



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"RELACION: DOSIS-EFECTO DE LA FURAZOLIDONA  
EN EL CONEJO. ACCION DE ESTA SOBRE LA  
ESPERMATOGENESIS, HISTOLOGIA Y  
CONDUCTA SEXUAL"**

**T E S I S**

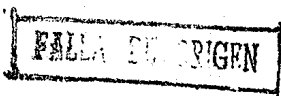
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A N :**

**MARIA ELENA CALDERON SEGURA**

**ALEJANDRA VAZQUEZ TRUJILLO**



**MEXICO, D. F.**

**NOVIEMBRE 1990**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

## INDICE

RESUMEN	
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES HISTORICOS.....	2
1. Nitrofuranos.....	2
1.0.Estructura química.....	2
1.1.Propiedades químicas.....	2
1.2.Propiedades fisicoquímicas.....	3
1.3.Metabolismo.....	3
1.4.Toxicidad.....	4
1.5.Mecanismo de acción.....	6
1.6.Importancia.....	6
2.0.Furazolidona.....	7
2.1.Estructura química.....	7
2.2.Propiedades fisicoquímicas.....	8
2.3.Metabolismo.....	8
2.4.Actividad antimicrobiana.....	9
2.5.Toxicidad.....	9
III. HIPOTESIS.....	14
IV. OBJETIVOS.....	14
V. MATERIAL Y METODO.....	15
1.Prueba de fertilidad I.....	15
2.Colecta de semen.....	16
3.Espermatobioscopia.....	16
4.Determinación de las concentraciones hormonales.....	18
5.Reducción de las reservas espermáticas.....	18
6.Determinación del consumo de alimento y peso corporal.....	18
7.Prueba de fertilidad II.....	19
8.Suspensión del medicamento.....	19
9.Orquitectomía unilateral.....	19
10.Recuperación.....	19
11.Prueba de fertilidad III.....	20
12.Condiciones de la descendencia.....	20
13.Estudio histológico.....	20
VI. RESULTADOS.....	21
1.0.Dosis de 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.....	21
1.1.Espermatobioscopia.....	21
1.1.1.Volumen del eyaculado.....	21
1.1.2.Motilidad Espermática.....	22
1.1.3.Densidad Espermática.....	23
1.1.4.Malformaciones Espermáticas.....	24
1.1.5.Mortalidad Espermática.....	25
1.2.Concentraciones Hormonales.....	26
1.2.1.Testosterona.....	26
1.2.2.Cortisol.....	26
1.3.Consumo de alimento.....	29
1.4.Peso Corporal.....	31
2.0.Dosis de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.....	33
2.1.Espermatobioscopia.....	33
2.1.1.Volumen del eyaculado.....	33
2.1.2.Motilidad Espermática.....	34
2.1.3.Densidad Espermática.....	36

2.1.4. Malformaciones Espermáticas.....	38
2.1.5. Mortalidad Espermática.....	43
2.2. Concentraciones Hormonales.....	45
2.2.1. Testosterona.....	45
2.2.2. Dihidrotestosterona.....	47
2.2.3. Androstendiona.....	49
2.3. Consumo de alimento.....	51
2.4. Peso Corporal.....	53
2.5. Conducta sexual.....	59
2.6. Condiciones de la descendencia.....	59
2.7. Estudio histológico.....	59
3.0. Dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal...	63
3.1. Espermatobioscopia.....	63
3.1.1. Volumen del eyaculado.....	63
3.1.2. Motilidad Espermática.....	64
3.1.3. Densidad Espermática.....	66
3.1.4. Malformaciones Espermáticas.....	68
3.1.5. Mortalidad Espermática.....	73
3.2. Concentraciones Hormonales.....	75
3.2.1. Testosterona.....	75
3.2.2. Dihidrotestosterona.....	77
3.2.3. Androstendiona.....	79
3.3. Consumo de alimento.....	81
3.4. Peso Corporal.....	83
3.5. Conducta sexual.....	92
3.6. Condiciones de la descendencia.....	92
3.7. Estudio histológico.....	92
VII. DISCUSION.....	95
VIII. CONCLUSIONES.....	100
IX. BIBLIOGRAFIA.....	101
X. ANEXO.....	107

#### RESUMEN:

Los estudios sobre anticoncepción masculina han revelado que existen diferentes sitios vulnerables a nivel de los cuales se puede incidir. Una de las propuestas más aceptadas ha sido la inhibición de la espermatogénesis en etapas tardías y en este sentido se han probado diferentes fármacos.

La furazolidona es un nitrofurano que posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana y que ha demostrado tener la capacidad de bloquear la espermatogénesis en etapas tardías.

Por ello se planteó la necesidad de encontrar la dosis a la cual este fármaco fuera capaz de inducir una oligospermia incompatible con la fertilidad, sin afectar la libido ni producir efectos colaterales. Para ello se probaron, utilizando como modelo animal al conejo, dosis diarias de 50 mg, y esquemas de tratamiento de 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

La administración diaria de 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal durante tres semanas provocó reacciones tóxicas en los animales tratados provocando la muerte del 75% de ellos.

Los esquemas de tratamiento de 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal fueron capaces de inducir una oligospermia incompatible con la fertilidad 8 y 9 meses (respectivamente) después de iniciado el tratamiento, provocando una disminución de la motilidad, y un incremento en la mortalidad y en las malformaciones espermáticas con reducción en el tamaño y peso testicular, parámetros que recuperaron sus valores normales 9 y 7 meses después de suspendido el tratamiento. Histológicamente se corroboró el bloqueo de la espermatogénesis a nivel de espermatozoides primarios y el restablecimiento de la espermatogénesis una vez suspendido el tratamiento. Los niveles de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona así como el consumo de alimento, peso corporal y conducta sexual de los conejos tratados no fueron alterados. El número y estructura macroscópica de la descendencia en el momento del nacimiento no fue afectada. Sólo un conejo tratado con la dosis de 10-20-40 mostró alteraciones histológicas a nivel de riñón.

## I. INTRODUCCION:

Hasta hace relativamente poco tiempo los estudios sobre anticoncepción y el uso de métodos anticonceptivos habían sido enfocados exclusivamente a la mujer.

En la actualidad se ha acelerado la investigación sobre anticoncepción masculina, pero los conocimientos que se tienen a la fecha sobre los procesos básicos de reproducción masculina son limitados, si se comparan con los que se tiene sobre la femenina.

Actualmente se están realizando gran cantidad de estudios tendientes a encontrar métodos anticonceptivos aplicables al hombre, éstos han revelado que existen varios sitios vulnerables a nivel de los cuales se puede incidir, como son: la regulación de los factores liberadores hipotalámicos y/o gonadotropinas, la retroalimentación esteroidea negativa, la espermatogénesis, la esteroidogénesis, la maduración espermática en el epidídimo, el transporte de los espermatozoides por los vasos deferentes y las características bioquímicas del plasma seminal. Sin embargo, existen varios problemas prácticos que se deben tomar en cuenta como son: la dificultad de separar la espermatogénesis y la producción de andrógenos, el largo período entre el inicio del tratamiento hasta lograr la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, los problemas de reversibilidad y restablecimiento de la fertilidad, la posibilidad de que se produzcan inicialmente espermatozoides anormales con la consecuente formación de descendientes con defectos y finalmente la falta de motivación del hombre para utilizar anticonceptivos.

En base a los estudios realizados se han elaborado 8 propuestas para trabajar sobre la anticoncepción masculina.- la inhibición del desarrollo de los espermatozoides testiculares, la inhibición preferencial de las células de Sertoli, la inhibición de la esteroidogénesis, la inhibición post-testicular de la maduración de los espermatozoides, la inhibición de enzimas espermáticas, la alteración de la composición del plasma seminal y la anticoncepción inmunológica (30).

Una de las propuestas más aceptadas ha sido la de la inhibición del desarrollo de los espermatozoides testiculares y sobre ésta se iniciaron los trabajos encaminados a encontrar un agente capaz de inhibir la espermatogénesis en etapas tardías, producir una infertilidad reversible, no afectar la libido y no producir efectos colaterales. Para ello se seleccionó a la Furazolidona, que es un agente antimicrobiano que pertenece al grupo de los nitrofuranos.

## II. ANTECEDENTES HISTORICOS:

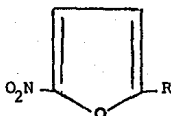
### 1. NITROFURANOS:

#### 1.0. Estructura Química:

Presentan una estructura química común, poseen un anillo heterocíclico con cuatro átomos de carbono y uno de oxígeno:



El furfural es el prototipo de varios derivados del furano, el cual es obtenido por deshidratación de azúcares (pentosas):



#### 1.1 Propiedades Químicas:

Los nitrofuranos son compuestos químicos sintéticos que comprenden una gran familia con propiedades biológicas bien definidas, especiales y de un valor biomédico considerable.

Desde el siglo XVIII, se tiene conocimiento de estos compuestos y desde hace más de cuatro décadas se usan como agentes antimicrobianos para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas tanto del hombre como de animales. Algunos (nitrofurazona, furadantina, furazolidona,) han sido utilizados como aditivos para alimentos de consumo animal en varias especies de importancia comercial como: cerdos, equinos, aves, bovinos, etc., y recientemente como preservadores de alimentos humanos (52 y 69).

La presencia del grupo nitro (-NO) en la posición 5 del anillo furano, determina la actividad antimicrobiana o bacteriostática de estos compuestos, siendo efectiva contra organismos Gram (+) y Gram (-), (54).

El efecto citotóxico-fisiológico y su uso clínico está determinado por el compuesto que se adicione en la posición 2 del anillo furano.

### 1.2 Propiedades Físicoquímicas:

En general, los nitrofuranos son compuestos poco solubles, con excepción del nitrofurfurilmetiléster, todos los demás nitrofuranos: nitrofurazona, nihidrazona, nitrofurantoína, furazolidona, furaltadona y nifuroxima; son ligeramente solubles en agua o aceites vegetales. La furazolidona, nihidrazona, furaltadona y nifuroxima, son más solubles en cloroformo que en agua, y la mayoría de los nitrofuranos son solubles en polietilenglicoles, dimetil-formamida y dimetilsulfóxido. En general los nitrofuranos son menos solubles en éter que en agua. (76).

Las soluciones acuosas son estables a pH fisiológico, pero la mayoría son completamente inestables a pH de 10 o más.

Generalmente, los nitrofuranos en solución diluida son fotosensibles y deben ser protegidos de la luz del día o de la luz fluorescente, (76).

Una de las propiedades fisicoquímicas de gran importancia en medicina, es la solubilidad ya que se ha observado que los compuestos menos solubles son eméticos a bajas concentraciones y la baja solubilidad de ciertos furanos (furazona) es ventajosa ya que administrados por vía oral pasan a través de la mayor parte del tracto digestivo sin absorberse y sin causar daño alguno (76).

### 1.3 Metabolismo:

Los nitrofuranos son activados y metabolizados por diversos tejidos de aves y mamíferos (excepto la sangre) y por los sistemas microbianos (8).

Se ha demostrado, tanto en aves como en mamíferos, que existe rápida conversión de los nitrofuranos ingeridos, a un número limitado de productos metabólicos, estructuralmente relacionados, de los cuales no todos han sido plenamente identificados, (50, 56 y 71).

La reducción del grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) es el paso inicial en la degradación metabólica de estos compuestos y el grado de reducción metabólica depende de varios factores de los cuales se incluye el complejo enzimático (nivel de nitro-reductasas) de cada uno de los tejidos y la tensión de oxígeno, (51 y 52).



