columba livia*) es una especie considerada plaga por su alto índice reproductivo y por desplazar especies nativas, transmitir enfermedades a humanos y animales, dañar edificios, entre otros. Se han realizado diversos estudios para controlar la reproducción de esta y de otras especies de aves, sin embargo, los métodos de control que existen presentan inconvenientes como la dificultad en su administración, la pobre eficacia o el que generan problemas de salud en los individuos tratados. En mamíferos se ha descrito que el estradiol tiene un papel importante para el mantenimiento de las células de Sertoli, para la regulación de la proliferación, la apoptosis y la diferenciación de las células germinales; además de que ayuda en la absorción del líquido del túbulo seminífero en el epidídimo. Sin embargo, se conoce muy poco respecto a las acciones del estradiol en los machos de las especies aviares. El letrozol evita que la testosterona se convierta en estradiol, disminuyendo las concentraciones sanguíneas de esta hormona. En este estudio se probaron los efectos de un inhibidor de aromatasa llamado letrozol, sobre la reproducción de machos de paloma. Se utilizaron 32 machos de palomas mensajeras, los cuales se dividieron en grupos de 4 individuos: Se formaron dos grupos control (C45 y C75); cinco grupos tratados con 0.5 mg (T2-15, T2-30, T2-45, T2-60 y T2-75), en los que se valoró la función del letrozol con administraciones prolongadas; y un grupo tratado con 1 mg de letrozol (T1-30). Los animales se sacrificaron al término de los periodos de medicación, y se obtuvieron los testículos para hacer una evaluación macroscópica (longitud, ancho y peso) y microscópica (conformación histológica), así como los conductos deferentes, para recolectar el semen por medio de flushing, con la finalidad de realizar una evaluación seminal (motilidad, anormalidades, viabilidad y concentración). Adicionalmente, se evaluó la fertilidad en las nidadas que ponían con su pareja. Se observó que el tratamiento con 1 mg de letrozol, por tan solo 30 días, causó pérdida de la fertilidad, un aumento en la presentación de anormalidades espermáticas y disminución de la motilidad, además de que el medicamento provocó la pérdida de la estructura del tejido testicular. Los animales tratados con 0.5 mg de letrozol no mostraron diferencias con respecto a los de los grupos controles. Este estudio demostró que el letrozol afecta la reproducción del macho de paloma (*C. livia*), disminuyendo su fertilidad y la calidad espermática, cuando es administrado por vía oral, a una dosis de 1 mg/individuo cada 24 h durante un mes.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las poblaciones naturales de animales y vegetales se afecta por la coexistencia e interacción con el ser humano. Los factores reales y potenciales que acompañan al avance de los asentamientos y áreas urbanas pueden tener un impacto negativo sobre el número de individuos de una especie determinada, pero pueden asimismo favorecer las condiciones necesarias para su reproducción. Cuando el número de individuos se incrementa, causando afectaciones económicas, ambientales o de la salud -humana vegetal o animal-, se cataloga a la especie implicada como plaga. Las especies de aves consideradas como plagas tienen particular importancia, debido a que pueden afectar cultivos, transmitir enfermedades, y causar daños a los inmuebles en los que anidan, entre otros (Del Villar-González, 2000). Su control es además difícil, debido a que no cuentan con límites físicos evidentes (Elphick *et al.*, 2007).

La paloma común (*Columba livia*) es considerada como una plaga urbana, ya que puede transmitir al hombre enfermedades como tuberculosis, salmonelosis, clamidiosis y campilobacteriosis, entre otras (Acha, 2003<sub>1</sub>; Acha, 2003<sub>2</sub>; Yuri *et al.*, 2011). Además, facilita la diseminación de enfermedades aviares como Newcastle, infecciones por herpes virus, encefalitis de San Luis, etc. (Tudor, 1991; Aldous *et al.*, 2004, Marlier y Vindevogel, 2006, Torres *et al.*, 2008). Son animales de hábitos diurnos que pueden llegar a vivir más de diez años, y cuyas adaptaciones evolutivas han favorecido su reproducción en áreas donde existen asentamientos humanos (Sharp, 1996; Del Hoyo *et al.*, 1997).

Los esfuerzos para controlar la sobrepoblación de palomas alrededor del mundo incluyen métodos físicos, biológicos y químicos. Sin embargo, su eficiencia ha sido limitada, principalmente porque los medios físicos son costosos y no atacan directamente al aumento en el número de individuos, los biológicos dificultan las acciones de regulación al introducir una especie depredadora, mientras que los químicos pueden causar problemas secundarios en la salud de los animales y generalmente implican un manejo individual para su administración.

El letrozol, sustancia que pertenece al grupo de los inhibidores de la aromatasas, es capaz de bloquear la reproducción de las hembras de paloma (Solano, 2015), debido a que inhibe la producción de estradiol. Esto tiene un impacto negativo sobre el desarrollo de los folículos ováricos y provoca la involución del oviducto. Más aun, se ha observado que las palomas consumen al letrozol voluntariamente, cuando se mezcla con el alimento que se ofrece de manera colectiva (Solano, 2015), postulando a este medicamento como una alternativa para el control reproductivo de la especie. Sin embargo, los efectos secundarios potenciales de su uso para la salud de las aves no han sido estudiados.

Por otro lado, el estradiol es también muy importante en la reproducción de los machos. En los mamíferos participa en la espermatogénesis (Hess *et al.*, 1997), al favorecer la función de las células de Sertoli, así como en el mantenimiento y diferenciación de las células germinales. Igualmente, el estradiol promueve la espermiación, el transporte espermático y la reabsorción de líquido a nivel del epidídimo. Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del letrozol en la reproducción de los machos de paloma común, y determinar si su administración oral tiene algún impacto sobre la salud de los individuos tratados. Teniendo como hipótesis que el tratamiento con letrozol disminuye la calidad espermática y la fertilidad de los machos de la paloma común.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Reproducción de palomas

La paloma común es una especie sedentaria, que al no tener la necesidad de desplazarse para conseguir mejores lugares para anidar o buscar comida puede reproducirse durante todo el año (Dijkstra *et al.*, 2010). Además, la duración del día no es un estímulo limitante para la reproducción, como lo es en el caso de otras aves, esto quiere decir que no tienen un periodo refractario evidente, haciendo de la disponibilidad de alimento el principal factor restrictivo (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 (Pollock y Orosz, 2002; Johnson, 2015). Si los huevos se retiran prematuramente, el intervalo entre el retiro de los huevos y la postura de una nueva nidada es de diez días en promedio (Askew *et al.*, 1997). La incubación de los mismos dura de 16 a 19 días y ambos padres participan en el cuidado de los huevos y de los pichones (Vatnick y Foertsch, 1998). Después de dos semanas de que los pichones eclosionen, la hembra es capaz de poner una segunda nidada fértil, de forma que la pareja puede encargarse de los polluelos y los huevos al mismo tiempo (Del Hoyo *et al.*, 1997).

Cuando ingresan machos nuevos a la parvada, las hembras inician un desarrollo folicular y posteriormente la ovulación, la cual normalmente ocurre diez días después (Johnson, 2015).

Los pichones al nacer son ciegos y cuentan con un fino plumón. Tienen un crecimiento exponencial debido a que los primeros cinco días de vida son alimentados únicamente con una sustancia rica en nutrientes producida en el buche de los padres conocida como “leche de buche”, posteriormente, comienzan con 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 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).

### Reproducción del macho

Desde el punto de vista anatómico, los testículos en las aves son intracavitarios ya que, a diferencia de los mamíferos, el tejido testicular embrionario no migra de su lugar de origen. Están localizados ventralmente a los riñones bordeando la aorta y la vena cava caudal lateralmente (Aire, 2007<sub>1</sub>). El epidídimo es un órgano rudimentario, es un conducto de paso sin una función aparente (Aire, 2007<sub>1</sub>). El almacenamiento de espermatozoides se lleva a cabo en el conducto deferente, el cual, es tortuoso y desemboca a la cloaca en un punto donde se forma la papila del conducto deferente (Aire, 2007<sub>1</sub>). Los machos de palomas no cuentan con un órgano copulador, a diferencia de aves como las galliformes (Aire, 2007<sub>1</sub>).

El comportamiento reproductivo está regulado por las neuronas del sistema nervioso central, en las áreas preóptica y ventromedial del hipotálamo, así como en el núcleo taeniae de la amígdala medial, en cuya formación está involucrado el estradiol, que promueve la proliferación, migración y dimorfismo celular (Kelley, 1988).

Los machos de palomas necesitan realizar un cortejo para poder conseguir una pareja reproductiva. Los principales comportamientos expresados al momento de realizar el cortejo pueden ser divididos en dos: las conductas de territorialidad o apetitivas y las conductas consumatorias; en las primeras se encuentran comportamientos como el asedio, la reverencia y el baile, los cuales, se ha propuesto que están reguladas por testosterona, mientras que en las segundas (conductas consumatorias) están los comportamientos de besuqueo, ofrecimiento del nido y la cópula, donde estradiol es la hormona responsable (Adkins y Mason, 1974; Fusani *et al.*, 2001; Gómez de Silva *et al.*, 2005; Cornil *et al.*, 2014). Sin embargo, estudios recientes en palomas proponen que algunas de las conductas

apetitivas estén inducidas por la interacción de ambas hormonas (Schlinger *et al.*, 2013; López, 2019).

### Espermatogénesis

La formación de espermatozoides se lleva a cabo en el parénquima testicular, específicamente en el epitelio de los túbulos seminíferos. La duración de este proceso varía dependiendo de la especie, en el gallo tarda entre 13 a 14 días, mientras que en la codorniz es de 10 días (Aire, 2007<sub>2</sub>).

La espermatogénesis se inicia con el aumento de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-I), la cual estimula a la hipófisis para la producción y liberación de las gonadotropinas (Wilson y Sharp, 1975; Chou y Johnson, 1987; Sharp y Gow, 1983).

La LH estimula a las células de Leydig en el testículo para la formación de testosterona (T), que junto con la hormona folículo estimulante (FSH) inducen el crecimiento, la diferenciación y la actividad espermatogénica (Galli *et al.*, 1973; Maung y Follett, 1977; Sharp *et al.*, 1977; Rangel, 2018). Por su parte, el estradiol (E<sub>2</sub>) ayuda en la absorción del líquido del túbulo seminífero que acompaña a los espermatozoides en la espermiación; en el caso de los mamíferos esto ocurre en los conductos eferentes y en la cabeza del epidídimo, en los que se ha descrito la presencia de receptores  $\alpha$  a estradiol (Hess *et al.*, 1997). De igual manera, en aves se han encontrado estos receptores en los conductos eferentes y en la primera porción del epidídimo (Kwon *et al.*, 1995; 1997), sugiriéndose que el E<sub>2</sub> tiene la misma función que en mamíferos. Por otro lado, en mamíferos se ha descubierto que E<sub>2</sub> regula la proliferación, apoptosis y diferenciación de las células germinales, y que participa en la espermiación, el transporte y la motilidad de los espermatozoides (Robertson *et al.*, 1999; Meccariello *et al.*, 2014), lo que no se ha descrito en el caso de las aves.

Las células de Sertoli son grandes, columnares y se extienden desde la lámina basal hasta el borde del epitelio seminífero envolviendo en su totalidad a las células

germinales. El núcleo se encuentra a nivel de las espermatogonias, y es relativamente grande, eucromático y de forma oval, piriforme o triangular (Aire, 2007<sub>1</sub>). Entre otras funciones, dichas células son indispensables para que se lleve a cabo la espermatogénesis, ya que aportan a las células germinales los nutrientes y los factores necesarios para su mantenimiento y replicación. Adicionalmente, brindan protección al formar parte de la barrera hemato-testicular (Aire, 2007<sub>1</sub>).

Las células germinales más inmaduras, que se encuentran cerca de la lámina basal e inician el proceso de espermatogénesis son las espermatogonias, las cuales comienzan a dividirse por mitosis para producir espermatocitos, así como para preservar la reserva existente de espermatogonias (Aire, 2007<sub>2</sub>). Se han identificado de dos a cuatro tipos de espermatogonias dependiendo la especie de ave estudiada (Lake, 1956; Yamamoto *et al.*, 1967; Aire *et al.*, 1980; Lin y Jones, 1992).

Después de la última división mitótica se forman los espermatocitos primarios - proceso que en mamíferos ocurre por una diferenciación celular (Zarco, 2018). Estos espermatocitos inician las divisiones meioticas, la primera de las cuales se caracteriza en la codorniz por las fases de preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno, diaquinesis, metafase y anafase (Lin y Jones, 1990). Al finalizar la primera meiosis se produce un espermatocito secundario, el cual da origen a dos células haploides llamadas espermátidas, una vez que ha culminado la segunda división meiotica. Los espermatocitos secundarios no siempre se pueden apreciar en los cortes histológicos debido a que la división celular ocurre muy rápido (Aire, 2007<sub>2</sub>).

Las espermátidas necesitan presentar un último cambio –espermiogénesis- para pasar de ser células redondas a células elongadas y especializadas. Esta etapa de diferenciación celular consta de 4 fases: la de Golgi, la del capuchón, la del acrosoma y la de maduración; durante las cuales la célula pierde algunos organelos y otros se modifican. Una vez que las espermátidas se han convertido en espermatozoides ocurre la espermiación, que consiste en la separación del espermatozoide del epitelio seminífero (Aire, 2007<sub>2</sub>).

El número de espermatozoides que se forman a partir de una espermatogonia inicial varía entre especies, dependiendo del número de divisiones celulares que presente; tanto en gallos como en codornices se forman 32 espermátidas (Vizcarra *et al.*, 2015).

### 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 prednenolona por medio de la citocromo P-450 scc. Posteriormente, es transformada en progesterona debido a la acción de  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la  $17\alpha$ -hidroxilasa convierte a la progesterona en  $17\alpha$ -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 (Gómez *et al.*, 1998; Mathews, 2002).

Como ya se describió con anterioridad, las hormonas esteroides participan en la espermatogénesis, 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).

### Métodos contraceptivos

Existen diferentes métodos para el control de poblaciones tanto para mamíferos como para aves (Elphick *et al.*, 2007). Dichos métodos pueden ser informativos, biológicos, físicos o químicos. La mayoría de los métodos contraceptivos químicos se han desarrollado con el objetivo de tratar patologías conductuales o reproductivas de manera individual (Schoemaker, 2018), lo que dificulta aplicarlas para el manejo de poblaciones grandes o silvestres.