Los productos de la reducción metabólica de los nitrofuranos, en mamíferos y sistemas microbianos pueden ser clasificados en base a su estructura química en:

- a) Nitrofuranos con radicales de anión libre.
- b) Derivados aminofuranos.
- c) Derivados con cadena abierta.
- d) Derivados pirroles.

Olive y Mc. Calla han demostrado en numerosos estudios "in vitro" que los nitrofuranos son altamente metabolizados en condiciones completamente anóxicas y han observado que las bajas tensiones de oxígeno o condiciones hipóxicas incrementan la toxicidad, siendo un reflejo del alto porcentaje de reducción metabólica de estos compuestos. Sin embargo otros estudios han reportado que algunos furanos (formamida, furaltadona, furilfuramida), son parcialmente reducidos a bajas concentraciones de oxígeno, mostrando un efecto mutagénico y tóxico bajo estas condiciones (8, 38, 42, 51, 52, 53 y 74).

Los órganos que metabolizan a los nitrofuranos a mayor velocidad experimentan mayores cambios morfológicos y metabólicos, siendo el caso del hígado, riñón y testículo, mientras que en el bazo, músculo y corazón, el índice metabólico es menor (11).

El tipo y cantidad de productos intermediarios y de metabolitos finales urinarios de la reducción metabólica, depende del furano y de su modo de descomposición química (53 y 69).

La excreción de los nitrofuranos varía de acuerdo al nitrofurano, a la dosis administrada y a la especie en que se determina. Los metabolitos finales son excretados a través de las vías urinarias y de las heces (10 y 54).

#### 1.4 Toxicidad:

La administración de los nitrofuranos particularmente en dosis altas produce ciertos efectos colaterales. Se ha sugerido que los productos intermediarios son tóxicos y son también los causantes del daño celular (efecto sobre el ADN, carcinogénesis, mutagénesis y muerte celular), (42, 45, 53, 69, 74, 77, 79 y 80).

Experimentos realizados con ingestión crónica de nitrofuranos han en ratas y ratones han sugerido que la actividad carcinogénica de los mismos depende de la sustitución química en la posición dos del anillo furano (76). Numerosas investigaciones han demostrado que algunos nitrofuranos son carcinogénicos en ratas y ratones (furilfuramida, nitrofurfuril, nitrofurantoina, furadaltona) o mutagénicos en células de mamíferos y sistemas microbianos in vitro (nitrovin, carofur, nitromidazola, nitrofurazona, nífurzida) (9, 17, 23, 43, 51, 68 y 73).

Otros estudios han demostrado que el DNA es el blanco de los nitrofuranos y la reducción metabólica o activación enzimática del grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) puede ser un prerrequisito para que ocurra el daño. Trabajos in vitro han demostrado este daño con inducción del rompimiento y mutación del DNA de Escherichia coli y Vibrio cholerae, en células de ratón y de hamster chino incubadas con nitrofurazona, nitrofurantoína y nifurpazina (51-53).

Los síntomas más prominentes de toxicidad son: una depresión en el crecimiento, émesis, signos neurológicos, aprensión, hiperirritabilidad, temblores, convulsiones, aspermia, cambios en las glándulas adrenales, náuseas, anorexia, pérdida de peso, ataxia, espasticidad, una interrupción temporal de espermatogénesis a nivel de espermatocito primario y muerte por paro respiratorio. Pudiendo presentarse varios de estos síntomas a la vez o en forma aislada, según el organismo del que se trate y del compuesto y dosis utilizada (76).

En cuanto a los efectos de los nitrofuranos sobre la morfología y función testicular, se tienen datos desde 1948 para el caso del hombre, en que se reportan terapias con nitrofurazona para el tratamiento de tumores malignos testiculares. Green y Friedgood, en 1948 (28), en un estudio de trasplante de sarcoma S-13 en ratón reportan que el furacín inhibe las enzimas bacterianas, involucradas en el metabolismo de la glucosa y el piruvato con muerte eventual de las células del tumor, mostrando además una degeneración celular con núcleo picnótico y una disminución de la actividad mitótica. Posteriormente se demostró que dicha acción es específica del epitelio germinativo testicular, siendo los tipos celulares más susceptibles los espermatoцитos secundarios, las espermátidas y los espermatozoides maduros, presentando los primeros una apariencia de células gigantes multinucleadas y las espermátidas con una coalescencia, (28 y 60).

A partir de entonces y gracias a dichos estudios, la nitrofurazona ha sido utilizada en la terapia contra tumores testiculares en el hombre, (24, 58, 60, 67 y 78).

En 1950, Friedgood y Green; Prior y Ferguson; y en 1961, Nelson y Patanelli, reportan que en la rata la espermatogénesis se detiene después de la administración de diferentes nitrofuranos (furadroxil, furacín, etc.), de igual manera se observa una marcada atrofia de los testículos al administrar oralmente la nitrofurazona, (24, 49 y 60). Nelson y Steinberger, lo confirman en 1952, y además demuestran que ocurre a nivel de espermatocito primario.

Nelson y Bunge, en 1957, reportaron que la furadantina, administrada oralmente al humano, a una dosis diaria de 10 mg/kg produce depresión temporal en la espermatogénesis, (2, 3 y 49).

Dokos y Timmermanns, en 1970, demostraron que ciertos nitrofuranos causan alteraciones metabólicas en espermatogonias y en la concentración enzimática del tejido intersticial, (2 y 3).

En los diferentes experimentos anteriormente mencionados, se encontró una pérdida de peso testicular, cambios degenerativos en la células de la estirpe germinal así como también un bloqueo de la espermatogénesis en la fase de espermatocito primario, observándose, al suspender el tratamiento, una recuperación parcial del tejido testicular, (48, 60, 76 y 82)

#### 1.5. Mecanismo de Acción:

No se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los nitrofuranos pero existen evidencias que indican que interfieren en un proceso metabólico esencial de las células microbianas, bloqueando la acción enzimática con un paso anaeróbico inicial en el metabolismo del piruvato, por lo tanto interfiriendo en la utilización de carbohidratos para los propósitos de energía o síntesis. Se ha encontrado también que los nitrofuranos debilitan la pared celular de las células bacterianas jóvenes provocando su elongación. Es a través de este doble mecanismo inhibitorio básico, que los nitrofuranos pueden obtener un amplio espectro antibacteriano y así suprimir el desarrollo de mutantes resistentes (76).

En estudios in vitro con Escherichia coli y Vibrio cholerae coincuradas con diferentes dosis de nitrofuranos (nitrofurantoina, nitrofurazona) se ha observado que éstos inhiben significativamente la oxidación del piruvato a acetil coenzima A, bajo condiciones anaerobias y a bajas concentraciones del medicamento o bien en condiciones aerobias y altas concentraciones del medicamento (66).

Las investigaciones realizadas para determinar el mecanismo de acción de los nitrofuranos sobre la dinámica de la espermatogénesis sugieren que se basa en su capacidad de interferir en la formación de acetil coenzima A a partir de piruvato en el proceso glucolítico dejando así a las células sin el aporte energético esencial para funciones como es el proceso meiótico (33).

#### 1.6. Importancia:

En la actualidad estos compuestos se han destacado por su amplia aplicación clínica, ya que la mayoría presentan respuestas terapéuticas similares y actividades biológicas que difieren entre sí.

La actividad antimicrobiana ha demostrado ser de amplio espectro, algunas de las bacterias más sensibles in vitro son: Aerobacter spp; Klebsiella spp; Clostridium spp; Corynebacterium spp; Diplococcus spp; Escherichia coli; Pasteurella spp; Proteus spp; Salmonella spp; Shigella spp; Staphylococcus spp y Vibrio spp (76).

La actividad protozoaricida es exclusiva de algunos compuestos, destacando por su marcado efecto la nitrofurazona, furazolidona, nihidrazona y furozima, siendo las especies más sensibles Eimeria spp; Hexamita spp y Trichomona spp (76).

Solo ciertos compuestos tienen una actividad antimicótica como son el nitrofurfuril-metil-éter que inhibe a los siguientes hongos: Microsporium aoudouini, M. canis, M. sypseum; Trichophyton mentagrophytes, T. schoenleini, T. rubrum, T. faviforme; Coccicoides inmitis y Candida albicans. La nifuroxima tiene acción contra Candida albicans, Trichophyton mentagrophytes, Microsporium canis y Neocardia asteroi y Trichophyton. schoenleini (76).

La alta susceptibilidad de un sin número de microorganismos a los nitrofuranos ha influido para aumentar paulatinamente su uso en la terapia moderna, siendo efectivos contra infecciones del tracto genitourinario y la piel en el hombre e incluso han sido utilizados en el tratamiento de infecciones del tracto urinario de mujeres embarazadas sin producir efecto alguno en la madre ni en el producto (39, 40 y 61).

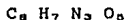
El uso de algunos furanos como agentes quimioterapéuticos data de 1948 en que se utilizó la nitrofurazona para el tratamiento de un tumor testicular maligno en el hombre. A partir de entonces han sido utilizados en el tratamiento de tumores testiculares metastásicos y primarios (24, 31, 58, 67 y 78).

Recientemente algunos estudios han reportado que ciertos nitrofuranos (nitrofurantoina, nitrofurazona), son excelentes radiosensibilizadores in vitro por lo que se ha sugerido que podrían utilizarse en la radioterapia del cancer humano (13, 14 y 63).

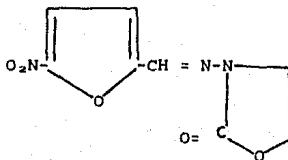
## 2.0. FURAZOLIDONA:

### 2.1 Estructura Química:

La furazolidona, 3-(-5-nitrofurfuriladenoamina)-2-oxazolidona, de fórmula condensada:



y desarrollada:



## 2.2. Propiedades Fisicoquímicas:

La furazolidona con un peso molecular de 225.26, es un polvo amarillo que inicialmente no tiene sabor, pero que después es amargo, es prácticamente insoluble en aceites vegetales y etanol, soluble en agua a pH de 6.0, ligeramente soluble en polietilenglicoles y solventes orgánicos.

## 2.3. Metabolismo:

Es pobremente absorbida a través del tracto gastrointestinal, membranas mucosas y piel intacta, pero la absorción puede ser mayor suspendiendo este compuesto en aceite u otro solvente orgánico (54).

La furazolidona es metabolizada por los tejidos a diferente velocidad, el hígado, riñón y testículo tienen un alto índice metabólico, mientras que en el músculo, bazo y corazón, el índice es menor y en el cerebro es de cero. Los testículos son órganos que metabolizan a este compuesto en forma considerable a altas concentraciones y su exposición prolongada produce lesiones serias en éstos (54).

La velocidad de degradación de la furazolidona es aproximadamente de 100 mg/kg de tejido por hora y la biotransformación es a los 30 minutos (34, 54, 56, y 71).

Se ha demostrado por análisis cromatográfico que después de una sola dosis, los metabolitos de la furazolidona son eliminados por las vías urinarias doce horas después de su administración (72).

Tatsumi, et al. (1984), describieron las posibles vías de degradación de la furazolidona "in vivo" e identificaron algunos de los numerosos metabolitos urinarios, después de 4 días de administrar una dosis de 100 mg/kg de peso a ratas machos (69).

Por análisis cromatográfico identificarán los metabolitos 1, 2, 3 y 4, como sigue:

Metabolito 1: Derivado ciano con cadena abierta, 3-(4-ciano-2-oxobutilidenoamina)-2-oxazolidona.

Metabolito 2: Acetomidofurano.

Metabolito 3: 3-(4-carboxi-2-oxobutilidenoamina)-2-oxazolidona.

Metabolito 4: Acido  $\alpha$ -cetoglutárico.

Estos representan solamente el 25% de todos los metabolitos finales de la reducción de la furazolidona. En el conejo sólo se ha podido identificar el metabolito 1 en muestras de orina (4 y 7).

#### 2.4. Actividad Antimicrobiana:

La furazolidona es uno de los pocos nitrofuranos que tienen una aplicación efectiva en medicina humana y veterinaria. Por su amplio espectro antimicrobiano y por ejercer una potente acción bacteriostática, bactericida y protozoaricida, es común encontrarla agregada como complemento a los alimentos preparados para la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales tales como salmonelosis, coccidiasis, neumonías, hexamatiasis, giardiasis, histomoniasis, diarreas, enteritis, leptosporosis, tifoidea, paratifoidea, pulorosis hepática, enfermedades respiratorias crónicas, keratoconjuntivitis, etc., (10, 11, 37, 52, 54 y 66); que son las que más mortalidad y pérdidas ocasionan en aves y cerdos (76). En el humano es utilizada para combatir la shigelosis, la giardiasis, la tricomoniasis en la mujer, (12, 26, 39 y 44); y para infecciones de la uretra en el hombre (40).

#### 2.5. Toxicidad:

Omer, en 1978, al estudiar la toxicidad de la furazolidona suspendida en agua y administrada durante un mes a ratones a una dosis de 100-4000 mg/kg de peso corporal (LD<sub>50</sub> 2086 mg/kg); palomas a una dosis de 500-4000 mg/kg de peso corporal (LD<sub>50</sub> 2375 mg/kg) y a conejos a una dosis de 500-3000 mg/kg de peso corporal (LD<sub>50</sub> 2125 mg/kg); encontró algunas reacciones adversas como: anorexia, diarrea, ataxia, depresión y disnea (54).

Otros estudios han demostrado en varias especies animales efectos citotóxicos y farmacológicos de la furazolidona entre las cuales se incluye la inhibición de la actividad de la mono y diamina oxidasa en gallinas, ratas y en el humano. El efecto mutagénico *in vitro* en *E. coli* WP2, *Salmonella tiphymorium* TA100 y *Drosophyla* spp así como la inducción de tumores en ratas (68 y 69).

En relación al efecto que tiene la furazolidona sobre diferentes órganos, se sabe que la dosis terapéutica de furazolidona, administrada en el alimento de algunas aves (pollos, patos y pavos), produce alteraciones en el corazón, consistente en una marcada dilatación ventricular, con posterior distensión del corazón y por lo tanto un incremento en el tamaño de éste, siendo mayor en el ventrículo izquierdo; alteraciones que son características de la enfermedad del corazón redondo. Asimismo, se ha reportado que a concentraciones de 700 ppm de furazolidona, se produce una cardiomiopatía y cardiomegalia. Se ha encontrado

además un efecto significativo sobre el metabolismo del glucógeno miocárdial aumentando su contenido a concentraciones mayores de 300 ppm, retornando a sus niveles normales una vez suspendida la administración del compuesto (18, 19, 20, 29, 59, 75 y 81).

Plamm, et al.(1957), reportaron que a una dosis diaria de 500 mg/kg de peso corporal, la furazolidona administrada oralmente a ratas, reduce la cantidad de catecolaminas en la médula adrenal en aproximadamente un 30% (57).

En 1970 Raychandhuri, Chatterjee y Maiti reportaron que una dosis diaria de 0.5 mg/ml de furazolidona inhibe la síntesis de DNA y estimula la síntesis de RNA y proteínas en Vibrio cholerae. Investigaciones in vitro han demostrado que la furazolidona inhibe preferentemente la síntesis de ADN e induce mutación y desnaturalización irreversible del ADN en células de Escherichia coli y V. cholerae (61), siendo mayor la frecuencia de mutación a concentraciones altas. Cohen y Sagi, en 1979, confirmaron este daño encontrando además que es un potente inhibidor mitótico e induce intercambio entre cromátidas hermanas y que tiene un efecto clastogénico sobre linfocitos periféricos humanos in vitro (16).

En 1971, Sidorov y Lüders, H., reportaron que en los pollos la furazolidona administrada en el alimento a una concentración de 0.04% peso/peso durante una semana o 0.01% peso/peso durante tres semanas; produce un incremento de corticosterona en el plasma (65).

Satoru, et al. (1977), reportan que dosis de 400, 700 y 1000 ppm de furazolidona administradas durante 2 meses a ratas hembras y machos, provocan en las primeras una atrofia muy marcada del ovario con degeneración celular de la capa granular del folículo de von Graff así como una destrucción y condensación nuclear; mientras que en el estómago tanto de hembras como de machos se observó atrofia muy marcada con desnaturalización y disminución del número de células de la mucosa gástrica, siendo los daños más severos con las dosis de 700 y 1000 ppm de furazolidona (64).

Koeda et al.(1977) reportaron que a dosis de 200 a 1000 ppm de furazolidona administrada a cobayos hembras y machos, provoca efectos similares a los reportados por Satoru sobre estómago y ovario, demostrando además cambios muy marcados en glándulas adrenales con disminución en menos de un tercio del tamaño normal y atrofia de la corteza adrenal (64).

Ali, en 1983, reporta que a una dosis de 0.04% de furazolidona peso/peso en el alimento, durante 10 días, se produce en los pollos y cerdos un incremento en el peso de la glándula adrenal y de la tiroides; el incremento en la glándula adrenal representa probablemente una hipertrofia en la corteza, produciendo una pequeña reducción en la concentración de colesterol en las adrenales (4 - 6).

En un estudio realizado por Ali y Khogali en 1984, acerca de los cambios histológicos y en el plasma en pollos tratados con furazolidona, en donde examinaron los constituyentes del plasma y la estructura del hígado, corazón, riñón, cerebro y cerebelo; después de administrar la dosis terapéutica de 0.04% peso/peso de furazolidona durante 10 días o una dosis de 40 mg/kg durante 5 días se encontró que no producen cambios significativos en la morfología de los órganos estudiados ni en el plasma, pero a dosis de 0.08 mg/kg durante 5 días, la furazolidona produce una disminución significativa en las concentraciones totales de proteínas y de colesterol, y una tendencia a incrementar la actividad de la colinesterasa. En el plasma se incrementó la concentración de potasio y disminuyó la de sodio. Histológicamente, el hígado mostró congestión, edema y hemorragias fuertes; el corazón mostró congestión de vasos sanguíneos y alguna degeneración del miocardio; se observó atrofia del cerebelo y degeneración de algunas células de Purkinje y en los riñones, congestión e hipoplasia glomerular (7).

En cuanto al efecto de la furazolidona sobre la morfología y función testicular, se tiene reportado lo siguiente:

Paul, et al. (1953-1954), observaron un decremento en el tamaño de los testículos de ratas alimentadas con 0.01% de furazolidona durante dos semanas (55 y 56).

Satoru, et al. (1977), en ratas y Koeda et al., (1977), en cobayos; reportaron que a dosis de 400, 700 y 1000 ppm de furazolidona, el tamaño de los testículos de ratas disminuyó, observándose hipoplasia extrema del testículo, no se encontraron ni espermatozoides ni espermatoцитos, solo unas cuantas espermatogonias en los túbulos seminíferos (64).

En 1982, Hernández, J.P., et al., reportaron en un estudio ultraestructural del testículo de gallos, después del tratamiento con furazolidona a dosis de 0.011% durante 2 meses y 0.022% durante 15 días agregado en el alimento, un retardo de la espermatogénesis, quedando detenida en la fase de paquitena del espermatoцитo primario, presentando las espermatogonias y espermatoцитos formación de vacuolas en la membrana nuclear y condensación irregular de la cromatina, con áreas de desorganización de los organelos citoplásmicos, tales como las mitocondrias, el tamaño de las crestas y barbillas no fue alterados por el medicamento (32).

Ali y Khogali, (1984), demostraron que a dosis de 0.08% peso/peso, 40 y 80 mg de furazolidona por kilogramo de peso corporal incluida en la dieta de gallos durante cinco días, disminuye el peso de los testículos y el tamaño de las crestas y barbillas, produciendo además una reducción en la concentración de testosterona y atrofia muy marcada de los túbulos seminíferos (33).



En un estudio realizado por Zermeño, en 1984b, se reporta el efecto de diferentes dosis de la furazolidona sobre el testículo de aves, observando una reducción significativa del tamaño y peso testicular así como una disminución en el número de células germinales de los testículos de las aves tratadas con dosis mayores de 0.04% durante 35 días (85).

Hernández, J.P., et al., (1985), demostraron que a concentraciones de 0.03% y 0.04% administradas a ratones machos durante un mes, se produce un retardo en la maduración de la espermatogénesis, quedando detenida en la fase de paquítena del espermatozoides primario, produciéndose alteraciones morfológicas en las espermatogonias y espermatozoides, como son modificación de la membrana nuclear, desorganización de la cromatina, destrucción del núcleo, presencia de vacuolas y desorganización de las mitocondrias. A una dosis de 0.06% administrada durante 15 días se observó una disminución del peso de los testículos con cambios severos en los túbulos seminíferos, afectando la fertilidad de los machos. El análisis de los niveles hormonales demostró que las concentraciones de dihidrotestosterona aumentaron en forma no significativa y la concentración de androstendiona disminuyó significativamente, siendo estos cambios reversibles después de un mes de suspendida la furazolidona (33).

En ese mismo año, Zamaro realizó un estudio en gallos para analizar el efecto de la furazolidona a diferentes dosis (0.01, 0.02, 0.04 y 0.13%) sobre el volumen eyaculado, la morfología, la motilidad y la concentración de los espermatozoides, en donde se reporta que no hubo diferencia significativa en el volumen eyaculado ni disminución de la motilidad. La concentración espermática disminuyó en forma significativa, aumentando significativamente el porcentaje de anomalías espermáticas en todos los grupos con respecto al control. El efecto observado se inició al treceavo día de tratamiento y posteriormente se probó la capacidad de fertilización de gallos tratados con diferentes concentraciones (100, 200, 400 y 800 ppm) de furazolidona encontrándose que la concentración de 800 ppm produjo un notable decremento en la cantidad de huevo fértil y peso del mismo a partir de la segunda y cuarta semana de tratamiento respectivamente (83).

Zamaro, et al., en 1985, trabajando con gallos semipesados, reportaron que a 0.022% de furazolidona incluida en la dieta, produce una reducción de la motilidad y concentración espermática. A 0.04% de furazolidona hay un aumento en el porcentaje de espermatozoides anormales en el eyaculado a partir del tercer día. A 0.01% y 0.02% estas malformaciones espermáticas aparecen a los trece días de tratamiento (83).

En un estudio previo realizado en conejos machos Nueva Zelanda para determinar el efecto de la furazolidona sobre la morfología y función testicular administrando una dosis de 50 mg de furazolidona /kg de peso corporal por vía oral y suspendida en aceite vegetal, se reportó la inducción de oligospermia incompatible con la fertilidad siendo ésta reversible una vez suspendido el medicamento. La oligospermia se logró a los seis

meses de tratamiento observándose atrofia testicular, disminución en la densidad, motilidad y viabilidad espermática. La principal anomalía espermática fue la persistencia de la gota citoplásmica a nivel del segmento intermedio. En el testículo, las células de Leydig se encontraron normales en cuanto a número y estructura. El estudio sérico reveló que los niveles de androstendiona, testosterona y dihidrotestosterona se mantuvieron normales. Después de un período de tres meses y habiéndose suspendido la administración del medicamento, los conejos se recuperaron totalmente, lo que se comprobó mediante una prueba de fertilidad. Es importante hacer notar que durante todo el experimento los animales no manifestaron ningún cambio en la conducta sexual y el número y estructura macroscópica de sus descendientes en el momento del nacimiento fue normal.