En las aves, la mayoría de los métodos contraceptivos que se han desarrollado están enfocados en inhibir el desarrollo folicular y/o la ovulación en la hembra, pero

muy pocos están orientados en inhibir la espermatogénesis o en su defecto a alterar el proceso reproductivo de ambos individuos. Además, la tendencia actual está enfocada a que estos métodos no dañen el medio ambiente, no afecten la salud de los individuos tratados, sean reversibles, y faciliten su administración y acceso.

Entre los métodos que se han utilizado se encuentran los siguientes.

**Deslorelin.** Es un agonista de la GnRH, el cual es 100 veces más potente que la hormona natural (Padula, 2005). Este medicamento se encuentra de forma comercial, en Europa, en implantes con 4.7 o 9.4 mg, y es recomendado para la castración de perros y hurones (Goericke-Pesch, 2017). Su acción se presenta en dos fases: la primer respuesta es de tipo aguda, en la cual, el agonista se une al receptor de GnRH e induce un incremento en la secreción de LH, dando como resultado un aumento en las concentraciones de testosterona durante las primeras horas o días después de la administración; la segunda es una respuesta de tipo crónico, en la que el agonista estimula de manera continua el receptor de GnRH, desensibilizando y disminuyendo las concentraciones de LH y testosterona, lo que provoca una reducción en el tamaño de los testículos y la ausencia de la espermatogénesis (Fraser y Lincoln, 1980; Lincoln *et al.*, 1986; Schoemaker *et al.*, 2018). Su uso en cabras, guepardos y zorros voladores suprime la espermatogénesis (Bertschinger *et al.*, 2006; Metrione *et al.*, 2008; Kauffold *et al.*, 2010; Melville *et al.*, 2012). Sin embargo, se han observado distintos efectos en otras especies tratadas; por ejemplo, en toros induce un aumento sostenido en las concentraciones de LH y testosterona (D'Occhio *et al.*, 2000); mientras que en calitricidos, cuyos y walabies, con la dosis de 4.7 mg, no se observan cambios, ni a nivel hormonal, ni en la espermatogénesis, (Lunn *et al.*, 1992; Herbert *et al.*, 2004; Forman *et al.*, 2016).

En el caso de la administración en conejos los resultados son muy diversos, teniendo algunos resultados positivos y otros que no logran inhibir (Arlt *et al.*, 2010; Goericke-Pesch *et al.*, 2015). Sin embargo, en más de la mitad de hembras tratadas,

se vio la presentación de hiperplasia endometrial o endometritis después de los dos años de edad (Geyer *et al.*, 2016).

El uso del deslorelin en aves mostró que una sola aplicación en gallinas suprime la postura por medio año en promedio (Noonan *et al.*, 2012), mientras que en codornices, la postura se ve bloqueada por 2 o hasta 4 meses, con una eficacia del 60 al 90% (Petritz *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2013). El implante de 4.7 mg administrado en machos de palomas logró disminuir las concentraciones plasmáticas de LH solamente durante dos meses (Cowan *et al.*, 2014), y lo mismo ocurrió con las hembras, en las que la postura de huevos se suprimió hasta por siete semanas (Cowan *et al.*, 2014). Un inconveniente importante para esta medicación es que su uso implica la manipulación individual de los animales, misma que debería repetirse al cesar el efecto.

**Acetato de leuprolide.** Es un agonista de GnRH que en la mayoría de las especies de aves tiene que ser administrado en dosis muy elevadas (mayores a 3500 µg/kg IM) y su actividad se mantiene máximo por 3 semanas (Hawkins *et al.*, 2012), pero en el caso de las palomas (*C. livia*) no tiene efecto sobre las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroides o sobre la postura (De Wit *et al.*, 2004).

**Proligestone.** Es un progestágeno que al ser administrado en hurones por vía subcutánea (SC) a una dosis de 50 mg por animal, inhibe la presentación del estro en 92% de los casos, mientras que el resto de los animales se inhibió al recibir una segunda inyección (Oxenham, 1990). Sin embargo, al administrar más de una dosis los animales presentan pseudogestación.

**Vacuna anti GnRH.** Estas vacunas se han empleado en diferentes especies. En el caso de las ratas la vacuna es efectiva tanto para machos, como para hembras (Jinshu *et al.*, 2005). En hurones las vacunas han demostrado alta eficacia, ya que los anticuerpos vacunales se mantienen por un periodo de hasta 3 años (Lennox, 2015). La administración en conejos de 2 meses de edad mostró concentraciones plasmáticas de testosterona disminuidas y una ausencia total de espermatozoides

en los túbulos seminíferos (Aponte *et al.*, 2017). Sin embargo, algunos animales vacunados han muerto debido a miofascitis (Schoemaker *et al.*, 2005; Garner *et al.*, 2007), por lo que se requieren estudios para determinar la causa de dichas afectaciones.

**Levonorgestrel.** Es un progestágeno que al ser inyectado en una sola dosis de 40 mg/Kg en codornices inhibió la postura durante 67 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.*, (1999), lograron inhibir la postura en cinco de siete codornices durante  $5.8 \pm 2.3$  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 40 mg/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% en el alimento, disminuyó en 49.1 % la población de palomas en Ljubljana, Slovenia, en un periodo de cinco años (1999 – 2004) (Dobeic *et al.*, 2011).

**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). Su inconveniente es que 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 50 µg (Leboucher *et al.*, 1998).

**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 2 mg/Kg IM, aplicado cada 24 hrs (Wilson y Cunningham, 1981). Sin embargo, Lupu (2000), encontró que dicha dosis de tamoxifen indujo leucopenia en la mayoría de los periquitos australianos tratados.

**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).

Aparentemente la administración oral de letrozol no causa problemas de palatabilidad como otros medicamentos (Yoder *et al.*, 2004; Solano, 2015), lo cual facilita su administración y reduce el estrés causado por el manejo de los animales, ventaja que lo postula como un método para el control reproductivo de las aves.

En palomas una administración diaria de 0.5 mg de letrozol en 30 g de alimento por animal durante un mes, inhibe el desarrollo folicular y evita la postura en promedio hasta por 45 días después de terminado el tratamiento (Solano, 2015).

La justificación para el presente trabajo se basa en que el estradiol tiene acciones importantes en la espermatogénesis y la calidad espermática de algunos machos, pero no existe información al respecto en aves; así como en el hecho de que el letrozol es un tratamiento de fácil administración, eficaz para evitar la reproducción de hembras de palomas. Teniendo en cuenta lo anterior, se propuso evaluar los efectos del letrozol en la reproducción de los machos de palomas, y valorar la

inocuidad de la medicación sobre la salud general cuando se administra por periodos prolongados, a través de histopatología de hígado y riñón.

## **HIPÓTESIS**

La administración oral de letrozol disminuye la calidad espermática y la fertilidad de los machos de la paloma común (*C. livia*).

## **OBJETIVOS**

Evaluar los efectos del letrozol en la reproducción de los machos de paloma común.

Determinar si la administración oral de letrozol tiene un impacto sobre la salud de los individuos tratados

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio fue realizado en el palomar del Departamento de Reproducción, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se utilizaron 32 machos adultos de palomas mensajeras (*C. livia*) con sus respectivas hembras. Durante el estudio cada pareja fue mantenida en cubículos de madera de 30 cm \* 40 cm \* 30 cm. Los alojamientos se limpiaron diariamente, momento en el que se permitió a los individuos salir para entretenimiento; de manera adicional, una vez por semana todos los animales eran liberados para socializar y bañarse. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*, utilizando 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.

Los alojamientos contaban con un nido de plástico, sustrato de periódico y fibra de coco, para facilitar la reproducción y posteriormente la postura. Antes de iniciar el tratamiento, se permitió que las parejas pusieran una nidada (de 1 a 2 huevos), la

cual, incubaron durante 5 días para comprobar su fertilidad. Se observó la presencia del embrión a través de un ovoscopio y se retiraron los huevos de todas las parejas el mismo día, para sincronizar un nuevo ciclo ovulatorio en las hembras. Durante el tratamiento se continuó evaluando el efecto del medicamento sobre la fertilidad de la nidada, trabajando de la misma manera, con excepción de que los huevos se retiraban al momento de la revisión de la fertilidad, sin importar si las demás parejas contaban con una nidada.

Las aves fueron divididas aleatoriamente en 8 grupos con 4 parejas cada uno. Se formaron dos grupos control, de los cuales uno fue sacrificado a mitad del experimento, correspondiente al día 45 de iniciado el tratamiento (Grupo C45). Al otro grupo control se le permitió seguir poniendo nidadas hasta el final del estudio (Grupo C75), para poder descartar que el manejo del retiro de los huevos y el encierro de los especímenes durante el experimento afectara la fertilidad de los mismos, las palomas de este último grupo no fueron sacrificados. Para evaluar el efecto de la medicación en la salud general, en diferentes periodos y de forma paralela al efecto en la reproducción, se eligió la dosis que previamente mostró efectividad en palomas hembras para reducir la postura (Solano, 2015), por lo que cinco grupos fueron tratados con 0.5 mg de letrozol, los cuales fueron sacrificados con intervalos de quince días (Grupos T2-15, T2-30, T2-45, T2-60 y T2-75). El último grupo fue tratado con 1 mg de letrozol (Grupo T1-30), concentración que duplicaba la dosis efectiva de hembras (Solano, 2015), este grupo se incluyó por si la dosis de 0.5 mg no resultase adecuada para los machos; los animales de este grupo se sacrificaron en el momento que se vio una reducción en la fertilidad de su nidada.

Todos los machos, excepto los del grupo C75, fueron sacrificados durante la administración del medicamento, en los días 15, 30, 45, 60 y 75 días de iniciado el tratamiento, de acuerdo al grupo al que pertenecieran. Al momento del sacrificio se obtuvieron los testículos y el conducto deferente (para valorar la capacidad reproductiva), así como hígado y riñón (para evaluar la salud general).

### Administración del tratamiento

La medicación en los animales se llevó a cabo cada 24 horas por vía oral hasta el día 30, a partir del cual se espació a cada 48 horas, hasta el término del estudio. El intervalo de medicación se estableció por los resultados del trabajo previo realizado en hembras (Solano, 2015). Los animales de los grupos control recibieron un placebo, del mismo modo que los grupos tratados, con el fin de descartar cualquier influencia del manejo sobre la fertilidad.

Para administrar el tratamiento se utilizaron cápsulas preparadas con las dosis respectivas para cada grupo, para ello se utilizaron tabletas de 2.5 mg de letrozol (Femara®, Novartis) que se pulverizaron y se pesaron en una balanza analítica para obtener las dosis de 0.5 o de 1 mg. A los grupos control se les administraron las cápsulas vacías.

Durante el estudio únicamente se medicó a los machos. Para lo cual el palomo se sujetó del dorso con una mano, colocando los dedos índice y pulgar en posición para detener la mandíbula y apoyando el resto del cuerpo del ave contra el abdomen del manejador; mientras con la otra mano se abrió el pico del ave para introducir la cápsula.

### Toma de muestras

Para la toma de muestras los machos fueron tranquilizados con Tiletamina/Zolazepam (Zoletil ® 50, Virbac) utilizando una dosis de 5 mg/kg IM (Hawkins *et al.*, 2012). Antes del sacrificio se obtuvo una muestra sanguínea por punción cardíaca, misma que se colocó en un tubo de 5ml con heparina de sodio para realizar las determinaciones hormonales.

El método utilizado para el sacrificio fue la dislocación cervical, como lo indica la NOM-033-SAG/ZOO-2014 (Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres). Después de la dislocación, se extrajeron el hígado, los riñones y los testículos; estos órganos fueron fijados en formol al 10%. En el caso de los testículos, se enjuagaron con solución PBS, se secaron con una gasa estéril y se

realizaron mediciones (largo, ancho y peso) para evaluar posibles alteraciones macroscópicas. También se extrajeron los conductos deferentes, para colectar el semen presente en cada uno; para ello, se utilizó la técnica de Flushing descrita por Villaverde-Morcillo *et al.*, 2016. El semen obtenido se recibió en un tubo eppendorf con 200  $\mu$ l de diluyente L&R-84 a 5° C (Lake y Ravie, 1984).

### Evaluación seminal

Inmediatamente después de obtener el semen se evaluó la motilidad en masa y la motilidad progresiva. Además, se realizó una tinción de eosina-nigrosina para evaluar la viabilidad de los espermatozoides. Por último se hizo una tinción de Diff-Quick para determinar la presencia de anormalidades.

Para la evaluación de la motilidad en masa se tomó en cuenta el criterio descrito por Sontakke *et al.* (2004), en el cual, catalogan la motilidad en 5 grupos: 0) Los espermatozoides no se mueven; 1) Los espermatozoides vibran en su lugar pero no avanzan; 2) Algunos espermatozoides se mueven y avanzan lentamente, mientras que otros se encuentran estáticos; 3) Los espermatozoides avanzan moderada a rápidamente 4) Los espermatozoides se mueven vigorosamente.

La evaluación de la motilidad progresiva fue evaluada en porcentaje, tomando en cuenta el número de espermatozoides que realizaban un movimiento recto, a través del campo observado.

La tinción de Eosina-nigrosina se llevó a cabo mezclando 2  $\mu$ l de semen con 2  $\mu$ l de tinción de Eosina-nigrosina. Se realizó un frotis, que se secó al aire y se observó al microscopio, contando 200 células para sacar un porcentaje de viabilidad celular. Se consideró una célula muerta, aquella en la cual la eosina penetró la membrana plasmática, tiñendo al espermatozoide de color rosa/morado; y una célula viva, la que no permitió la penetración de la tinción, quedando los espermatozoides de un color blanco.

Previamente, se realizaron ensayos para ver la efectividad de la tinción sobre los espermatozoides de paloma (*C. livia*), debido a que se ha documentado que la

tinción no es efectiva en algunas especies aviares, como en el halcón peregrino (*Falco peregrinus*) o el periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) (Hargrove, 1986; Gee *et al.*, 1993).