Sin embargo los tiempos tanto de tratamiento para lograr la oligospermia como de recuperación eran demasiado largos para los fines de anticoncepción y restablecimiento de la fertilidad por lo que se debían plantear experimentos piloto que condujeran a encontrar la dosis que redujeran estos tiempos sin producir efectos colaterales

### III. HIPOTESIS:

La furazolidona a una dosis diaria de 50 mg y con esquemas de tratamiento de 10- 20-40 y 30-45 mg/kg de peso corporal, suspendida en metil celulosa al 0.5%, inducen en el conejo, sin provocar efectos colaterales, una oligospermia incompatible con la fertilidad, siendo ésta reversible al suspender la administración del medicamento.

### IV. OBJETIVOS:

- 1.- Inducir oligospermia incompatible con la fertilidad, administrando una dosis diaria de 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal y esquemas de tratamiento de 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal, utilizando como vehículo metil celulosa al 0.5%.
- 2.- Determinar el efecto de la furazolidona sobre el volumen, densidad, motilidad y viabilidad de los espermatozoides en el eyaculado.
- 3.- Analizar la estructura de los espermatozoides antes, durante y después de suspendido el tratamiento con furazolidona.
- 4.- Evaluar los niveles séricos de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona antes, durante y después de la administración de la furazolidona.
- 5.- Determinar el efecto de la furazolidona sobre el consumo de alimento y el peso corporal.
- 6.- Demostrar la infertilidad de los animales oligospermicos mediante una prueba de fertilidad.
- 7.- Demostrar la reversibilidad del efecto de la furazolidona después de la suspensión del tratamiento, mediante la recuperación de la cuenta espermática normal, motilidad y viabilidad de los espermatozoides en el eyaculado y su capacidad fecundante por medio de una prueba de fertilidad.
- 8.- Determinar el efecto de la furazolidona sobre la estructura histológica del testículo, riñón, hígado, estómago, intestino y glándulas adrenales.
- 9.- Determinar el efecto de la furazolidona sobre la conducta sexual de los organismos durante la administración de la misma.
- 10.- Demostrar que el tratamiento con furazolidona no afecta el número y estructura macroscópica de la descendencia.

## V. MATERIAL Y METODOS:

17 conejos machos de la raza Nueva Zelanda, de aproximadamente nueve meses de edad y cuatro kilogramos de peso corporal, sexualmente maduros y de fertilidad comprobada; se alojaron en jaulas individuales en condiciones de bioterio con temperatura controlada, luz alternada y con agua y alimento ad libitum.

### 1. Prueba de Fertilidad I:

Antes de iniciar el experimento a todos los conejos se les hizo una prueba de fertilidad, mediante la monta efectiva de hembras fértiles a las que previamente se les indujo el estro con inyección intramuscular de 0.01 ml de estrógenos B-E<sub>2</sub>, durante tres días consecutivos. Se les permitió una doble monta y se corroboró que fuera positiva mediante frotis vaginales. Una vez comprobada la fertilidad (con productos vivos) de todos los conejos, se formaron cinco grupos:

- Grupo I. Testigo A. (T) Dos conejos a los que se les mantuvo en las condiciones antes mencionadas, y se les administró 1 ml de agua por vía oral a través de una sonda (de un diámetro de 2.4 mm y de una longitud de 5 cm) hasta lograr la oligospermia de los conejos experimentales.
- Grupo II. Testigo M. (T) Dos conejos a los que se les administró 1.0 ml de metil celulosa al 0.5% por vía oral a través de una sonda hasta lograr la oligospermia de los conejos experimentales.
- Grupo III. Experimental 1. (E) Siete conejos machos a los que se les administró diariamente y en forma continua 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal, suspendida en un ml de metil celulosa al 0.5% por vía oral a través de una sonda hasta lograr la oligospermia.
- Grupo IV. Experimental 2. (E) Tres conejos machos a los que se les administró diariamente 10 mg de furazolidona/kg de peso corporal, suspendida en 1.0 ml de metil celulosa al 0.5% por vía oral, a través de una sonda durante tres meses y medio, seguida de una dosis diaria de 20 mg de furazolidona/kg de peso corporal durante dos meses. Al término de éstos, la dosis se aumentó a 40 mg de furazolidona/kg de peso corporal y se continuó hasta lograr la oligospermia.

Grupo V. Experimental 3. (E) Tres conejos machos a los que se les administró 30 mg de furazolidona/kg de peso corporal, suspendida en 1.0 ml de metil celulosa al 0.5% por vía oral a través de una sonda y de acuerdo al siguiente esquema: ocho días continuos de administración del medicamento, seguidos por cinco días de descanso, durante tres meses y medio, al término de éstos, la administración fue continua y diaria por dos meses, después de lo cual la dosis se aumentó a 45 mg de furazolidona/kg de peso corporal hasta lograr la oligospermia.

## 2. Colecta de semen

La muestra de semen de todos los animales fue obtenida por medio de una vagina artificial adaptada para conejos (fig. 1), cuya cámara circular (a) se lleno de agua caliente para crear una presión y temperatura semejante a la que existe en la vagina de la hembra, el extremo anterior (b) se recubrió con un poco de glicerina con el fin de facilitar la penetración del pene. Con un termómetro se tomó la temperatura interna de la vagina que debía oscilar entre 42-45 grados centígrados (c).

La obtención del semen se realizó utilizando una hembra como cebo, desviando el pene hacia la vagina artificial en el momento de la monta. Una vez obtenida la muestra se realizó la espermatobioscopia.

## 3. Espermatobioscopia:

- 1.- Volumen.- se determinó midiéndolo directamente en el tubo colector graduado integrado a la vagina artificial.
- 2.- Motilidad espermática.- se colocó una gota de semen eyaculado sobre una laminilla precalentada para permitir que los espermatozoides permanecieran viables durante un mayor tiempo. Sobre la muestra se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio de luz con un objetivo de 40X, se analizaron varios campos y se determinó el porcentaje de espermatozoides con movimiento en cada muestra de eyaculado.
- 3.- Densidad espermática.- se hizo una dilución 1:10 con ázida de sodio al 0.2%, del semen eyaculado realizando el conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer (ver anexo). Cada determinación se hizo por duplicado, se promedió y multiplicó por el factor de dilución (500 000); obteniéndose así la concentración espermática por ml de eyaculado para cada organismo.

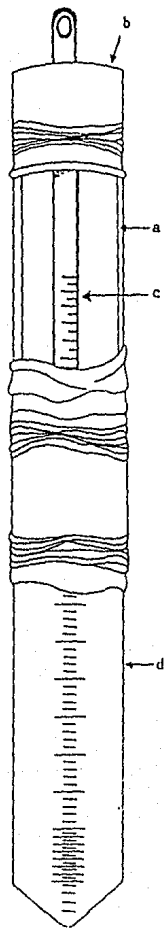


Figura 1. Esquema de la vagina artificial adaptada para conejo; a) cámara circular, b) extremo anterior del tubo látex, c) termómetro, d) tubo-colector graduado.

4.- Porcentaje de anomalías espermáticas.- se realizaron frotis en fresco, teñidos con eosina-nigrosina, de cada laminilla tomada al azar se contaron un mínimo de 100 células con un contador manual (Laboratory Counter), y se determinó el tipo y frecuencia de anomalías de los espermatozoides.

5.- Porcentaje de mortalidad espermática.- en los frotis teñidos con eosina-nigrosina se contaron 100 células y se determinó el número de espermatozoides muertos (teñidos).

#### 4. Determinación de las concentraciones hormonales:

Antes de iniciar el tratamiento, y con el objeto de determinar los valores basales de testosterona y cortisol para el grupo de 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal y de testosterona, androstendiona y dihidrotestosterona para los grupos de 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal y de sus respectivos testigos se tomaron muestras de 3 ml de sangre de la arteria media de la oreja de todos los conejos. Una vez iniciado el tratamiento y después de suspendido, se tomaron muestras cada quince días. La sangre obtenida se centrifugó a 900 rpm, durante 10 minutos, se separó el suero y almacenó a -20°C. para posteriormente determinar las concentraciones hormonales por medio de la técnica de radioinmunoensayo.

#### 5. Reducción de las Reservas Espermáticas:

Aproximadamente a los 15 días del inicio del tratamiento se sometió a todos los conejos de los grupos experimentales 2 y 3 a un régimen de eyaculación diaria con el fin de agotar las reservas espermáticas del epidídimo y conductos eyaculadores.

Esto se hizo con el objeto de asegurar que las anomalías y/o alteraciones en las densidades espermáticas se debían enteramente al efecto de la furazolidona. El vaciado se llevó a cabo durante mes y medio y el semen eyaculado fue colectado en vaginas artificiales analizándolo una vez por semana con el fin de verificar la disminución en la cuenta espermática.

#### 6. Determinación del Consumo de Alimento y Peso Corporal:

A todos los animales se les mantuvo con una dieta balanceada comercial "conejina" de Purina, antes, durante y después del tratamiento con furazolidona, registrando el consumo de alimento cada tercer día, para lo cual se utilizó una balanza granataria con capacidad de un kilogramo. El peso corporal fue registrado una vez por semana antes, durante y después de la administración de la furazolidona, utilizando una balanza electrotécnica médica (ELME) con capacidad de 10 kilogramos.

#### 7. Prueba de Fertilidad II:

Una vez lograda la oligospermia de los conejos de los grupos experimentales, se realizó una prueba de fertilidad con el fin de comprobar la infertilidad de los animales tratados y la fertilidad de los testigos. Para ello se utilizaron hembras de fertilidad comprobada a las que previamente se les indujo el estro por medio de la inyección intramuscular con 0.01 ml de estrógenos (B-E<sub>2</sub>), durante tres días consecutivos.

#### 8. Suspensión del Medicamento:

Demostrada la infertilidad de los animales tratados de los grupos experimentales y la fertilidad de los organismos controles, se suspendió la administración del medicamento, la del agua y la de metil celulosa.

#### 9. Orquitectomía Unilateral:

Se efectuó una orquitectomía unilateral a todos los animales de los grupos experimentales y testigos para lo cual fueron anestesiados con 1 mg de droperidol/kg de peso corporal, 20 mg de ketalar/kg de peso corporal y 10-15 mg de Pentobarbital/kg de peso corporal intravenosamente. Los testículos se fijaron inmediatamente en formol al 10% y posteriormente fueron pesados y medidos. Se procesaron con la técnica histológica convencional y se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes de 7 micras y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las laminillas fueron analizadas al microscopio de luz para determinar el grado de maduración espermática.

#### 10. Recuperación:

Tres semanas después de suspendido el tratamiento a todos los animales se les hizo nuevamente el estudio serológico y la espermatobioscopia repitiendo el análisis cada tres semanas hasta verificar que los niveles de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona, así como la cuenta espermática, la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides alcanzaran los niveles normales.



### 11. Prueba de Fertilidad III:

Una vez recuperada la cuenta espermática normal, se realizó una prueba de fertilidad utilizando para ello hembras maduras de fertilidad comprobada, a las que previamente se les indujo el estro por medio de la inyección intramuscular con 0.01 ml de estrógenos (B-E<sub>2</sub>), durante tres días consecutivos; la monta doble efectiva se verificó por medio de frotis vaginales.

### 12. Condiciones de la descendencia:

Una vez transcurrido el tiempo de gestación (de 30-32 días) se determinó el número de productos y su estructura macroscópica, dentro de las 24 horas posteriores a su nacimiento.

### 13. Estudio Histológico:

Comprobada la fertilidad y determinada la condición de las crías se procedió a realizar el sacrificio de todos los machos por electroshock e inmediatamente se disectaron tomando muestras de hígado, riñón, glándulas adrenales, estómago, intestino, y testículo, el cual fue pesado y medido.

Todos los órganos se fijaron en formol al 10% para procesarlos con la técnica histológica convencional, teniendo los cortes de 7 micras con hematoxilina-eosina.

Los cortes de testículo de todos los conejos se analizaron microscópicamente para determinar las condiciones del testículo y el grado de diferenciación espermática.

Los cortes de hígado, riñón, glándulas adrenales, estómago y intestino fueron analizados con el fin de determinar posibles cambios estructurales.

## VI. RESULTADOS:

### 1.0.DOSIS DE 50 mg DE FURAZOLIDONA/KG DE PESO CORPORAL.

La administración de ésta dosis produjo en los conejos anorexia con una disminución en el peso corporal que aunado a la depresión general del organismo, a la pérdida de sensibilidad sin respuesta motora y a la postración total culminaron con la muerte del 75% de los conejos a las 3 semanas de tratamiento. Al resto de los conejos experimentales se les suspendió inmediatamente el tratamiento.

#### 1.1.Espermatobioscopia.

##### 1.1.1.Volumen.

La tabla I muestra el volumen (ml) del eyaculado de los conejos antes (b1-b3) y durante (A) el tratamiento. Se puede observar que en la única toma que se pudo hacer, el volumen del eyaculado de los conejos tratados (12, 14 y 22) es en promedio de 0.766 ml que comparado con el de 0.8 ml de los testigos no muestra ninguna diferencia y se encuentra dentro del rango normal reportado por otros autores (29).

m \ O <sup>m</sup>	10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E	24T	25T
b1	1.5	1.0	1.5	2.0	1.5	1.2	2.0	1.0	1.0
b2	1.0	0.5	3.0	0.8	1.2	1.2	1.0	2.0	0.5
b3	2.0	0.5	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	1.3
A	†	0.3	1.5	††	†	†	0.5	0.4	0.4
		†	†	††			††		

Tabla I. Volumen del eyaculado (ml) de los conejos con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

m muestra  
 O<sup>m</sup> organismo  
 † muertos  
 † sacrificados  
 ††

### 1.1.2.Motilidad Espermática.

La tabla II muestran el porcentaje de espermatozoides con motilidad en los eyaculados de los conejos ántes (b1-b3) y durante (A) el tratamiento. El porcentaje promedio de espermatozoides móviles es de 85 en los animales testigos y de 76.66 en los tratados, porcentaje que se encuentra dentro del rango normal.

m \ O <sup>a</sup>	10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E	24T	25T
b1	90	75	80	75	90	90	50	70	10
b2	75	70	85	80	70	0	90	60	85
b3	0	80	90	85	85	40	90	85	70
A	†	75	85	††	†	†	70	80	90
		†	†				††		

Tabla II. Porcentaje de motilidad espermática con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

m muestra  
 O<sup>a</sup> organismo  
 † muerto  
 †† sacrificado

### 1.1.3. Densidad Espermática.

La tabla III, muestra los valores de la densidad espermática (No. de espermatozoides/ ml x 10<sup>6</sup>) Antes (b1-b3) y durante (A) el tratamiento pudiéndose observar que sólo el conejo 22 presenta un brusco descenso en la cuenta espermática. No se pudo demostrar la infertilidad debido a las condiciones generales de los organismos que provocaron su muerte.

m \ O <sup>o</sup>	10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E	24T	25T
b1	390,500	310,875	325,625	218,875	364,125	190,125	348,275	206,000	222,750
b2	315,625	325,250	340,000	250,875	308,275	750,000	346,250	364,000	411,500
b3	9,000	340,125	336,000	319,500	322,750	-	385,375	465,000	514,000
A	†	273,000	350,000	††	†	†	126,000	575,000	193,000

Tabla III. Densidad espermática (No. de espermatozoides/ml)\* con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

\* expresado x 10<sup>6</sup>  
 - no hubo muestra  
 m muestra  
 O<sup>o</sup> organismo  
 † muerto  
 †† sacrificado

#### 1.1.4. Malformaciones Espermáticas.

La tabla IV muestra el porcentaje de malformaciones que se presentan en los eyaculados de los conejos tratados (12, 14 y 22) y los testigos (24 y 25), conservándose dicho porcentaje dentro del rango normal. Al hacer el estudio cualitativo se encontró que las principales malformaciones fueron cabezas y flagelos sueltos, flagelos sueltos, espermatozoides con el flagelo totalmente enrollado, espermatozoides con gota citoplásmica en la base de la cabeza, espermatozoides con gota citoplásmica en el segmento intermedio y espermatozoides con gota citoplásmica en la porción terminal del flagelo.

m \ σ <sup>v</sup>	10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E	24T	25T
b1	4	4	16	2	2	7	5	8	3
b2	2	2	10	4	1	4	3	12	10
b3	6	3	6	4	4	4	3	10	6
A	†	5 †	6 †	††	†	†	4 ††	9	1

Tabla IV. Porcentaje de malformaciones espermáticas con 50 mg de furazolidona /kg de peso corporal.

m muestra  
 σ<sup>v</sup> organismo  
 † muerto  
 †† sacrificado

### 1.1.5. Mortalidad Espermática.

En la tabla V, se observa el porcentaje de espermatozoides muertos en los eyaculados de los animales tratados (12, 14 y 22) y los testigos (24 y 25). En los conejos testigos el porcentaje promedio de espermatozoides muertos es de 3 y en los experimentales es de 10.66, valores que se encuentran dentro del rango normal reportado.

m \ O <sup>o</sup>	10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E	24T	25T
b1	3	7	8	7	2	10	2	3	3
b2	10	18	8	4	2	2	5	5	2
b3	4	5	5	1	0	9	4	3	6
A	†	14	14	††	†	†	4	1	5
		†	†				††		

Tabla V. Porcentaje de mortalidad espermática con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

m muestra

O<sup>o</sup> organismo

† muerto

†† sacrificado

## 1.2. Concentraciones Hormonales.

### 1.2.1. Testosterona.

En la tabla VI, gráfica 1 muestran los niveles de testosterona en las muestras de suero sanguíneo (ng de testosterona/ml) de los animales tratados 10, 12, 14, 18, 19, 21 y 22 antes (b1-b3) y durante (A) el tratamiento. Se observa claramente una brusca disminución en los niveles de testosterona durante el tratamiento.

m \ O'	10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E
b1	4.25	4.30	4.81	4.21	3.96	4.09	5.05
b2	4.15	5.02	3.95	3.86	4.45	4.82	4.90
b3	3.98	3.90	3.63	3.72	3.50	4.06	3.58
A	0.118	0.140	0.350	0.170	0.150	0.390	0.400
	†	†	††	†	†	†	††

Tabla VI. Concentración de testosterona (ng/ml de suero sanguíneo) con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

m muestra  
O' organismo  
† muerto  
†† sacrificado

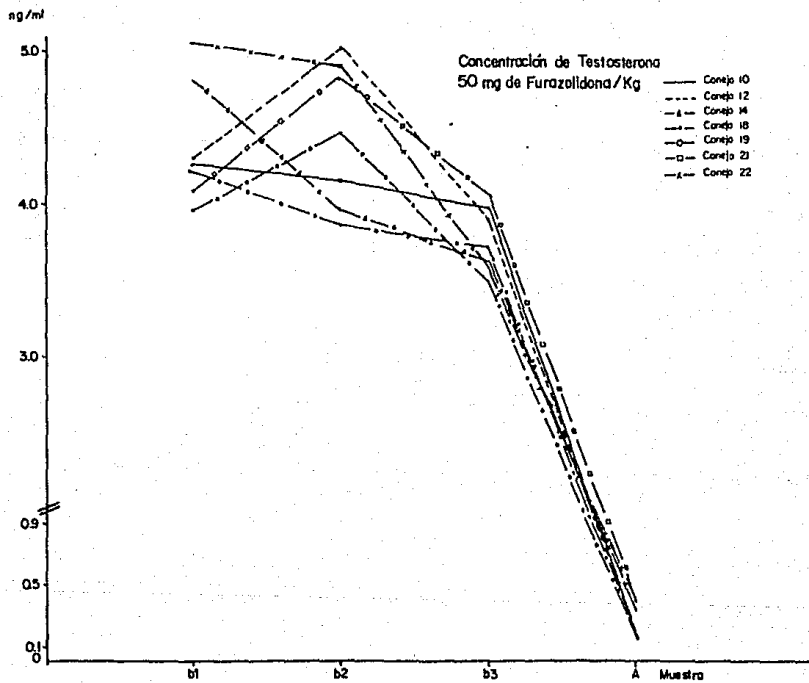
### 1.2.2. Cortisol.

La tabla VII, gráfica 2 muestran los valores de cortisol en las muestras de suero sanguíneo (ng de cortisol/ml de suero) de los conejos experimentales 10, 12, 14, 18, 19, 21 y 22 antes (b1-b3) y durante (A) el tratamiento. Se observa que en los conejos experimentales los niveles de cortisol disminuyeron drásticamente durante el tratamiento.

m \ O'	10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E
b1	325	356	413	427	351	395	359
b2	412	324	354	352	326	316	351
b3	317	322	334	376	334	357	362
A	12	17	21	12	15	18	11
	†	†	†	††	†	†	††

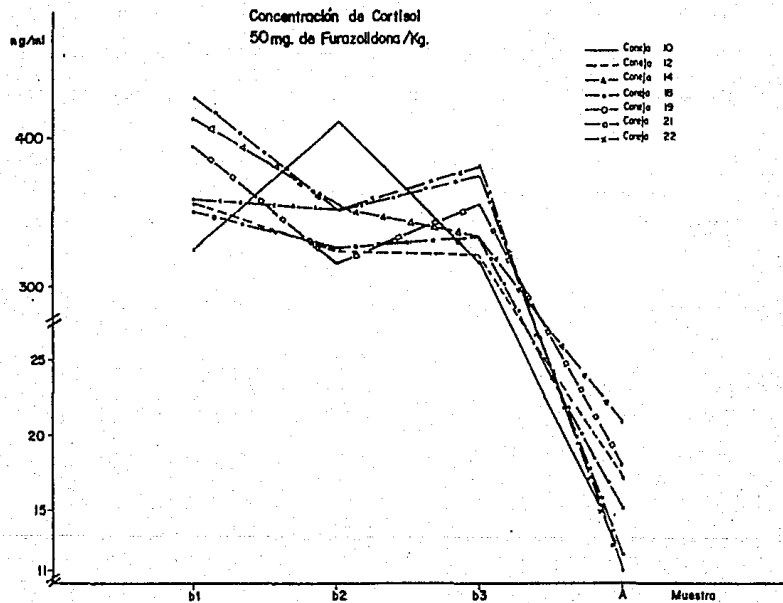
Tabla VII. Concentración de cortisol (ng/ml de suero sanguíneo) con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

m muestra  
O' organismo  
† muerto  
†† sacrificado



Gráfica 1. Concentración de testosterona (ng/ml)





Gráfica 2. Concentración de cortisol (ng/ml)