Para la tinción de Diff-Quick se realizó un frotis con 1µl de semen, el cual se fijó al sumergir la laminilla en una solución de metanol, posteriormente se pasó a la tinción I (Eosina Y), y finalmente a la tinción II (Tiazina), en cada tinción la laminilla se mantuvo durante un minuto. Para la evaluación de la morfología los espermatozoides se agruparon en normales, o con anomalías de cabeza, de cuello o de cola.

Dentro de las anomalías de la cabeza se registraron las cabezas grandes, pequeñas, o curvadas, así como las alteraciones en el acrosoma. En las anomalías de cuello, se consideró como la principal alteración los cuellos chuecos. Mientras que para las anomalías de la cola se tomaron en cuenta las colas enrolladas, cortas o chuecas.

#### Evaluación histológica

Los órganos se mantuvieron en formol al 10%, y fueron embebidos en parafina para realizar cortes de 5 µm de grosor, con los que se prepararon laminillas teñidas con hematoxilina-eosina.

En el hígado y el riñón se evaluó la estructura celular y la presencia de células anormales, que pudieran indicar daño provocado por el medicamento en el tejido.

El tejido testicular se evaluó utilizando los programas Motic Images Plus 2.0® y Motic Images Advanced 3.2®. Se realizaron mediciones microscópicas de 20 túbulos seminíferos por laminilla, distribuidos en todo el tejido aleatoriamente. Las únicas condiciones para ser considerados era que los túbulos no presentaran rupturas en la membrana basal o alguna alteración provocada por la preparación de las laminillas (como doblez del tejido o fragmentación del túbulo durante el corte).

Las variables analizadas fueron:

1- Diámetro mayor y menor: se midieron los diámetros de los 20 túbulos seminíferos elegidos en cada laminilla, y después se calculó la media aritmética del diámetro mayor y del menor.

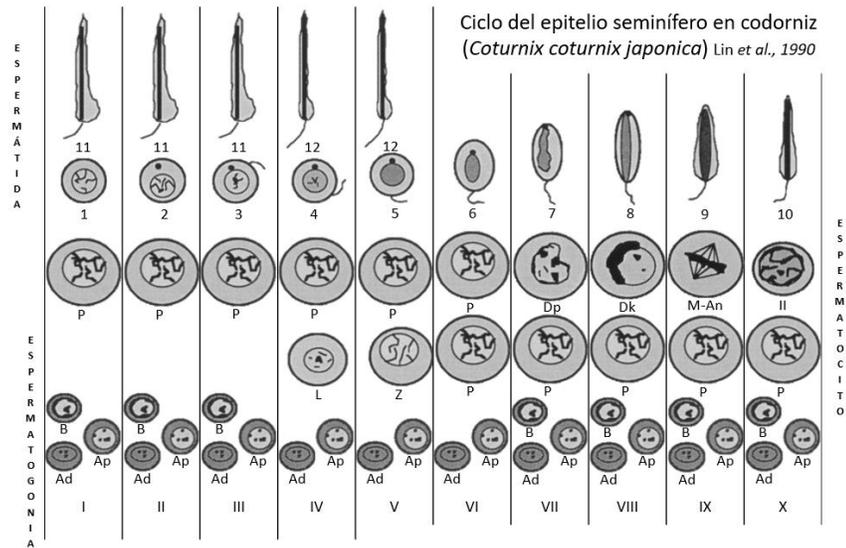
2- Grosor del epitelio seminífero: se consideró como la distancia desde la membrana basal del conducto hasta la luz, se midieron los grosores mayor y menor del conducto. Del mismo modo que en la medición anterior, al final se sacó un promedio de los 20 túbulos analizados por laminilla, para cada grosor.

3- Espacio intersticial: se evaluó la distancia del espacio entre conductos seminíferos; considerando 20 mediciones por laminilla.

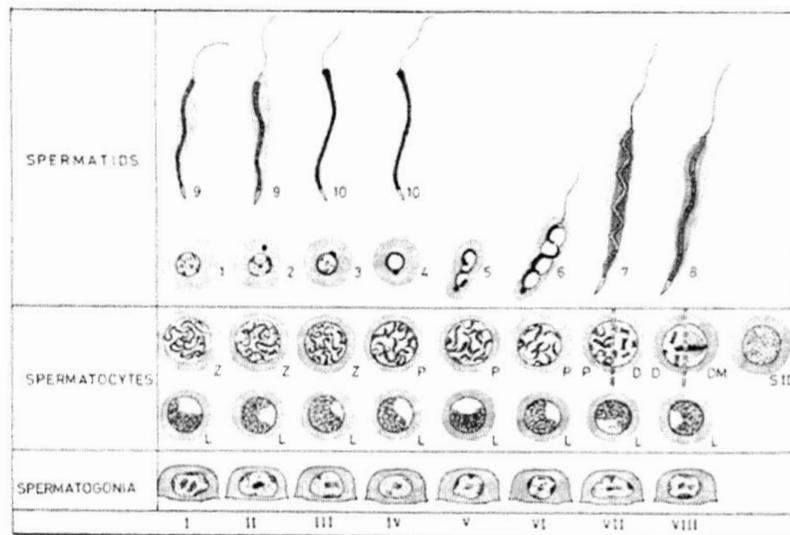
4- Actividad espermatogénica completa: se evaluó en cuántos de los 20 conductos analizados por laminilla existía presencia de espermatogonias, espermátocitos, espermátidas y espermatozoides. Siempre que fue posible se identificaron las fases del ciclo del epitelio seminífero (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII) presentes en cada uno de los túbulos.

- Fases del ciclo del epitelio seminífero

Para evaluar las fases del ciclo del epitelio del túbulo seminífero no se disponía de una caracterización para palomas, por lo que se tomaron como referencia el ciclo del epitelio seminífero de la codorniz (*Coturnix coturnix*), que consta de 10 fases (Lin *et al.*, 1990) (Figura 1), y el de la gallina de Guinea (*Numida meleagridis*), que posee solamente 8 fases (Aire *et al.*, 1980) (Figura 2).



**Figura 1.** Ciclo del epitelio seminífero de la codorniz. En el cual, se aprecian 10 fases del ciclo del epitelio. Espermatogonias: Oscuras tipo A (Ad), claras tipo A (Ap), tipo B (B); espermatocitos primarios: en leptoteno (L), en cigoteno (Z), paquiteno (P), metafase (M), anafase (An); Espermatocito secundario (II); espermatidas 12 etapas (1-12). (Cuadro elaborado por Antonio Solano, con la información de Lin et al., 1990).



**Figura 2.** Ciclo del epitelio seminífero de la gallina de Guinea, propuesto por Aire et al., 1980. En el cual, se aprecian 8 fases del ciclo. Las espermatogonias no están clasificadas en tipo A o B debido a la dificultad para distinguirlas; espermatocitos primarios: en leptoteno (L), en cigoteno (Z), paquiteno (P), diploteno (D), metafase (M), anafase (An); Espermatocito secundario (II); espermatidas 10 etapas (1-10).

Para nuestro estudio, primero se observaron las laminillas, para familiarizarse con las células presentes e identificar las fases, de acuerdo a la repetibilidad de las combinaciones celulares observadas. Con lo cual se

propuso un ciclo de 8 fases. Este ciclo tiene el mismo número de fases que el de las gallinas de guinea (Figura 2; Aire *et al.*, 1980), pero hay una mayor similitud con las combinaciones celulares del ciclo de la codorniz (Figura 1; Lin *et al.*, 1990). Una vez que se tuvo una propuesta de ciclo (Figura 7), para todos los grupos se registró la frecuencia de las diferentes fases en cada uno de los 20 túbulos evaluados por laminilla.

5- Espermatozoides: se realizó un conteo del número de conductos en los que se apreciaron espermatozoides en la luz del túbulo. Se consideró como espermatozoide cuando la célula se separó del epitelio seminífero y fue posible distinguir las tres porciones: cabeza, cuello y cola. Además de considerar como positiva la presencia de espermatozoides en la luz del túbulo seminífero cuando se encontraban más de 10 espermatozoides en la misma.

Para determinar la presencia de los espermatozoides en la luz no fueron consideradas aquellas espermátidas elongadas que no terminaron su desarrollo y que se encontraron en la luz por efectos de descamación del epitelio seminífero.

6- Espermátidas elongadas: se contó en cuántos de los conductos analizados por laminilla se apreciaron dichas células en el epitelio. Se consideró como espermátida elongada aquella célula que presenta un alargamiento de la cabeza y está unida a otras células semejantes por puentes intracitoplasmáticos en el epitelio seminífero.

Se consideró la presencia de espermátidas elongadas en el túbulo seminífero cuando se encontraban más de tres conjuntos de espermátidas elongadas.

El encontrar sólo uno o dos conjuntos de espermátidas no se consideró como presencia de ellas debido a que en siete de las ocho fases del ciclo del epitelio siempre habrá espermátidas elongadas.

No fueron consideradas aquellas espermátidas elongadas que se encontraban en la luz del túbulo seminífero por efecto de la descamación.

7- Espermatidas redondas: se contabilizaron los conductos por laminilla en los que se apreciaron espermatidas redondas en el epitelio. Se consideró como espermatida redonda aquellas células germinales de menor tamaño, las cuales pueden ser totalmente redondas u ovoides y no presentan un flagelo desarrollado. Este tipo de células se encuentran en las cuatro primeras fases de ciclo del epitelio seminífero.

Se consideró la presencia de espermatidas redondas en el túbulo seminífero cuando se encontraban más de 20 espermatidas redondas.

8- Número de células de Sertoli: se registró el número de células de Sertoli que fueron claramente identificadas en cada conducto.

Las células de Sertoli son grandes, columnares y se extienden desde la lámina basal al borde del epitelio seminífero. El núcleo se encuentra a nivel de las espermatogonias, y es relativamente grande, eucromático y de forma oval, piriforme o triangular (Aire, 2007<sub>1</sub>).

Se contó el total de células de Sertoli presentes en cada túbulo y se calculó el promedio de los 20 túbulos analizados.

9-. Vacuolas en el epitelio germinal: Teniendo en cuenta que la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas puede ser ocasionada por un daño celular se contabilizó el número de conductos con vacuolas. Se consideró positiva la presencia de vacuolas cuando más de 20 células (espermatogonias y espermatoцитos) presentaban vacuolas en más del 20% de la célula.

10- Descamación de células germinales: se determinó el número de túbulos seminíferos con presencia de desprendimiento celular en el lumen.

Se consideró la presencia de descamación cuando se encontraban espermatogonias, espermatoцитos, espermatidas redondas, espermatidas elongadas, células de Sertoli o restos de citoplasma en la luz del túbulo separadas del epitelio seminífero.

### Evaluación hormonal

Se midió la concentración de estradiol y testosterona en sangre y en tejido testicular.

Para el primer tipo de evaluación hormonal, se tomaron muestras de sangre periférica utilizando un tubo de 5 ml con heparina de sodio, se centrifugaron a 3500 RPM durante 5 minutos y se separó el plasma en viales identificados. Mientras que para la determinación en testículos se pesaron 0.3 gramos de tejido y se colocaron en un tubo eppendorf estéril. Al tubo con la muestra se le añadieron 0.9 ml de solución PBS, y se homogenizó con un pistilo. El tubo se centrifugó a 3500 RPM durante 5 minutos; y se le extrajo el líquido sobrenadante (Fracción soluble). El pellet resultante se resuspendió en 0.9ml de alcohol etílico y se mezcló utilizando un vortex. Nuevamente se centrifugó a 3500 RPM durante 5 minutos, se extrajo el sobrenadante y se evaporó en un tubo de cristal de 70mm que fue enjuagado con 0.9ml de PBS (Fracción liposoluble). Ambos sobrenadantes recuperados se almacenaron en alícuotas estériles, previamente identificadas.

Todas las muestras fueron congeladas para procesarse posteriormente mediante un análisis de inmunoensayo utilizando el immulite 1000.

### Análisis estadístico

Para la evaluación de los resultados se realizó un análisis de varianza utilizando el programa GenStat®.

## **Resultados**

### Evaluación de la fertilidad

Las parejas tuvieron al menos un huevo fértil alrededor de dos semanas de su acoplamiento. Durante el tratamiento la fertilidad de los grupos controles y grupos tratados con 0.5 mg de letrozol no difirió (80% y 75%, respectivamente), mientras que la fertilidad del grupo tratado con 1 mg de letrozol fue nula.

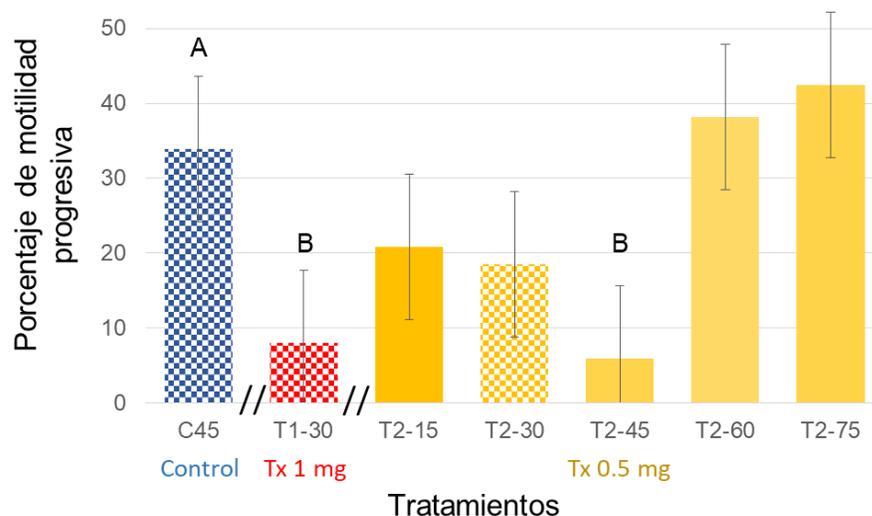
En el grupo tratado con 1 mg se observó una disminución en la fertilidad desde la primera nidada posterior al inicio del tratamiento por lo que los machos fueron sacrificados al día 30 de iniciado el experimento.