### 1.3. Consumo de Alimento.

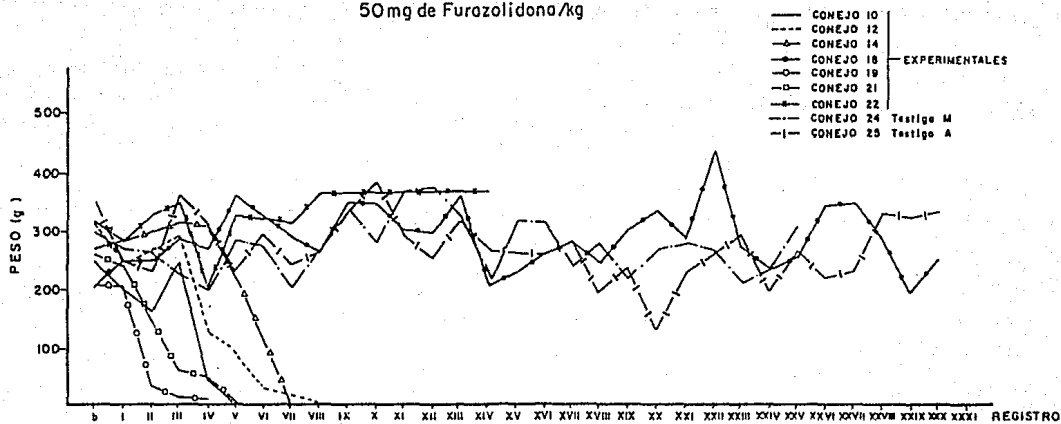
La tabla VIII, gráfica 3 muestra la cantidad de alimento (g) ingerido por los conejos ántes (b), durante (I-V) y después (VI-XXX) de suspendido el tratamiento con furazolidona. Se observa claramente una brusca disminución en la cantidad de alimento ingerido por los organismos experimentales durante la administración del medicamento. Los registros se realizaron cada tercer día.

R \ O <sup>o</sup>	10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E	24T	25T
b	252	319	320	205	208	274	278	300	350
I	203	242	282	246	205	242	282	274	253
II	161	269	300	254	037	147	330	268	231
III	248	298	315	293	019	063	349	226	363
IV	045	126	312	214	011	052	208	201	312
V	000	096	226	367	†	000	334	289	232
VI	000	034	119	332		†	325	278	298
VII	†	020	002	290			316	206	241
VIII		000	002	267			366	273	272
IX		†	†	251			371	342	332
X				351			371	288	385
XI				309			371	373	299
XII				300			371	377	258
XIII				360			371	327	320
XIV				209			371	222	273
XV				234			††	323	265
XVI				267				321	260
XVII				288				241	288
XVIII				249				280	195
XIX				305				220	241
XX				341				274	132
XXI				292				306	233
XXII				441				271	265
XXIII				281				218	299
XXIV				235				236	202
XXV				263				310	274
XXVI				345				††	226
XXVII				350					237
XXVIII				298					337
XXIX				195					328
XXX				256					339
				††					††

Tabla VIII Consumo de alimento (g) con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

R registro  
 † muerto  
 †† sacrificado  
 O organismo

CONSUMO DE ALIMENTO  
50mg de Furazolidona/kg



Gráfica 3. Consumo de alimento (g)

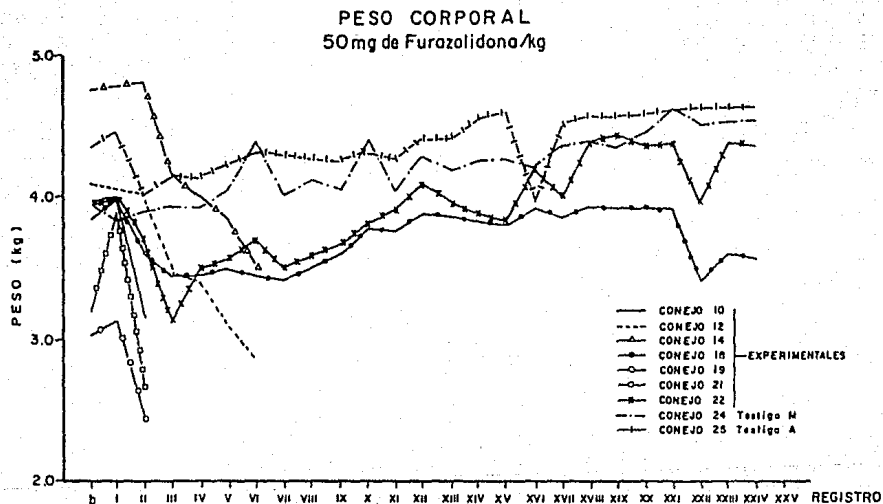
#### 1.4. Peso Corporal.

La tabla IX, gráfica 4 muestran los pesos corporales (kg) de los conejos antes (b), durante (A) y después del tratamiento (C-X). Cada registro se hizo una vez a la semana. Coincidente con la disminución de la ingestión del alimento, se observa un descenso del peso corporal de los conejos 10, 12, 14, 19 y 21 que son los conejos que mueren durante el tratamiento.

R	G <sup>o</sup>									
		10E	12E	14E	18E	19E	21E	22E	24T	25T
	b	3.972	4.089	4.762	3.851	3.029	3.205	3.941	3.960	4.360
I		4.000	4.060	4.775	3.975	3.120	3.875	4.000	3.825	4.450
II		3.125	4.025	4.800	3.610	2.450	2.700	3.700	3.900	4.025
III		†	3.460	4.150	3.450	†	†	3.125	3.935	4.150
IV			3.400	4.000	3.450			3.500	3.935	4.130
V			3.100	3.750	3.500			3.560	4.050	4.235
VI			2.875	3.525	3.450			3.700	4.200	4.325
VII			†		3.425			3.510	4.010	4.300
VIII				†	3.510			3.580	4.120	4.280
IX					3.600			3.675	4.065	4.255
X					3.780			3.830	4.220	4.325
XI					3.775			3.910	4.050	4.275
XII					3.880			4.100	4.300	4.420
XIII					3.860			3.975	4.200	4.420
XIV					3.825			2.875	4.250	4.450
XV					3.800			3.825	4.255	4.460
XVI					3.925			4.200	4.200	3.950
XVII					3.850			4.000	4.360	4.505
XVIII					3.920			4.390	4.380	4.575
XIX					3.925			4.435	4.360	4.560
XX					3.915			4.350	4.450	4.575
XXI					3.910			4.360	4.635	4.595
XXII					3.400			3.950	4.500	4.625
XXIII					3.600			4.380	4.520	4.625
XXIV					3.575			4.355	4.525	4.630

Tabla IX. Pesos corporales (Kg) con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

muerto  
R registro  
G<sup>o</sup> organismo



Gráfica 4. Peso corporal (kg)

2.0.DOSIS DE 10-20-40 mg DE FURAZOLIDONA/KG DE PESO CORPORAL

2.1. Espermatobioscopia.

Las muestras b1 a la H se tomaron cada 15 días, de la I a la N cada 3 semanas y de la O a la T cada mes.

2.1.1.Volumen.

La tabla X muestra el volumen del eyaculado de los conejos experimentales 16, 17 y 26 y de los testigos 20 y 23 ántes (b1-b2), durante (A-M) y después ((N-S) del tratamiento; se observa claramente que no hay cambios en el volumen, conservándose dentro de los valores normales durante todo el experimento. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos.

m \ O <sup>a</sup>	16E	17E	26E	20T	23T
b1	1.5	1.8	1.5	0.5	1.25
b2	1.0	2.5	2.0	0.4	0.4
A	1.0	0.6	1.5	0.75	1.0
B	1.0	0.5	0.4	0.5	0.5
C	1.0	2.0	1.5	0.5	0.5
D	1.5	3.5	0.8	1.0	0.5
E	2.0	1.75	2.0	0.5	1.0
F	1.0	4.0	1.75	1.0	1.0
G	1.0	0.5	1.0	0.7	0.7
H	1.0	1.5	3.0	1.0	0.7
I	0.5	↑↑	1.0	0.5	1.0
J	0.5		0.5	0.5	0.5
K	1.0		0.5	0.75	1.0
L	1.5		1.5	0.5	0.5
M	1.75		1.0	0.5	1.0
N	1.0		↑↑↑	-	0.5
O	0.75			1.0	1.0
P	0.7			0.5	1.0
Q	1.0			0.5	0.5
R				0.5	1.0
S				0.5	1.0

Tabla X. Volumen del eyaculado (ml) con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

- no hubo muestra

m muestra

O<sup>a</sup> organismo

↑↑ sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

↑↑↑ sacrificado en la oligospermia

### 2.1.2. Motilidad Espermiática.

La tabla XI, gráfica 5 muestran el porcentaje de espermatozoides móviles ántes (b1-b2), durante (A-M) y después (N-S) del tratamiento, pudiéndose observar claramente una disminución en la motilidad de los espermatozoides de los conejos 16 y 26 a los 8 meses (M) de tratamiento lo cual coincide con el logro de la oligospermia. La motilidad normal se recupera 3 meses (O) después de suspendido el tratamiento. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos.

m \ O <sup>o</sup>	16E	17E	26E	20T	23T
b1	70	85	80	60	90
b2	25	10	80	60	70
A	70	70	70	80	85
B	70	60	50	80	90
C	80	10	30	70	90
D	40	50	50	60	90
E	90	80	60	75	90
F	80	40	70	70	90
G	80	50	70	70	85
H	60	70	60	60	80
I	50	††	75	75	75
J	30		30	80	85
K	90		30	70	90
L	15		10	70	85
M	10		10	75	85
N	10		†††	-	40
O	70			75	90
P	90			80	75
Q	85			80	90
R	85			90	90
S				75	90
T				80	90

Tabla XI. Porcentaje de motilidad espermiática con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

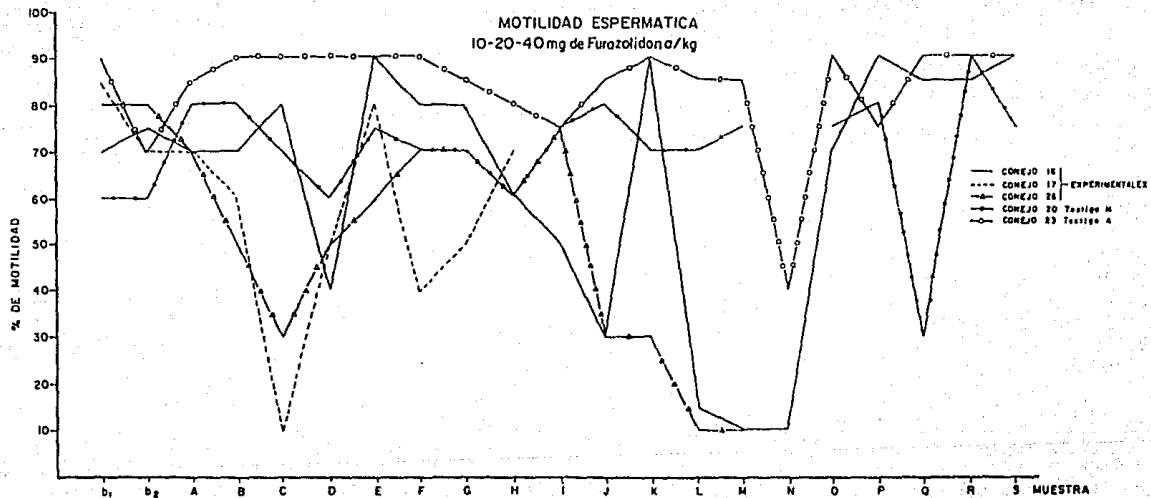
- no hubo muestra

m muestra

O<sup>o</sup> organismo

†† sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

††† sacrificado en oligospermia



Gráfica 5. Porcentaje de motilidad espermática



### 2.1.3. Densidad Espermática.

En la tabla XII, gráfica 6 se presentan los valores de densidad espermática (No. de espermatozoides/ml  $\times 10^6$ ) ántes (b1-b2), durante (A-M) y después (N-S) del tratamiento. Se observa una disminución en la cuenta espermática 8 meses después (M) de iniciado el tratamiento, fecha en que se logra la oligospermia y se realiza la prueba de fertilidad. Posterior a la suspensión del tratamiento y a la orquitectomía unilateral, la cuenta espermática recupera sus valores normales a los 3 meses (O). En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos.

m	O*	16E	17E	26E	20T	23T
	b1	328,375	334,500	354,750	299,166	448,500
	b2	132,500	145,250	111,500	205,436	436,000
	A	42,625	129,125	81,875	200,302	488,500
	B	147,750	188,500	148,250	120,000	192,000
	C	177,250	125,750	27,125	173,875	215,500
	D	361,500	163,125	106,500	128,750	343,500
	E	256,000	221,625	66,875	296,250	344,000
	F	244,250	93,500	58,125	298,150	488,500
	G	314,625	256,125	277,000	216,500	432,375
	H	508,125	††	625,250	270,125	314,000
	I	470,375		280,000	308,125	434,625
	J	305,500		217,500	367,000	493,750
	K	338,625		123,875	328,375	395,125
	L	115,250		71,250	220,350	466,375
	M	50,950		30,000	320,000	444,000
	N	238,500		-	-	450,625
	O	338,750		†††	257,050	444,000
	P	362,875			200,750	450,625
	Q	237,825			259,000	344,875
	R	389,500			254,000	374,750
	S	370,250			315,125	302,500

Tabla XII. Densidad espermática (No. de espermatozoides/ml)\* de los conejos tratados con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

\* expresado como  $10^6$

- no hubo muestra

m muestra

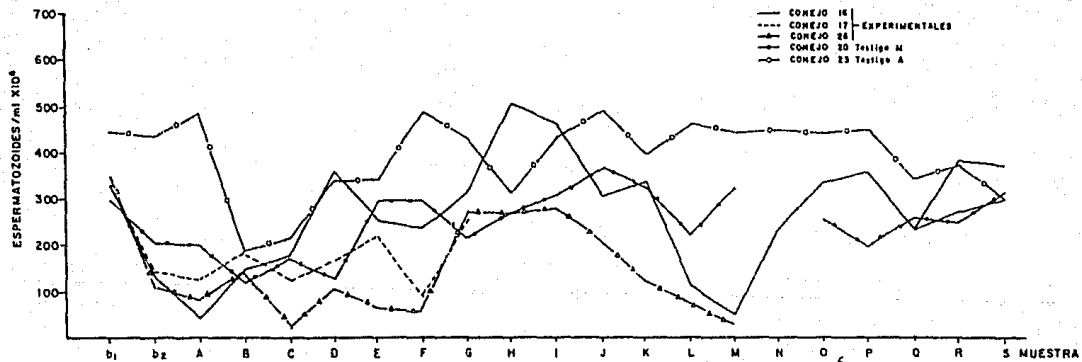
O\* organismo

†† sacrificado 4 meses después del tratamiento

††† sacrificado en el momento de la oligospermia

†††

DENSIDAD ESPERMÁTICA  
10-20-40 mg de Furazolidona/kg



Gráfica 6. Densidad espermática (no. de espermatozoides/ml x 10<sup>6</sup>)

#### 2.1.4. Malformaciones Espermáticas.

En la tabla XIII, gráfica 7 están expresados los porcentajes de malformaciones espermáticas determinadas en las muestras de eyaculado de los conejos ántes (b1-b2), durante (A-M) y después (N-S) de suspendido el tratamiento, pudiéndose observar un incremento 8 meses (M) después de iniciado el tratamiento, coincidente con la oligospermia, recuperando sus valores normales 6 meses (Q) después de suspendido el tratamiento. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos. Al realizar el estudio cualitativo de los tipos de malformaciones se encontró que las más frecuentes fueron los espermatozoides con el flagelo totalmente enrollado (37.5%), espermatozoides con la gota citoplásmica en el segmento intermedio (parte inferior) (28.57), espermatozoides con el flagelo parcialmente enrollado (21.4%), cabezas sueltas (7.1%) espermatozoides con la gota citoplásmica en el segmento intermedio (parte superior) (3.57%), espermatozoides con doble flagelo (3.57%). Micrografías 1 y 2

m \ O <sup>o</sup>	16E	17E	26E	20T	23T
b1	2	4	3	6	5
b2	8	5	6	7	6
A	4	5	20	4	10
B	6	13	8	3	4
C	4	2	11	0	3
D	3	1	5	9	1
E	4	15	18	0	6
F	5	12	12	3	2
G	4	8	1	3	2
H	3	4	10	9	4
I	10	††	15	4	8
J	5		27	5	11
K	18		39	5	7
L	47		59	5	3
M	52		79	8	4
N	22		†††	-	6
O	17			3	3
P	12			3	4
Q	8			6	6
R	3			7	6
S				3	6
T				8	5

Tabla XIII. Porcentaje de malformaciones espermáticas con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

- no hubo muestra

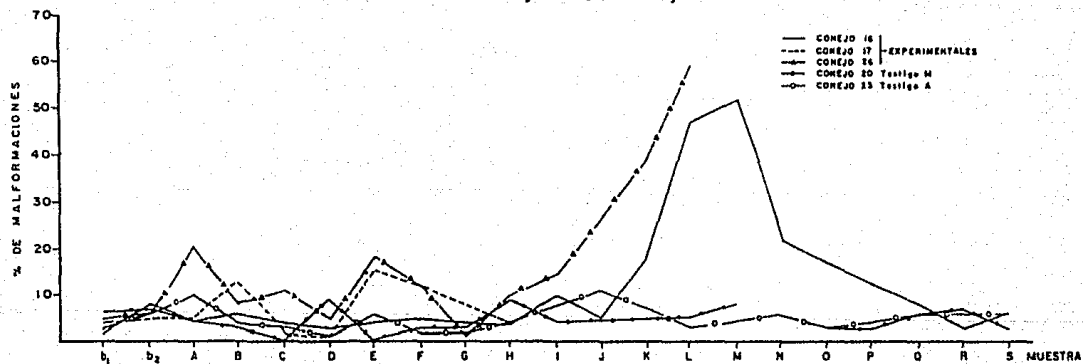
m muestra

O<sup>o</sup> organismo

†† sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

††† sacrificado en la oligospermia

MALFORMACIONES ESPERMATICAS  
10-20-40 mg de Furazolidona/kg



Gráfica 7. Porcentaje de malformaciones espermáticas

## Micrografías 1-2

Muestran los diferentes tipos de malformaciones presentes en los eyaculados de los conejos 16-17 y 26 tratados con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

fs - flagelo suelto

fe - flagelo enrollado

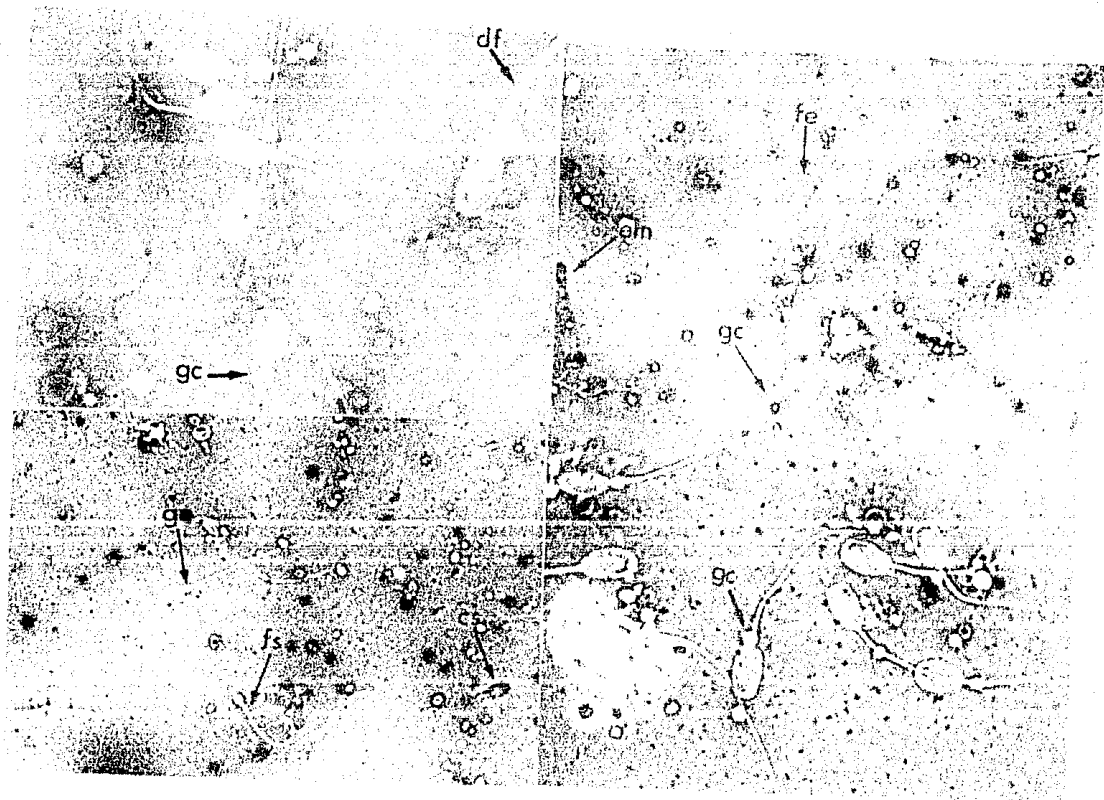
em - espermatozoide muerto

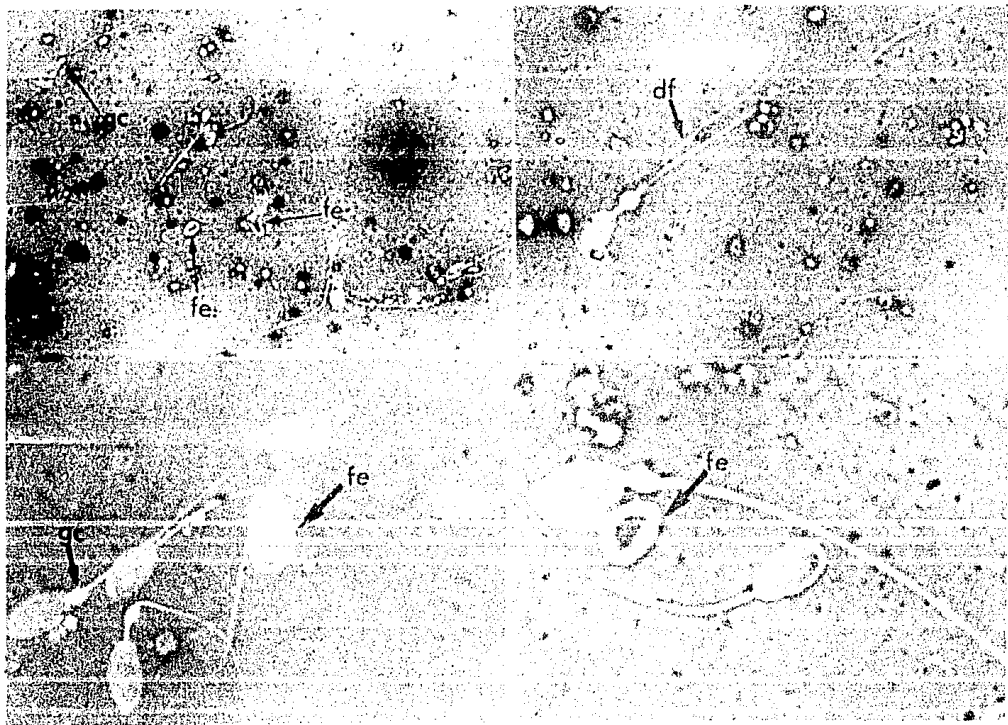
gc - góta citoplásmica

cs - cabeza suelta

df - doble flagelo

Micrografia 1





### 2.1.5. Mortalidad Espermática.

La tabla XIV, gráfica 8 muestran el porcentaje de espermatozoides muertos en las muestras de los eyaculados. Se observa un incremento de espermatozoides muertos (56.5% en promedio) a los 8 meses (M) de tratamiento, coincidiendo con la oligospermia, 5 meses (P) después de suspendido el tratamiento el porcentaje de mortalidad disminuyó hasta llegar a los niveles normales como se observa en el conejo 16. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos.