### Evaluación macroscópica

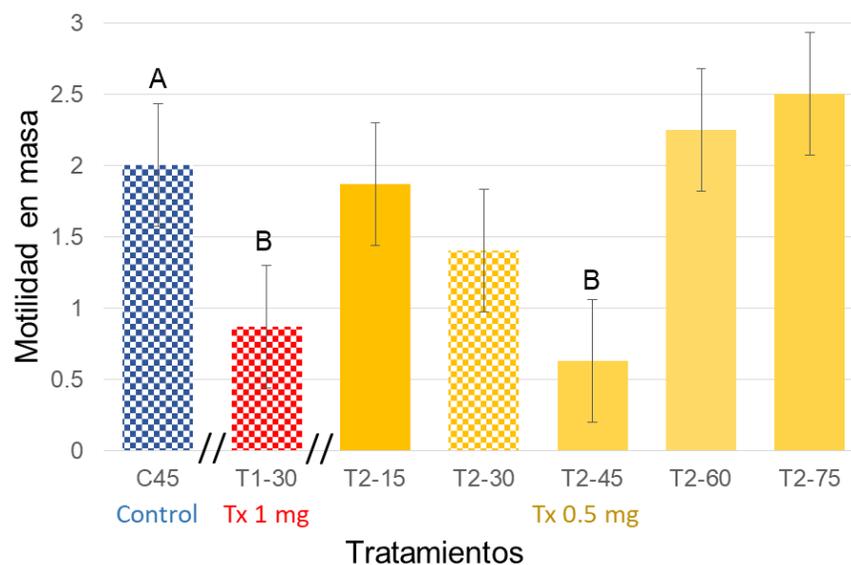
No se encontraron diferencias macroscópicas (peso, ancho y largo) en los testículos de ningún grupo presente en el estudio ( $p > 0.05$ ) (Anexo 1).

### Evaluación seminal

En la evaluación seminal se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a la motilidad progresiva (Figura 3) y la motilidad en masa (Figura 4) entre el grupo control (C45) y los grupos T1-30 y T2-45, los cuales a su vez fueron menores con respecto a los grupos T2-60 y T2-75 para ambas motilidades, y con respecto al grupo T2-15 en la motilidad en masa.

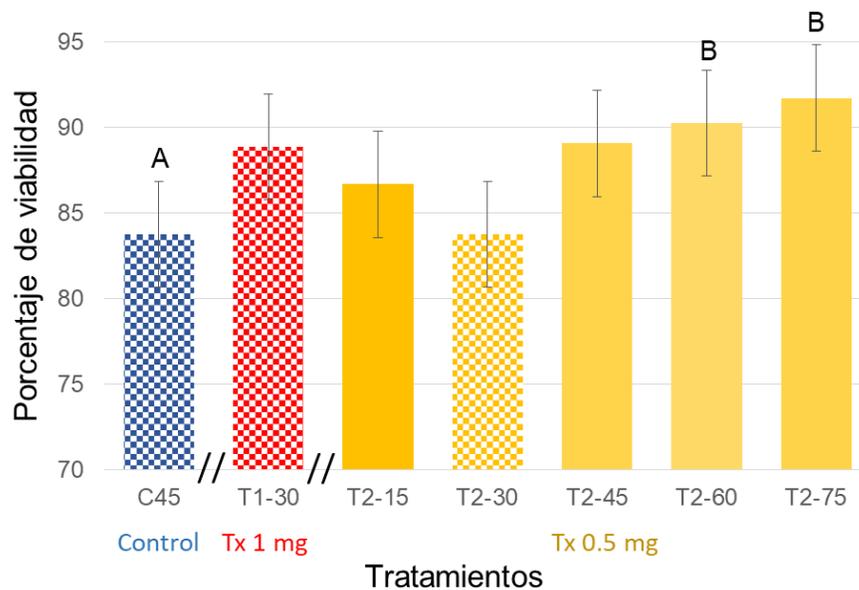


**Figura 3.** Motilidad progresiva de los distintos grupos experimentales. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). Literales diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. El error estándar calculado fue de 9.7



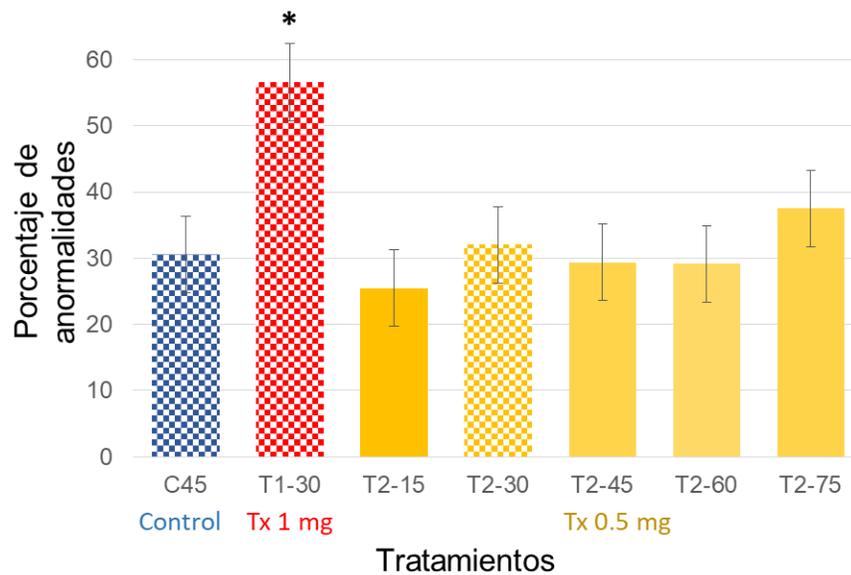
**Figura 4.** Motilidad en masa de los distintos grupos experimentales. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). Literales diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. El error estándar calculado fue de 0.43.

El análisis de viabilidad mostró el mayor porcentaje en los grupos T2-60 y T2-75, incluso superior al del grupo C45 ( $p < 0.05$ ). El grupo T2-30 presentó la misma relación con el resto de los grupos tratados (T2-60 y T2-75). El grupo T1-30 no mostró reducción en el porcentaje de viabilidad ( $p > 0.05$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Viabilidad espermática de los distintos grupos experimentales. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). Literales diferentes indican diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. El error estándar es de 3.09.

El análisis de la morfología de los espermatozoides mostró un incremento significativo en la presencia de anomalías espermáticas en el grupo T1-30 comparado con el grupo C45 ( $p < 0.05$ ). El resto de los grupos no presentó diferencias (Figura 6) El incremento de las anomalías no se asoció específicamente a alguna de las porciones espermáticas (cabeza, cuello y flagelo).



**Figura 6.** Presencia de anomalías espermáticas de los distintos grupos experimentales. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). (\*) Indica diferencia estadística con respecto al control ( $p < 0.05$ ). El error estándar es de 5.8.

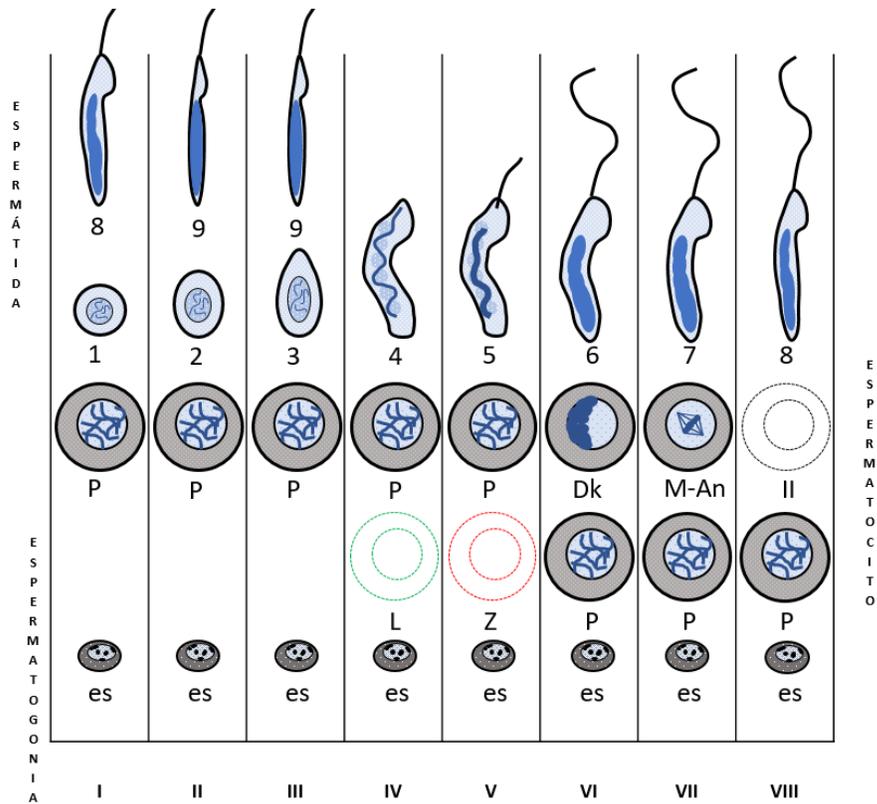
### Evaluación microscópica del tejido testicular

El análisis microscópico del tejido testicular (ancho y largo del túbulo, Grosor mínimo y máximo del epitelio seminífero) mostró una reducción significativa de los grupos T1-30 y T2-75 con respecto al grupo control y al resto de los grupos tratados con 0.5 mg de letrozol ( $p < 0.05$ ). En el caso de las mediciones del espacio intersticial el único cambio observado es en el grupo T2-30, donde el espacio intersticial aumenta en comparación con el resto de los grupos ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Medidas de los túbulos seminíferos en los distintos grupos experimentales. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). (\*) Indica diferencias significativas entre grupos dentro de la misma medida ( $p < 0.05$ ).

GRUPO	ANCHO DEL TÚBULO ( $\mu\text{M}$ )	LARGO DEL TÚBULO ( $\mu\text{M}$ )	GROSOR DEL EPITELIO - MÁXIMO ( $\mu\text{M}$ )	GROSOR DEL EPITELIO - MÍNIMO ( $\mu\text{M}$ )	ESPACIO INTERSTICIAL ( $\mu\text{M}$ )
<b>C45</b>	235.4	326.9	138.5	66.34	4.53
<b>T1-30</b>	137.8(*)	199(*)	82.8(*)	42.13(*)	4.62
<b>T2-15</b>	221.8	314.6	131.1	62.3	4.77
<b>T2-30</b>	209.2	299.9	124.6	60.67	5.77(*)
<b>T2-45</b>	217.6	304.1	121.4	58.1	4.75
<b>T2-60</b>	237.6	340.5	139.3	67.18	4.5
<b>T2-75</b>	155(*)	222.9(*)	86.1(*)	38.81(*)	4.82
<b>ERROR ESTÁNDAR</b>	16.33	23.15	10.8	5.86	0.39

No existe información sobre el ciclo del epitelio del túbulo seminífero en palomas, de modo que con la observación y cuantificación de las células presentes en los cortes histológicos del testículo, y tomando como base las fases del ciclo de la codorniz (*C. coturnix japonica*) (Lin *et al.*, 1990), se hace una propuesta para explicar el ciclo de las palomas, sugiriendo 8 fases (Figura 7).



**Figura 7.** Ciclo del epitelio seminífero de la paloma (*C. livia*) propuesto en este trabajo, en el cual se aprecian 8 fases. Las espermatogonias no están clasificadas en tipo A o B debido a la dificultad para distinguirlas (es); espermatocitos primarios: en leptoteno (L), en cigoteno (Z), paquíteno (P), diacinesis (Dk), metafase (M), anafase (An); Espermátocito secundario (II); espermátidas 9 etapas (1-9).

Las espermatogonias se observan en todas las fases del ciclo del epitelio, sin embargo, debido a la utilización de un microscopio óptico binocular no es posible diferenciar entre el tipo A y el tipo B, estas células se encuentran cerca de la lámina basal del túbulo seminífero, son ovoides y presentan núcleos grandes e intensamente teñidos.

Los espermatocitos se encuentran entre las espermatogonias y espermátidas, cerca del núcleo de las células de Sertoli. En este trabajo se aprecian fácilmente tres tipos de espermatocitos primarios: en fase de paquíteno, diacinesis y metafase/anafase. Los espermatocitos en fase de paquíteno son células redondas que tienen un núcleo grande, el cual, contiene gran cantidad de gruesas hebras de cromatina retorcidas. Las células en diacinesis muestran un núcleo irregular y picnótico debido a la migración y condensación de los cromosomas hacia la periferia del núcleo. Por

último, en los espermatocitos en metafase/anafase se pueden observar el huso acromático y la separación de las cromátidas, el material genético se puede apreciar con la máxima condensación.

Las espermátidas son pequeñas células redondas localizadas cerca del lumen del túbulo seminífero y conforme avancen en el proceso de espermiogénesis se irán elongando hasta culminar su transformación. En este trabajo se observaron 9 tipos de espermátidas.

**Fase I.** Se observan las espermatogonias, los espermatocitos primarios en fase de paquiteno y dos tipos de espermátidas, unas células totalmente redondas (etapa 1) y las otras en un estado avanzado de su desarrollo (etapa 8) (figura 8).



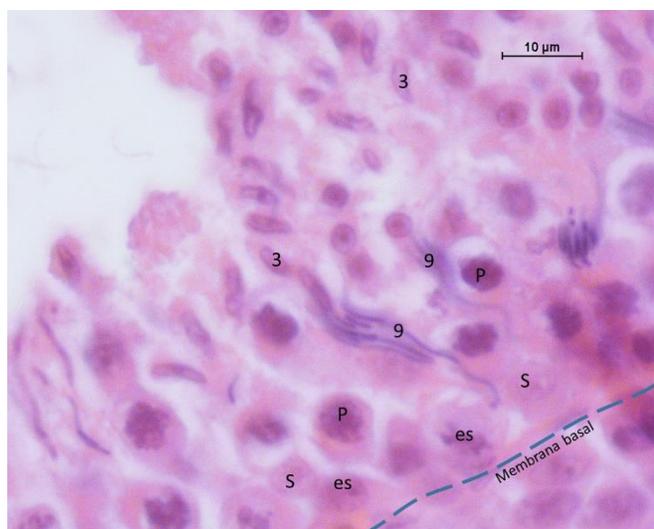
**Figura 8.** Fase I del ciclo del epitelio seminífero de la paloma. Se distinguen las espermatogonias (es), los espermatocitos primarios en fase de paquiteno (P), las espermátidas redondas en etapa 1 (1), las espermátidas elongadas en etapa 8 (8), así como los núcleos de las células de Sertoli (S).

**Fase II.** Se aprecian las espermatogonias, los espermatocitos primarios en fase de paquiteno y dos tipos de espermátidas, unas células que empiezan los cambios morfológicos y se encuentran ligeramente ovaladas (etapa 2) y otras células que se encuentran en la última etapa de elongación, por lo que se observan con una cabeza muy delgada y recta, prácticamente sin citoplasma, formando racimos de células (etapa 9) (figura 9).



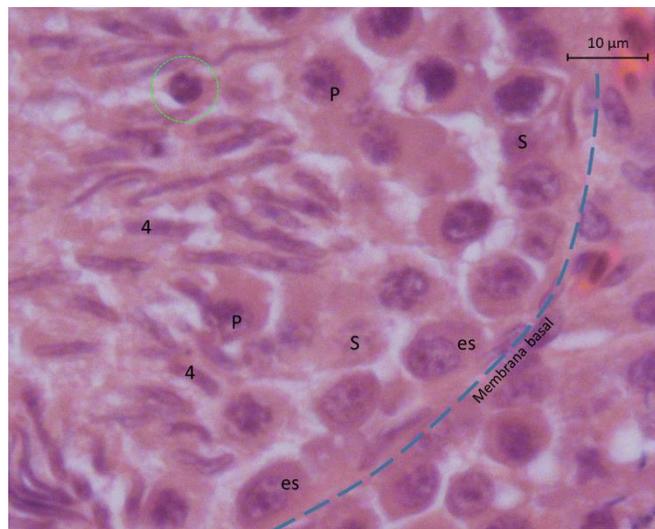
**Figura 9.** Fase II del ciclo del epitelio seminífero de la paloma. Se distinguen las espermatogonias (es), los espermatocitos primarios en fase de paquitenio (P), las espermatidas redondas en etapa 2 (2), las espermatidas elongadas en etapa 9 (9), así como los núcleos de las células de Sertoli (S).

**Fase III.** Se aprecian las espermatogonias, los espermatocitos primarios en fase de paquitenio y dos tipos de espermatidas, unas células se encuentran más ovaladas que en la etapa 2, semejando una gota, pero aún no empieza la formación del flagelo (etapa 3) y otras células que se encuentran en la última etapa de elongación (etapa 9) (figura 10).



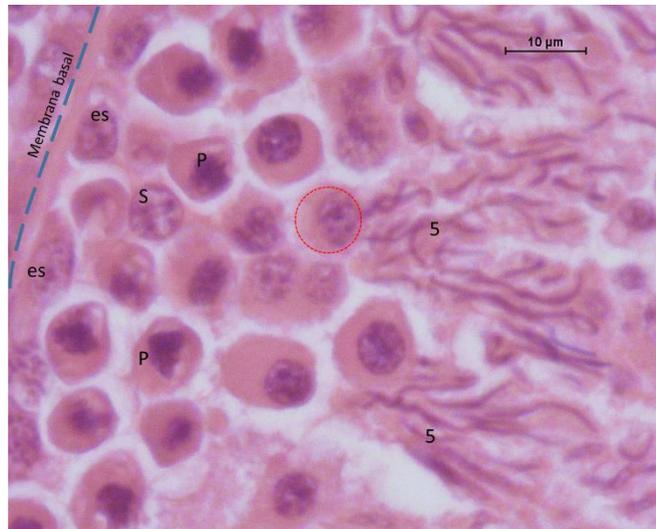
**Figura 10.** Fase III del ciclo del epitelio seminífero de la paloma. En el cual se pueden distinguir las espermatogonias (es), los espermatocitos primarios en fase de paquitenio (P), las espermatidas en etapa 3 (3), las espermatidas elongadas en etapa 9 (9), así como los núcleos de las células de Sertoli (S).

**Fase IV.** Se aprecian las espermatogonias y los espermatoцитos primarios en fase de paquiteno. Las espermátidas que se observan (etapa 4) tienen la cabeza elongada, el núcleo descondensado y aún no inician la formación del flagelo. En esta fase debe ocurrir la espermiación, por lo que ya no se pueden apreciar espermátidas que hayan completado su formación. Es probable que en esta fase se encuentren los espermatoцитos primarios en etapa de leptoteno, sin embargo, no se logra su observación (figura 11).



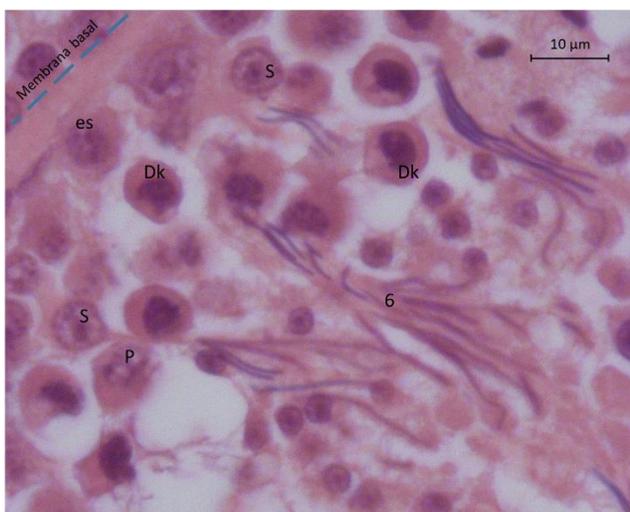
**Figura 11.** Fase IV del ciclo del epitelio seminífero de la paloma. Se distinguen las espermatogonias (es), los espermatoцитos primarios en fase de paquiteno (P), las espermátidas en etapa 4 (4), así como los núcleos de las células de Sertoli (S). El círculo punteado muestra una célula que podría corresponder a un espermatoцитo primario en fase de leptoteno, la visualización de estas células fue mínima a lo largo de las laminillas evaluadas.

**Fase V.** Se aprecian espermatogonias, espermatoцитos primarios en fase de paquiteno, y espermátidas en etapa 5, en las que ha iniciado la condensación de núcleo y la formación del flagelo. Aunque no se pueden observar, tendrían que estar los espermatoцитos en fase de cigoteno (figura 12).



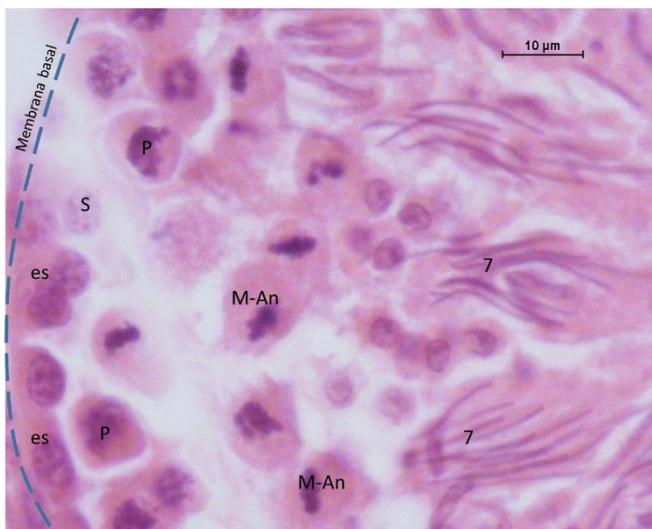
**Figura 12.** Fase V del ciclo del epitelio seminífero de la paloma. En el cual se pueden distinguir las espermatogonias (es), los espermatocitos primarios en fase de paquitenio (P), las espermátidas en etapa 5 (5), así como los núcleos de las células de Sertoli (S). El círculo punteado muestra una célula que podría corresponder a un espermatocito primario en fase de cigoteno, sin embargo, resulta difícil distinguir esta célula debido a que los cambios que presenta en comparación con un espermatocito en fase de paquitenio son sutiles, el núcleo se observa ligeramente menos compacto.

**Fase VI.** Se observan espermatogonias, espermatocitos primarios en paquitenio y en diacinesis, así como espermátidas elongadas con gran parte del flagelo desarrollado, aunque todavía presentan gran cantidad de citoplasma (etapa 6) (figura 13).



**Figura 13.** Fase VI del ciclo del epitelio seminífero de la paloma. Se aprecian las espermatogonias (es), los espermatocitos primarios en fase de paquiteno (P) y en diacinesis (Dk), las espermatídas en etapa 6 (6), así como los núcleos de las células de Sertoli (S).

**Fase VII.** Se aprecian espermatogonias, espermatocitos primarios en fase de paquiteno, así como espermatocitos en metafase o anafase. En las espermatídas la cabeza se aprecia más recta, y aún mantienen un exceso de citoplasma, lo que hace que las células se vean separadas (etapa 7) (figura 14).



**Figura 14.** Fase VII del ciclo del epitelio seminífero de la paloma. En el cual se pueden distinguir las espermatogonias (es), los espermatocitos primarios en fase de paquiteno (P) y en metafase/anafase (M-An), las espermatídas en etapa 7 (7), así como los núcleos de las células de Sertoli (S).

**Fase VIII.** Se ven espermatogonias, espermatoцитos primarios en fase de paquiteno, y espermátidas elongadas en una etapa muy avanzada de su desarrollo, con una mayor pérdida de citoplasma, por lo que se ven más agrupadas (etapa 8). En esta fase debe de haber espermatoцитos secundarios, pero no son distinguibles (figura 15).



**Figura 15.** Fase VIII del ciclo del epitelio seminífero de la paloma. Se aprecian las espermatogonias (es), los espermatoцитos primarios en fase de paquiteno (P), las espermátidas en etapa 8 (8), así como los núcleos de las células de Sertoli (S). El círculo punteado muestra lo que podría ser un espermatoцитo secundario, sin embargo, esta célula es difícil de observar debido a que la meiosis en esta etapa se lleva a cabo de manera rápida y esta fase es la menos frecuente del ciclo del epitelio seminífero, y es corta. Por lo anterior, en la mayoría de las ocasiones esta fase se presenta en un área muy reducida del túbulo (delimitada por las líneas punteadas) como se puede apreciar en la imagen, en la que del lado derecho se encuentra una fase V, y del lado izquierdo la fase VI.

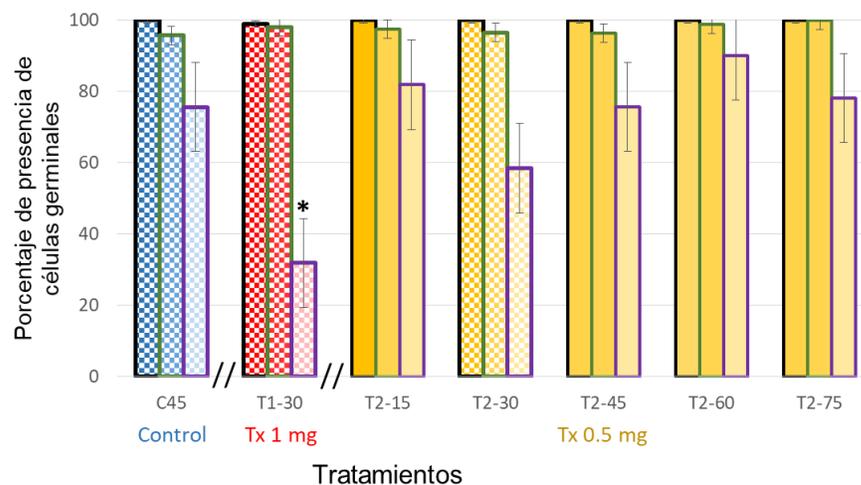
Con la propuesta anterior se compararon las distintas fases del ciclo del epitelio del túbulo seminífero presentes en los grupos de estudio. Se observó que el grupo T1-30 difirió del resto de los grupos al presentar una disminución en la frecuencia de presentación de todas las fases del ciclo ( $p < 0.05$ ). Mientras que en el grupo T2-75, hubo una reducción en las fases I, V, VI y VII ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Porcentaje de presentación de las distintas fases del ciclo del epitelio seminífero. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). (\*) Indica diferencias significativas entre grupos dentro de la misma medida ( $p < 0.05$ ).

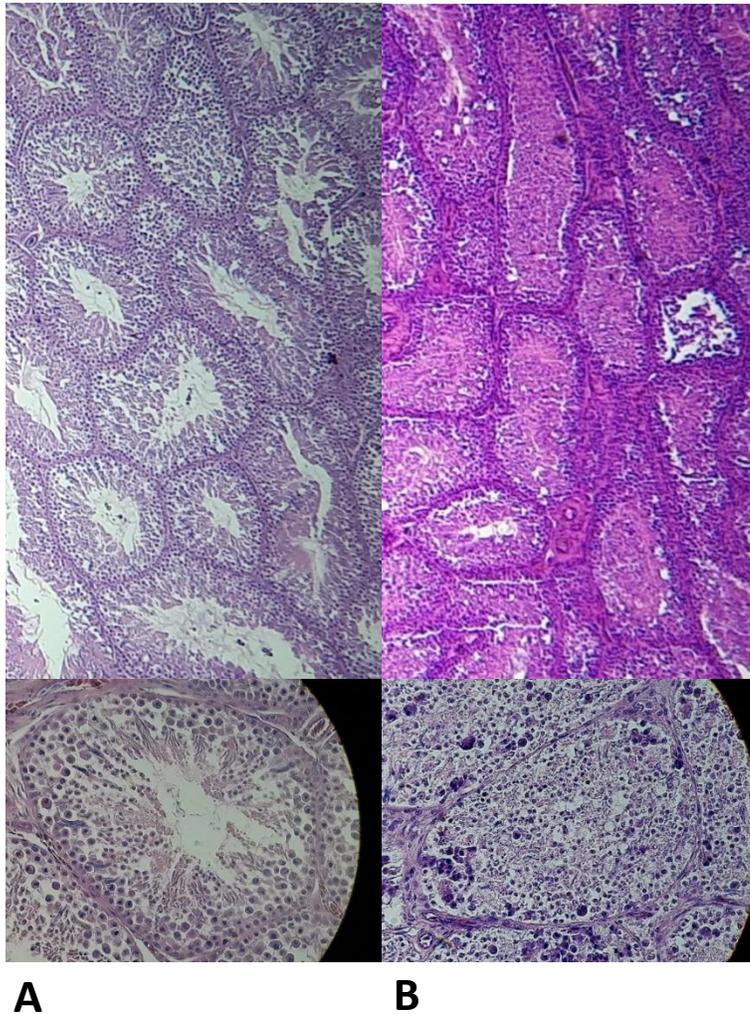
GRUPO	FASES (% DE PRESENTACIÓN)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VII
<b>C45</b>	97.14	59.29	34.19	47.14	74.14	72.86	40.71	49.29
<b>T1-30</b>	31.25(*)	29.38(*)	18.75(*)	16.88(*)	23.12(*)	21.87(*)	10(*)	10.62(*)
<b>T2-15</b>	96.88	63.75	39.38	46.25	80	73.12	38.12	42.5
<b>T2-30</b>	75	39.5(*)	36	56.5	74	62	36.5	41.5
<b>T2-45</b>	98.12	57.5	51.25(*)	49.38	78.75	66.88	47.5	45.62
<b>T2-60</b>	100	53.57	41.43	51.43	82.14	80.71	45	51.43
<b>T2-75</b>	67.5(*)	40	30	40.62	54.38(*)	50(*)	24.38(*)	35.62
<b>ERROR ESTÁNDAR</b>	13.23	10.92	7.99	10.19	11.67	11.4	7.69	8.15

Al evaluar la actividad espermatogénica se observan cambios en la presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos del grupo T1-30, en el cual disminuyó considerablemente el número de espermatozoides en comparación con el resto de los grupos ( $p < 0.05$ ) (Figura 16). Además, en el mismo grupo se observó la pérdida de la estructura tubular del estroma testicular en más del 50% del tejido (Figura 17). Cosa que no ocurrió en ninguno de los otros grupos tratados con 0.5 mg del medicamento, excepto en el último grupo tratado durante 75 días, en el cual, se observó pérdida del orden celular similar al grupo tratado con 1mg pero en menor proporción.

Adicionalmente, se observó pérdida del lumen del túbulo seminífero. Cabe aclarar que en los animales del grupo T1-30, aquellos túbulos que presentaron pérdida de la luz no fueron evaluados con fines de las mediciones morfométricas y la laminilla se recorrió de manera ordenada hasta obtener 20 túbulos que pudieran cuantificarse.



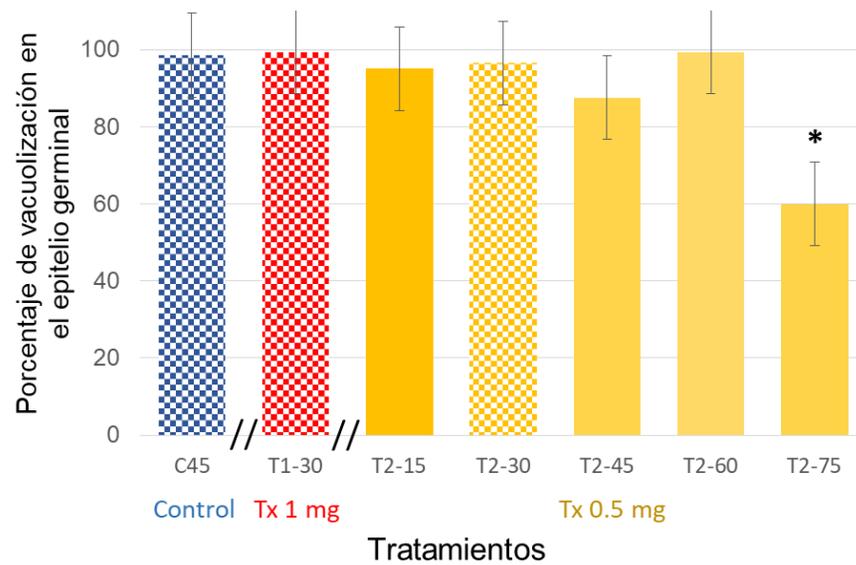
**Figura 16.** Actividad espermatogénica en los distintos grupos, indicada a través de la presencia de espermátidas redondas (■), espermátidas elongadas (▣) y espermatozoides (▢). Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). (\*) Indica diferencia estadística con respecto al control ( $p < 0.05$ ). Los errores estándar son 0.38 para presencia de espermátidas redondas; 2.61 para presencia de espermátidas elongadas; y 12.53 para presencia de espermatozoides.



**Figura 17.** Tejido testicular de un macho de paloma mensajera (*C. livia*). En el cual se puede apreciar un tejido normal (A), comparado contra la pérdida del orden celular en la mayoría de los túbulos seminíferos de un individuo tratado con 1 mg de letrozol (B).

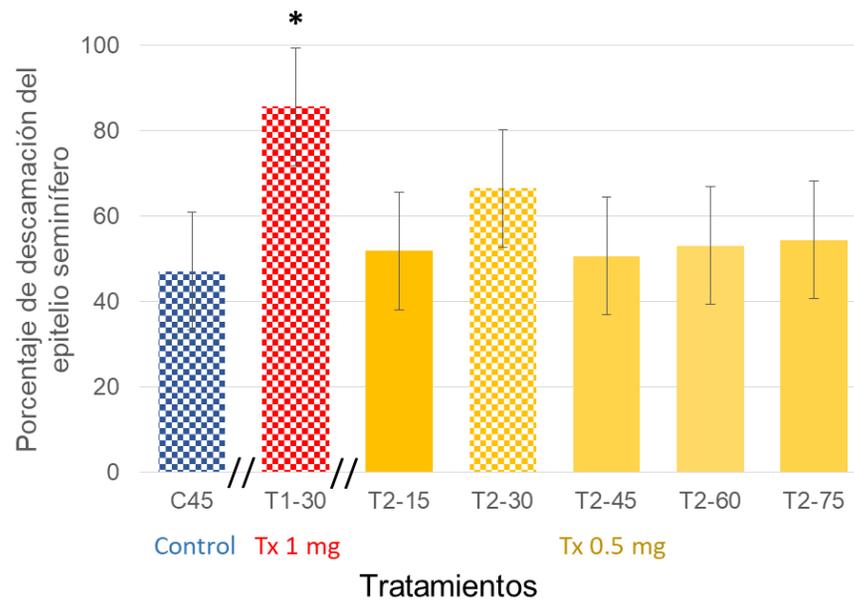
El número de células de Sertoli no difirió entre los grupos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, en el grupo T1-30 las células de Sertoli mostraban pérdida de su conformación debido a que los núcleos no se encontraban en la parte basal y no era fácil distinguir el inicio de una célula a otra.

El grupo T2-75 mostró una disminución en el porcentaje de vacuolización en el epitelio germinal en comparación con el resto de los grupos ( $p < 0.05$ ) (figura 18).



**Figura 18.** Vacuolización del epitelio germinal en los distintos grupos experimentales. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). (\*) Indica diferencia estadística con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Error estándar: 10.86.

El grupo T1-30 presentó más descamación del epitelio seminífero que el resto de los grupos ( $p = 0.057$ ) (Figura 19).

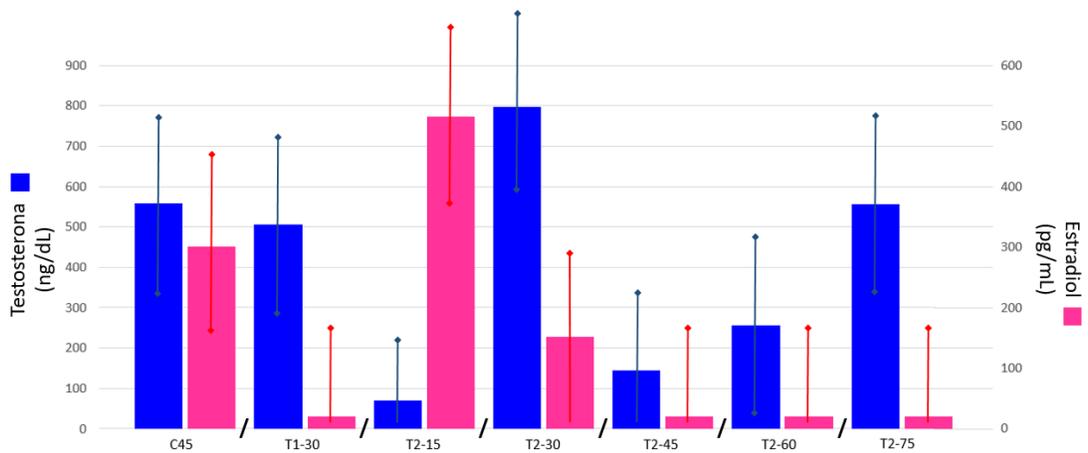


**Figura 19.** Presencia de descamación en los distintos grupos. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). (\*) Indica diferencia estadística con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Error estándar: 13.79.

La concentración espermática no difirió entre los grupos ( $p > 0.05$ ) (Anexo 2).

### Evaluación hormonal

Las concentraciones sanguíneas de testosterona y estradiol fueron similares entre los grupos ( $p > 0.05$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Concentraciones plasmáticas de testosterona en ng/dL y estradiol en pg/mL en palomas (*C. livia*). Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). El error estándar es de 235.6 (testosterona) y 177.6 (estradiol).

### Evaluación de hígado y riñón

La evaluación del hígado mostró algún grado de alteración celular, principalmente lipidosis hepática, en todos los grupos incluyendo el grupo control (Cuadro 3). En algunos individuos se encontró infiltración linfocitaria, sin embargo, los animales que lo presentaron están distribuidos en los diferentes grupos.

**Cuadro 3.** Cambios histológicos observados en hígado y riñón de los distintos grupos tratados. Grupo control del día 45 (C45); Grupo tratado con 1 mg de letrozol en el día 30 (T1-30); Grupos tratados con 0.5 mg de letrozol: días 15 (T2-15), 30 (T2-30), 45 (T2-45), 60 (T2-60), 75 (T2-75). El grado de lipidosis presente se clasifica en cuatro grupos: (-) no presenta lipidosis; (+) lipidosis leve; (++) moderada y (+++) severa. La presentación de infiltración linfocitaria se muestra con (+).

ID	Grupo	Hígado			Riñón		
		Lipidosis Grado	Lipidosis Tipo	Infiltración linfocitaria	Otro	Infiltración linfocitaria	Otro
54092/14	C45	++	Difusa	+		+	
Rojo	C45	-		-	Tumefacción	+	
Rosa	C45	+	Multifocal	+		+	
158064/11	C45	-		-		-	
144883/16	T1-30	-		-	Tumefacción	-	
54079/14	T1-30	-		-		+	
94546/15	T1-30	-		-		-	
52674/14	T1-30	-		+	Tumefacción	-	
51304/14	T2-15	++	Difusa	-		-	
124235/11	T2-15	++	Multifocal	-		-	
8123/10	T2-15	+	Multifocal	-		-	
74431/96	T2-15	+++	Difusa	-		-	
144127/16	T2-30	-		-		-	
122501/13	T2-30	++	Multifocal	-		-	
122542/13	T2-30	+	Multifocal	-		+	
159496/11	T2-30	++	Multifocal	-		-	
Morado	T2-45	++	Difusa	-		-	
125274/13	T2-45	+++	Multifocal	+		-	
7149/09	T2-45	+++	Multifocal	-		-	
Naranja	T2-45	++	Difusa	-		-	
Doble naranja	T2-60				Inadecuada		
Doble morado	T2-60	+++	Difusa	+		+	
159499/11	T2-60	+++	Multifocal	-		+	
154235/11	T2-60	+	Focal	-		-	
91331/15	T2-75	+++	Difusa	+		+	
144885/16	T2-75	++	Difusa	-		-	
64894/16	T2-75		Multifocal	-		-	
64883/16	T2-75	+++	Multifocal	+	Infiltración mieloide		Leucosis mieloide

## DISCUSIÓN

Este estudio demostró que el letrozol afecta la reproducción del macho de paloma (*C. livia*), al ser administrado por vía oral a una dosis de 1 mg/individuo cada 24 h durante un mes. El tratamiento con letrozol provocó alteraciones en el tejido testicular, aumenta la presentación de anomalías de los espermatozoides y disminuye su motilidad. Adicionalmente, en este trabajo se hace una propuesta del ciclo del epitelio seminífero, el cual no está reportado con anterioridad.

El epitelio del túbulo seminífero tiene un orden que está estrechamente relacionado a las células de Sertoli, esto es gracias a que forman parte de la barrera hemato-testicular y dan soporte a las células sexuales, lo que mantiene al túbulo con una distribución uniforme (Aire, 2007<sub>1</sub>). En este trabajo se observó que, en los animales tratados con 1 mg de letrozol, las células de Sertoli mostraron cambios en su estructura que se caracterizaron porque sus núcleos no se mantenían en la posición basal y las células se encontraban dispersas. Estos cambios pueden corresponder a efectos del medicamento, ya que en mamíferos el estradiol influye en el mantenimiento de las células de Sertoli al inducir la formación de factores anti-apoptóticos y de mantenimiento celular (Bernardino *et al.*, 2016; Lucas *et al.*, 2011; Vasconsuelo *et al.*, 2011). Adicionalmente, los animales del grupo tratado con 1 mg de letrozol presentaron pérdida de las estructuras tubulares en aproximadamente el 50% tejido testicular, y el resto de los túbulos presentó pérdida del orden celular y un aumento considerable en la descamación, e incluso hubo presencia de túbulos con pérdida de la luz. Esto pudo deberse a que las células de Sertoli perdieran la capacidad de soporte de las células germinales.

Nada de lo anterior ocurrió en los animales de los grupos control y tratados hasta 60 días con 0.5 mg. Sin embargo, en el grupo tratado con 0.5 mg de letrozol en un periodo de 75 días se observó el inicio de degeneración tubular, similar al grupo de 1 mg con pérdida de túbulos y del orden celular en una baja proporción. Lo anterior, sugiere que el tratamiento con una dosis menor requiere ser administrado por un periodo prolongado para causar esterilidad. Para poder evaluar que existe una

degeneración o apoptosis de las células de Sertoli se sugiere la utilización de yoduro de propidio para teñir el tejido testicular de los animales tratados (Pietkiewicz *et al.*, 2015).

Por otro lado, en los animales del grupo tratado con 1mg también se encontró una reducción en el grosor del epitelio y en el diámetro del túbulo en comparación con el grupo control y con los grupos tratados con 0.5 mg del medicamento administrado hasta 60 días. Esto sugiere que la falta de estradiol ocasionada por el tratamiento desencadena un proceso de degeneración testicular, que puede percibirse con la disminución del grosor del epitelio y la presencia de vacuolas en las células. Lo anterior se refuerza con la observación de la disminución de la motilidad y del aumento de anomalías espermáticas, características que son consideradas como signos de degeneración (Metcalf, 2007). Estos resultados son similares a los encontrados en ratones knockout para receptores  $\alpha$  a estradiol (ER $\alpha$ KO), los cuales comienzan a tener una degeneración testicular a partir de los 20 o 40 días de edad, y a los 150 días los testículos son completamente atrésicos (Eddy *et al.*, 1996).

Además de los cambios tisulares observados en el epitelio germinal, el tratamiento con 1 mg de Letrozol (Grupo T1-30) aumentó la presencia de anomalías espermáticas en distintas porciones del espermatozoide (cabeza, pieza media y flagelo). Una posible explicación para lo anterior es que dichas alteraciones son consecuencia de los efectos adversos que ocasionó el tratamiento sobre las células de Sertoli, ya que parte de sus funciones de soporte implica mantener a las células germinales saludables durante el proceso de espermiogénesis (Aire, 2007<sub>1</sub>). Entonces, la alteración de la función de las células de Sertoli pudo haber ocasionado que las espermátidas redondas no llevaran a cabo los cambios necesarios para convertirse en espermatozoides (espermiogénesis).

La segunda posible causa del incremento de las anomalías espermáticas sería una afección a la actividad de los conductos eferentes y de la primera parte del epidídimo. Tanto en conductos eferentes como en epidídimo se han encontrado receptores alfa para estradiol en el gallo (Kwon *et al.*, 1995; 1997), lo que supondría

que la falta de actividad del estradiol tenga un efecto parecido al observado en mamíferos, en los que se ha visto que en ratones knock-out a receptores alfa a estradiol (ER $\alpha$ KO) se incrementa significativamente el porcentaje de anomalías espermáticas (Eddy *et al.*, 1996). Referencias previas (Munro, 1938; Bedford, 1979; Howarth 1983) han sugerido que el semen de aves no requiere un proceso de maduración y capacitación considerando al epidídimo como un canal de paso, sin función aparente. En un trabajo más reciente (Blesbois, 2018) se considera que si hay capacitación, pero la mencionan como un proceso expedito, sin embargo, no se fundamenta adecuadamente esa conclusión. Se requieren estudios enfocados a evaluar la función del epidídimo, así como la capacitación espermática en aves.

Una tercera causa del incremento de anomalías en los espermatozoides puede estar relacionada a que el estradiol participe en la conformación final del espermatozoide, actuando directamente a nivel de la célula en formación. Se ha descrito la presencia de receptores alfa a estradiol en la pieza media y cerca del núcleo del espermatozoide, en humanos (Solakidi *et al.*, 2005). Así, en hombres que carecen de aromatasa se ha encontrado un incremento en el número de anomalías espermáticas (Luconi *et al.*, 2002); mientras que ratones que presentan alteraciones en la conformación de los receptores a estradiol (ratones ERKO), tienden a incrementar el número de anomalías de la pieza media (Carreau y Hess, 2010). En nuestro trabajo el tratamiento con el inhibidor de aromatasa causó la presencia de anomalías tanto en la pieza media como en otras porciones del espermatozoide (cabeza y flagelo). Sin embargo, no se dispone de información sobre la existencia de receptores a estradiol en alguna porción del espermatozoide de aves.

Aunque no fue el objetivo de este trabajo, se observó que en los individuos tratados con 1 mg de Letrozol o 0.5 mg administrados durante 75 días hubo un aumento en la cantidad de descamación celular del epitelio seminífero con respecto al grupo control, misma que se apreció en el lumen de los túbulos seminíferos y en el epidídimo; pero no se observó en gran cantidad en el semen obtenido del conducto

deferente por la técnica de flushing. Esto podría indicar que el epidídimo, del mismo modo que en mamíferos, tiene las funciones de absorber el líquido tubular y de filtrar las células que atraviesan al conducto deferente. Es necesario realizar otro tipo de investigaciones para conocer a detalle el funcionamiento de este órgano, así como el control de dichas actividades, ya que en mamíferos se sugiere que éstas se encuentran bajo el control de estradiol (Hess *et al.*, 1997) y nuestros resultados muestran que no es el caso de las aves, en las que el tratamiento con el inhibidor de aromatasa no interfirió con el filtrado celular.

La motilidad es uno de los principales parámetros para determinar la fertilidad de un individuo y en aves se reporta en valores alrededor del 70%. Por ejemplo, en gallos (*Gallus gallus domesticus*) se ha establecido la motilidad en un rango entre 60 y 80% (Garner y Hafez, 2013), mientras que en palomas Sontakke (2004) estableció que la motilidad va desde 25 hasta 95%, con un promedio de 72%. En nuestro trabajo el promedio de motilidad de los animales control fue de 33%, lo cual se encuentra dentro del rango establecido, pero por debajo del promedio. Debe considerarse que la diferencia entre nuestros resultados puede deberse a que el estudio de Sontakke se realizó mediante el sistema CASA. La medicación con 1 mg de letrozol causó una disminución significativa en la motilidad (8%), efecto que adjudicamos directamente a la baja producción de estradiol, ya que ambos grupos se evaluaron en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones.

La afectación en la motilidad de los espermatozoides del grupo tratado con 1mg de letrozol corrobora la importancia del estradiol para promover la motilidad espermática, y refuerza los hallazgos de Solakidi *et al.* (2005), quienes en ratones encontraron receptores alfa a estradiol en la membrana plasmática de la pieza media, asociando su función al movimiento de la célula, ya que los ratones que carecen del receptor presentan un aumento en el número de espermatozoides inmóviles así como una disminución en la fertilidad (Korach, 2000).

La viabilidad de los espermatozoides del grupo control fue de 84%, lo que corresponde con lo establecido para gallos (80% promedio) (Garner y Hafez, 2013).

Estos parámetros no tuvieron cambios estadísticamente significativos en el tiempo del tratamiento, en el grupo tratado con 1mg de letrozol (88.8%), ni en los grupos de 0.5 mg hasta por 45 días (T2-15: 86.6%; T2-30: 83.7%; T2-45: 89%). A la fecha, no existe información que relacione al estradiol con alguna actividad sobre la viabilidad espermática, ni en mamíferos ni en aves; los hallazgos de nuestro estudio confirman que el estradiol no parece tener alguna función sobre la viabilidad de los espermatozoides.

En los grupos tratados con 0.5 mg del medicamento durante 60 y 75 días se mostró un aumento en la viabilidad, así como en la motilidad progresiva y en masa, para lo cual no encontramos una explicación. A partir del día 31 el intervalo en la medicación pasó de ser cada 24 a cada 48 horas, por lo que pudiera pensarse que la reducción en las concentraciones del medicamento causará una recuperación de la espermatogénesis. Sin embargo, durante la realización del estudio se mostró que la administración prolongada de letrozol a la dosis de 0.5mg inicia una alteración en la estructura del túbulo seminífero semejante, aunque de menor proporción, a la observada en el grupo tratado con 1mg del medicamento, por lo cual, no se pueden relacionar las observaciones de las tres variables a una regeneración testicular.

La fertilidad del grupo control fue de 80%, sin embargo, en aquellas parejas donde el macho fue tratado con 1mg de letrozol esta se redujo a 0% ( $p < 0.05$ ), lo cual indica que la falta de estradiol afecta la fertilidad. Este hallazgo se debe a los cambios ocasionados por el medicamento que ya se explicaron con anterioridad: alteración del tejido testicular, disminución en la motilidad espermática y aumento en la presencia de anormalidades.

Al evaluar el ciclo del epitelio del túbulo seminífero se pudo hacer una propuesta para palomas, la cual consta de ocho fases, esta es la primera descripción del ciclo que se hace para la especie.

En el grupo control se observaron las 8 fases del ciclo del epitelio seminífero identificadas en este trabajo, en la codorniz (*C. coturnix*) se han reportado 10 fases

(Lin *et al.*, 1990), 8 – 10 fases en el gallo (*G. gallus*) (Gunawardana, 1977; Tiba *et al.*, 1993), y 8 fases en la gallina de Guinea (Aire *et al.*, 1980). La frecuencia de presentación de las fases en el ciclo de la paloma varió, por ejemplo, la fase I es la más abundante (97%) mientras que la fase III tiene la menor incidencia (34%). Esta variación puede explicarse porque la vida media de las células durante el proceso de espermatogénesis es diferente, lo cual implica que de acuerdo a rapidez de división podamos verlas más frecuentemente, cuando esta es lenta, o las observemos muy rara vez, cuando ocurre en forma rápida. En el caso del grupo tratado con 1mg de letrozol, aun cuando también se observaron todas las fases del ciclo establecido para la especie, hubo una disminución significativa en la presentación de todas ellas. La fase I continuó siendo la de mayor incidencia, pero fue la que más afectación tuvo al reducir su presentación a un 31%. Debe considerarse que en este grupo la pérdida del orden celular del túbulo seminífero que se presentó en aproximadamente la mitad del tejido testicular, lo que imposibilitó la observación de las fases con claridad. Estos cambios indican que el tratamiento con el inhibidor de aromatasa afecta la espermatogénesis de manera general, lo cual puede correlacionarse con el incremento en el número de espermatozoides anormales e inmóviles, en este grupo. En el caso de los grupos tratados con 0.5mg solamente se observan reducciones consistentes en la mayoría de las fases (I, V, VI, VII) en el grupo tratado durante 75 días, grupo en el que –en menor proporción- también hubo pérdida de la estructura tubular, lo cual sugiere que si el tratamiento se prolonga podría tenerse el mismo efecto de afección de la espermatogénesis que se apreció en el grupo de 1mg.

La observación de los cortes histológicos de hígado y riñón no son concluyentes para indicar alguna afectación provocada por el medicamento. Debido a que la mayoría de los animales presentaron un grado de lipidosis hepática, sugiriendo que la alimentación y la inactividad de los mismos tuvieron mayor influencia sobre el estado de salud de las palomas. Es por ello, que sería necesario realizar más estudios para poder determinar la influencia de letrozol sobre la salud.

## **CONCLUSIONES**

El letrozol afecta la reproducción del macho de paloma (*C. livia*), al ser administrado por vía oral a una dosis de 1 mg/individuo cada 24 h durante un mes, debido a que afecta la espermatogénesis y la integridad testicular, lo que lo posiciona como un buen método para el control reproductivo de la especie.

El presente trabajo hace una propuesta del ciclo del epitelio del túbulo seminífero de las palomas, lo cual ayuda a la comprensión de la reproducción de la especie.

## Anexos

### Anexo 1. Medidas macroscópicas de los testículos de los grupos experimentales.

GRUPO	PESO (G)	LARGO (MM)	ANCHO (MM)
C45	1.16	19.88	10.75
T1-30	2.04	22.5	12.25
T2-15	1.2	20.63	10.5
T2-30	1.08	19.64	9.8
T2-45	1.4	21.6	10.38
T2-60	1.31	20.88	11.25

### Anexo 2. Concentración espermática de los distintos grupos tratados

GRUPO	ESPERMATOZOIDES X10 <sup>6</sup> /ML
C45	45.77
T1-30	24.07
T2-15	31.32
T2-30	25.31
T2-45	27.03
T2-60	24.76
T2-75	29.5

## Referencias

- Acha P (1). 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.
- Acha P (2). 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.
- Adkins EK, Mason P. Effects of cyproterone acetate in the male Japanese quail. *Hormones and Behavior*. 1974; 5: 1 – 6.
- Aire T (1). Anatomy of the testis and male reproductive tract. En *Reproductive Biology and Phylogeny of Aves (Birds)*. Jamieson BGM (Ed.). Science Publishers, Enfield, New Hampshire. 2007: 367 – 399.
- Aire T (2). Spermatogenesis and testicular cycles. En *Reproductive Biology and Phylogeny of Aves (Birds)*. Jamieson BGM (Ed.). Science Publishers, Enfield, New Hampshire. 2007: 279 – 348.
- Aire T, Olowo-okorun M, Ayeni J. The seminiferous epithelium in the guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell and Tissue Research*. 1980; 205: 319 – 325.
- 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.
- Aponte PM, Gutierrez-Reinoso MA, Sanchez-Cepeda EG, García-Herreros M. Active immunization against GnRH in pre-puberal domestic mammals: testicular morphometry, histopathology and endocrine responses in rabbits, guinea pigs and ram lambs. *Animal*. 2017; 12(4): 784 – 793.
- Arlt S, Spankowski S, Kaufmann T, Kostelnik k, Heuwieser W. Fertility control in a male rabbit using a deslorelin implant, a case report. *World Rabbit Science*. 2010; 18: 179 – 182.

- Askew JA, Georgiou 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.
- Bedford JM. Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. En: *The spermatozoon*. Fawcett DW y Bedford JM (Eds). Urban and Schwarzenberg, Baltimore. 1979: 7 – 21.
- Bernardino RL, Costa AR, Martins AD, Silva J, Barros A, Sousa M, Sá R, Alves MG, Oliveira PF. Estradiol modulates Na<sup>+</sup>-dependent HCO<sub>3</sub> transporters altering intracellular pH and ion transport in human Sertoli cells: A role on male fertility?. *Biology of the Cell*. 2016; 108: 179 – 188.
- Bertschinger HJ, Jago M, Nöthling JO, Human A. Repeated use of the GnRH analogue deslorelin to down-regulate reproduction in male cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology*. 2006; 66: 1762 – 1767.
- Blesbois E. Bird reproduction overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Skinner MK. Segunda Edición. Elsevier, 2018: 579 – 585.
- Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 2010; 365, 1517 – 1535.
- Chou HF, Johnson AL. Luteinizing hormone secretion from anterior pituitary cells of the cockerel: evidence for an ultradian rhythm. *Poultry Science*. 1987; 66: 732 – 740.
- Cornil C, Schmit M, de Bournonville C, Ceuleers M, Daulne C. Age-dependent and age-independent effects of testosterone in male quail. *General and Comparative Endocrinology*. 2014; 208: 64 – 72.
- Cowan ML, Martin GB, Monk DJ, Johnston SD, Tyson RJ, Blackberry MA. Inhibition of the reproductive system by deslorelin in male and female pigeons (*Columba livia*). *Journal of avian medicine and surgery*. 2014; 28: 102 – 108.

- D'Occhio MJ, Fordyce G, Whyte TR, Aspden WJ, Trigg TE. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Animal Reproductive Science*. 2000; 60: 433 – 442.
- De Wit M, Westerhof I, Penfold L. Effect of leuprolide acetate on avian reproduction. *Proc 25<sup>th</sup> AAV Conf. New Orleans (LA). August 17 – 19, 2004*: 73 – 74.
- 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.
- 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.
- Dijkstra C, Riedstra B, Dekker A, Goerlich V, Dann S, Groothuis T. An adaptive annual rhythm in the sex of first pigeon eggs. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 2010; 64: 1393 – 1402.
- Dobeic M, Pintarics S, Vlahociv K, Dovc A. Feral pigeon (*Columba livia*) population management in Ljubljana, Slovenia. *Veterinarski Arhiv*. 2011; 81: 285 – 298.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*. 1996; 137: 4796 – 4805.
- 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.
- 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.

- Forman C, Wehrend A, Goericke-Pesch S. Deslorelin implants are suitable for contraception in female, but not male guinea pigs. Proc International symposium on canine and feline reproduction. Paris, junio 22 – 24, 2016.
- Fraser HM, Lincoln GA. Effects of chronic treatment with an LHRH agonist on the secretion of LH, FHS and testosterone in the ram. *Biology of Reproduction*. 1980; 22: 269 – 276.
- Fusani L, Gahr M, Hutchison J. Aromatase inhibition reduces specifically one display of the ring dove courtship behavior. *General and Comparative Endocrinology*. 2001; 122: 23 – 30.
- Galli FE, Irusta O, Wassermann GF. Androgen production by testes of *Gallus domesticus* during postembryonic development. *General and Comparative Endocrinology*. 1973; 21: 262 – 266.
- Garner DL, Hafez ESE. Espermatozoides y plasma seminal. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. Hafez ESE, Hafez B (eds). Séptima edición. Mc Graw Hill. 2013. 98 – 112.
- Garner MM, Ramsel K, Schoemaker NJ, Sidor IF, Nordhausen RW, Bolin S, Evermann JF, Kiupel M. Myofasciitis in the domestic ferret. *Veterinary Pathology*. 2007; 44: 25 – 38.
- Gee GF, Morrel CA, Franson JC, Pattee OH. Cryopreservation of American kestrel semen with dimethylsulfoxide. *Journal of Raptor Research*. 1993; 27: 21.
- Geyer A, Poth T, Otzdorfft C, Daub L, Reese S, Braun J, Walter B. Histopathologic examination of the genital tract in rabbits treated once or twice with a slow-release deslorelin implant for reversible suppression of ovarian function. *Theriogenology* 2016; 86: 2281 – 2289.
- Goericke-Pesch S. Long-term effects of GnRH agonists on fertility and behavior. *Reproduction of domestic animals*. 2017; 52 (Suppl 2): 336 – 347.

- Goericke-Pesch S, Groegera G, Wehrend A. The effects of a slow release GnRH agonist implant on male rabbits. *Animal Reproduction science*. 2015; 152: 83 – 89.
- 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.
- Gómez de Silva H, Medellín RA, Oliveras de Ita A. *Columba livia*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales, DF. 2005.
- Gunawardana VE. Stages of spermatids in the domestic fowl: a light microscope study using Araldite sections. *Journal of Anatomy*. 1977; 123; 351 – 360.
- Hargrove TL. Cryogenic preservation of budgerigar, *Melopsittacus undulates*, semen. Master of Science thesis. Florida Atlantic University. EUA. 1986
- 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.
- Hawkins GM, Barron Hw, Speer BL. Birds En: Carpenter J (ed). *Exotic Animal Formulary*. Cuarta edición, Saunders-Elsevier, 2012: 277 - 284.
- He D, Jiang F. Meta-analysis of letrozole versus clomiphene citrate in polycystic ovary syndrome. *Reproductive Biomedicine Online*. 2011; 23: 91 – 96.
- Herbert CA, Trigg TE, Renfree MB, Shaw G, Eckery DC, Cooper DW. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist implant on reproduction in a male marsupial, *Macropus eugenii*. *Biology of reproduction*. 2004; 70: 1836 – 1842.

- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*. 1997; 390: 509 – 512.
- Howarth B. Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis, epididymis and vas deferens following intramaginal insemination. *Biology of reproduction*. 1983; 28: 589 – 590.
- Jinshu X, Jingjing L, Duan P, Zheng Z, Ding M, Jie W, Rongyue C, Zhuoyi H, Roque R. A synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine for control of fertility and hormone dependent diseases without any adjuvant. *Vaccine*. 2005. 23; 40: 4834 – 4843.
- Johnson AL. Reproduction in the female. En *Sturkie's Avian Physiology*. Scanes CG (ed). 6° edición. Elsevier, EUA. 2015: 635 – 665.
- 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.
- Joyner KL. Theriogenology. En Ritchie B, Harrison B, Harrison L. *Avian medicine: Principles and application*. Wingers Publishers Inc., Florida, EUA. 1994: 748 – 804.
- Kauffold J, Rohrmann H, Boehm J, Wehrend A. Effects of long-term treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin®) on sexual function in boars. *Theriogenology*. 2010; 74 (5): 733 – 740.
- Kelley DB. Sexually dimorphic behaviors. *Annual Review of Neuroscience*. 1988; 11: 225 – 251.
- Korach KS. Estrogen receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2000; 7: S17 – S17.
- Kwon S, Hess RA, Bunick D, Kirby JD, Bahr J. Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster. *Journal of Andrology*. 1997; 18: 378 – 384.

- Kwon S, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janulis L, Osawa Y, Bahr J. Rooster testicular germ cells and epidymal sperm contain P450 aromatase. *Biology of Reproduction*. 1995; 53: 1259 – 1264.
- Lake PE. The structure of the germinal epithelium of the fowl testis with special reference to the presence of multinuclear cells. *Quarterly journal of Microscopical Science*. 1956; 97: 487 – 497.
- Lake PE, Ravie O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British poultry science*. 1984; 25: 145 – 150.
- Leboucher 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.
- Lennox A. Use of a GnRH Vaccine, Gonacon™, for prevention of adrenocortical disease (ACD) in domestic ferrets. Proc 2<sup>nd</sup> ICARE Conf. April 18-23, Paris 2015: 365.
- Lin M, Jones RC. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail. *Cell and Tissue Research*. 1992; 267: 591 – 601.
- Lin M, Jones RC, Blackshaw AW. The cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and estimation of its duration. *Journal of reproduction and fertility*. 1990; 88: 481 – 490.
- Lincoln GA, Fraser HM, Abbott MP. Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in ram by constant infusión of an LHRH agonist. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1986; 77: 587 – 597.
- López IA. Evaluación del comportamiento reproductivo de palomas mensajeras (*Columba livia*) con la administración de un inhibidor de aromatasa. Tesis para obtener el título de licenciatura. FMVZ-UNAM. México, 2019.
- Lucas T, Pimenta M, Pisolato R, Lazari MF, Porto C. 17 $\beta$ -estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis*. 2011; 1: 318 – 324.

- Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2002; 80: 369 – 381.
- Lunn SF, Cowen GM, Morris KD, Fraser HM. Influence of the gonad on the degree of suppression induced by an LHRH agonist implant in the marmoset monkey. *Journal of Endocrinology*. 1992; 132: 217 – 224.
- Lupu CA. Evaluation of side effects of tamoxifen in budgerigars. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2000; 14: 237 – 242.
- Marlier D, Vindevogel H. Viral infections in pigeons. *The Veterinary Journal*. 2006; 172: 40 – 51.
- Mathews CK. *Bioquímica*. Editorial Pearson. 3º edición. Madrid, España. 2002: 774 – 778.
- Maung ZW, Follett, BK. Effects of chicken and ovine luteinizing hormone on androgen release and cyclic AMP production by isolated cells from the quail testis. *General and Comparative Endocrinology*. 1977; 33: 242 – 253.
- Meccariello R, Chianese R, Chioccarelli T, Ciaramella V, Fasano S, Pierantoni R, Cobellis G. Intra-testicular signals regulate germ cell progression and production of qualitatively mature spermatozoa in vertebrates. *Frontiers in Endocrinology*. 2014; 5: 1 – 11.
- Melville DF, O'Brien, Crichton EG. Reproductive seasonality and the effect of the GnRH agonist deslorelin as a contraceptive in captive male Black Flying foxes (*Pteropus alecto*). *Theriogenology*. 2012; 77 (3): 652 – 661.
- Metcalf ES. Spermatogenic arrest (Testicular degeneration) En: *Current therapy in equine reproduction*. Elsevier. Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO (Eds) 2007: 212 -213.
- Metrione LC, Verstegen JP, Heard DJ, LeBlanc D, Walsh AL, Pendfold LM. Preliminary evaluation of deslorelin, a GnRH agonist for contraception of the

captive variable flying fox (*Pteropus hypomelanus*) contraception 2008; 78 (4): 336 – 345.

- Munro SS. Functional changes in fowl sperm during their passage through the excurrent ducts of the male. *Journal of Experimental Zoology*. 1938; 79: 71 – 92.
- NOM-033-SAG/ZOO-2014. “Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres”. *Diario Oficial de la Federación*. 26 de agosto del 2015.
- Noonan B, Johnson P, Matos D. Evaluation of egg-laying suppression effects of the GnRH agonist deslorelin in domestic chicken. *Proc Annu Conf Ass Avian Vet*. Louisville (KY). August 12 – 15, 2012, p. 321.
- Oxenham M. Oestrus control in the ferret. *Veterinary research*. 1990; 126: 148.
- Padula AM. GnRH analogues-agonists and antagonists. *Animal reproduction science*. 2005; 88: 115 – 126.
- Petritz OA, Guzman DS, Paul-Murphy J, Fecteau K, Mete A, Kass PH, Hawkins MG. Evaluation of the efficacy and safety of single administration of 4.7mg deslorelin acetate implants on egg production and plasma sex hormones in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *American journal of veterinary research*. 2013; 74(2): 316 – 323.
- Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necrosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *Journal of Immunological Methods*. 2015; 423: 99 – 103.
- Pollock CG, Orosz SE. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *The Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*. 2002; 5: 441 – 474.
- Rangel L. Aves. En: *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. Rangel y Hernández (Eds). UNAM, México. 2018: 547 – 578.

- Robertson KM, O'Donnell L, Jones MEE, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (CYP19) gene. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1999; 96, 7986 – 7991.
- Schlinger B, Barske J, Day L, Fusani L, Fuxjager M. Hormones and the neuromuscular control of courtship in the golden-collared manakin (*Manacus vitellinus*). *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2013; 34: 143 – 156.
- Schmidt F, Legler M, Einspanier A. Influence of the GnRH slow-release agonist deslorelin on the gonadal activity of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Proc 1 ICARE Conf. Wiesbaden (Germany)*. April 20-26, 2013: 501 – 502.
- Schoemaker NJ. Gonadotrophin-Releasing hormone agonists and other contraceptive medication in exotic companion animals. *Veterinary clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 2018; 21: 443 – 464.
- Schoemaker NJ, Lumeij JT, Rijnberk A. Current and future alternatives to surgical neutering in ferrets to prevent hyperadrenocorticism. *Veterinary medicine*. 2005; 100: 484 – 496.
- Sharp PJ. Strategies in avian breeding cycles. *Animal Reproduction Science*. 1996; 42: 505-513.
- Sharp PJ, Culbert J, Wells JW. Variations in stored and plasma concentrations of androgens and luteinizing hormone during sexual development in the cockerel. *Journal of Endocrinology*. 1977; 74: 467 – 476.
- Sharp PJ, Gow CB. Neuroendocrine control of reproduction in the cockerel. *Poultry Science*. 1983; 62: 1671 – 1675.
- Solakidi S, Psarra A-MG, Nikolaropoulos, Sekeris CE. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER $\beta$  and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction*. 2005; 20 (12): 3481 – 3487.

- Solano JA. 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 para obtener el grado de licenciatura. FMVZ-UNAM, México. 2015.
- Sontakke SD, Umapathy G, Sivaram V, Kholkute SD, Shivaji S. Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology*. 2004; 62: 139 – 153.
- 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.
- Tiba T, Yoshida K, Miyake M, Tsuchiya K, Kita I, Tsubota T. Regularities and irregularities in the structure of seminiferous epithelium in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). I. Suggestion of the presence of the seminiferous epithelial cycle. *Anatomy, Histology and Embryology*. 1993; 22: 241 – 253.
- 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.
- Tudor DC. Pigeon health and disease. Iowa State University Press. EUA. 1991: 224.
- Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda AC, Boland R, Milanesi L. Role of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids*. 2011; 76: 1223 – 1231.
- Vatnick I, Foertsch S. Incubation temperature of the pigeon embryo (*Columba livia*). *Journal of Thermal Biology*. 1998; 23: 53 – 57.
- Villaverde-Morcillo S, Estes MC, Castaño C, Santiago-Moreno J. Influence of post-mortem sperm recovery method and extender on unstored and refrigerated rooster sperm variables. *Reproduction of domestic animals*. 2016; 51: 40 – 46. doi: 10.1111/rda.12643.

- Vizcarra J, Alan R, Kirby J. Reproduction in Male Birds. En Sturkie's Avian Physiology. Scanes CG (ed). 6° edición. Elsevier, EUA. 2015: 635 – 665.
- 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.
- Wilson SC, Sharp PJ. Episodic release of luteinizing hormone in the domestic fowl. Journal of Endocrinology. 1975; 64: 77 – 86.
- Yamamoto S, Tamate H, Itikawa O. Morphological studies on the sexual maturation in the male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). II. The germ cell types and cellular associations during spermatogenesis. Tohoku Journal of agricultural research. 1967; 18: 27 – 37.
- 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.
- Yuri V, Langoni H, Vieira A, Bergamaschi S, Perez A, Costa R, Pessoa J. Chlamydophila psittaci and Toxosplama gondii infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo state, Brazil. Veteinary Parasitology. 2011; 175: 9 – 14.
- Zarco L. Diferenciación sexual. En: Fisiología reproductiva de los animales domésticos. Rangel y Hernández (Eds). UNAM, México. 2018: 35 – 50.