m \ ♂	16E	17E	26E	20T	23T
b1	4	6	4	1	4
b2	11	8	4	3	11
A	4	15	0	0	4
B	3	3	1	6	6
C	9	6	5	2	11
D	6	16	4	6	6
E	2	3	2	2	5
F	4	11	3	8	6
G	6	5	6	1	5
H	12	10	7	9	11
I	13	††	1	1	5
J	14	††	34	6	10
K	24		49	3	9
L	28		55	5	4
M	48		65	2	2
N	36		†††	-	6
O	19		†††	6	0
P	5			3	4
Q	3			6	6
R	6			3	5
S				6	4
T				5	4

Tabla XIV. Mortalidad espermática con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

- no hubo muestra

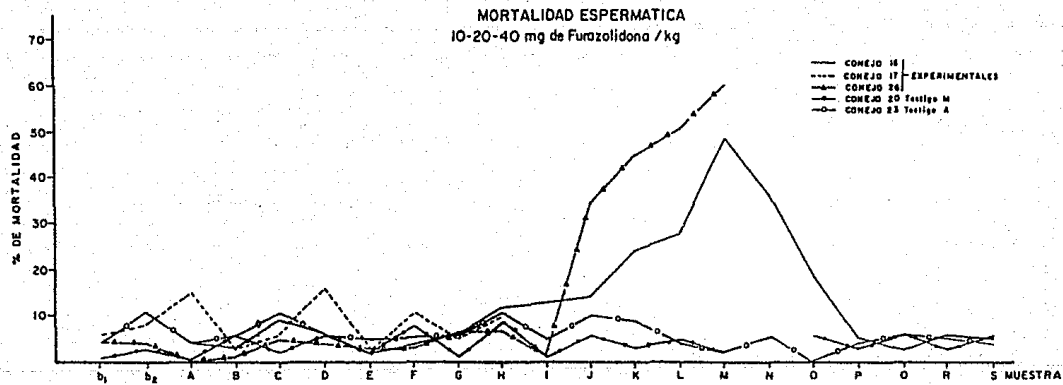
m muestra

♂ organismo

†† sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

††† sacrificado en la oligospermia





Gráfica 8. Porcentaje de mortalidad espermática

## 2.2. Concentraciones Hormonales.

### 2.2.1. Testosterona.

La tabla XVII, gráfica 9 muestran los niveles de testosterona (ng de testosterona/ml de suero) de los conejos experimentales 16, 17 y 26 y de los testigos 20 y 23 ántes (b), durante (A-H) y después (N-S) de suspendido el tratamiento. Se observa que los niveles de testosterona no sufren cambios a lo largo de todo el experimento.

m \ O <sup>o</sup>	16E	17E	26E	20T	23T
b	-	-	-	4.36	3.95
A	4.56	3.85	4.12	-	3.85
B	4.25	-	4.10	-	4.25
C	4.30	3.96	4.31	4.15	4.50
D	4.15	3.80	3.95	4.36	4.35
E	4.36	3.70	3.70	4.54	4.70
F	4.00	3.90	4.00	4.50	4.15
G	4.50	3.65	4.15	4.35	4.36
H	4.55	3.70	3.85	4.56	4.56
I	4.35	4.10	3.95	4.70	4.50
J	4.50	3.80	4.20	4.50	-
K	4.15		4.51	-	-
L	4.35	††	4.35	-	-
M	4.00		4.20	-	-
N	4.00		-	-	-
O	4.25		†††	-	-
P	3.95			4.15	4.15
Q	3.90			4.20	4.20
R	4.10			4.20	4.20
S	4.25			-	4.20

Tabla XVII. Concentración de Testosterona (ng/ml de suero sanguíneo) con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

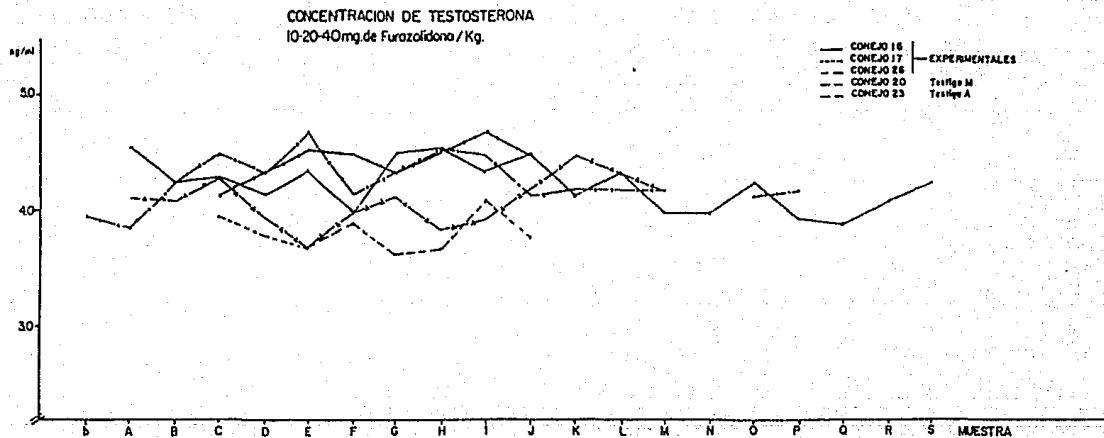
- no fue suficiente muestra

m muestra

O<sup>o</sup> organismo

†† sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

††† sacrificado en el momento de la oligospermia



Gráfica 9. Concentración de testosterona (ng/ml)

### 2.2.2. Dihidrotestosterona.

En la tabla XVI, gráfica 10 se presentan los niveles de dihidrotestosterona (ng de dihidrotestosterona/ml de suero) de los conejos experimentales 16, 17 y 26 y de los testigos 20 y 23 ántes (b), durante (A-M) y después (N-S) del tratamiento. Se observa claramente que los niveles de dihidrotestosterona se conservan dentro de los valores normales durante todo el experimento.

m \ o <sup>o</sup>	16E	17E	26E	20T	23T
b	-	-	-	0.380	-
A	0.390	0.395	0.400	-	0.395
B	0.400	-	0.385	-	0.415
C	0.410	0.395	0.390	0.375	0.425
D	0.395	0.390	0.380	0.390	0.400
E	0.395	0.380	0.395	0.380	0.385
F	0.400	0.375	0.410	0.360	0.390
G	0.395	0.365	0.415	0.400	0.400
H	0.390	0.350	0.395	0.390	0.415
I	0.395	0.370	0.420	0.410	-
J	0.410	0.380	0.415	0.400	-
K	0.415	††	0.380	-	-
L	0.423	††	0.380	0.395	-
M	0.405		0.395	0.390	-
N	0.410		0.370	-	-
O	0.430		0.380	0.400	-
P	0.410		†††	0.360	0.415
Q	0.430		†††	0.380	0.375
R	0.400			0.400	0.400
S	0.395			-	0.415

Tabl XVI. Concentración de Dihidrotestosterona (ng/ml de suero sanguíneo) con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

- no fue suficiente muestra

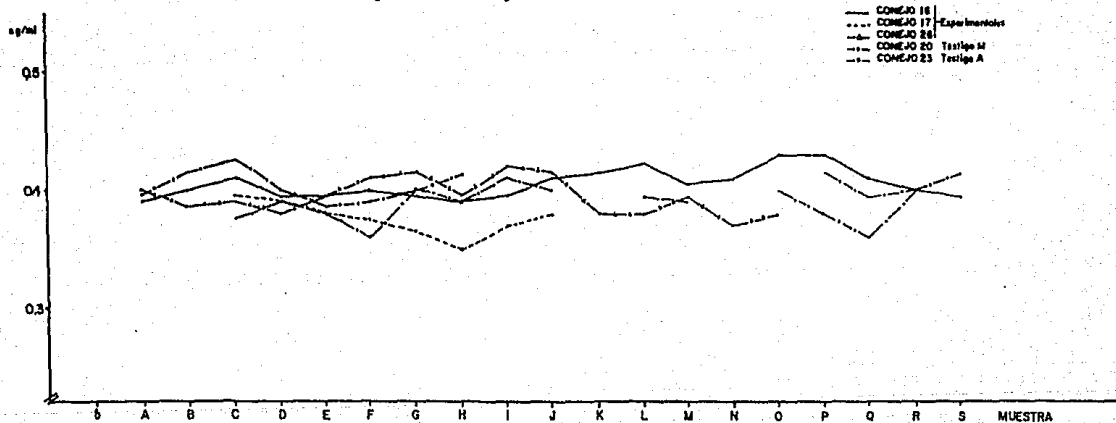
m muestra

o<sup>o</sup> organismo

†† sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

††† sacrificado en el momento de la oligospermia

CONCENTRACION DE DIHIDROTESTOSTERONA  
10-20-40mg de Furazolidona/Kg



Gráfica 10. Concentración de dihidrotéstosterona (ng/ml)

### 2.2.3. Androstendiona.

La tabla XV, gráfica 11 muestran los niveles de androstendiona (ng de androstendiona/ml de suero) de los conejos experimentales 16, 17 y 26 y de los testigos 20 y 23 antes (b), durante (A-M) y después (N-S) de suspendido el tratamiento. Se observa que los niveles de androstendiona no sufren ningún cambio a lo largo de todo el experimento conservándose dentro de los valores normales.

m \ O <sup>a</sup>	16E	17E	26E	20T	23T
b	-	-	-	0.980	0.980
A	0.870	0.750	0.915	-	0.990
B	0.815	-	0.890	-	1.050
C	0.720	0.725	0.855	1.000	0.950
D	0.835	0.795	0.870	0.950	0.915
E	0.825	0.810	0.915	0.970	0.925
F	0.710	0.790	0.925	0.960	0.950
G	0.725	0.810	0.875	0.925	0.930
H	0.810	0.810	0.915	0.955	0.950
I	0.855	0.795	0.980	0.915	0.950
J	0.850	0.780	0.870	0.910	-
K	0.830		0.920	-	-
L	0.855	††	0.910	0.859	-
M	0.870		0.925	0.875	-
N	0.860		-	-	-
O	0.825		†††	0.890	-
P	0.860			0.910	0.910
Q	0.875			0.875	0.925
R	0.900			0.890	0.900
S	0.850			-	0.930

Tabla XV. Concentración de androstendiona (ng/ml de suero sanguíneo) con una dosis ascendentes de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

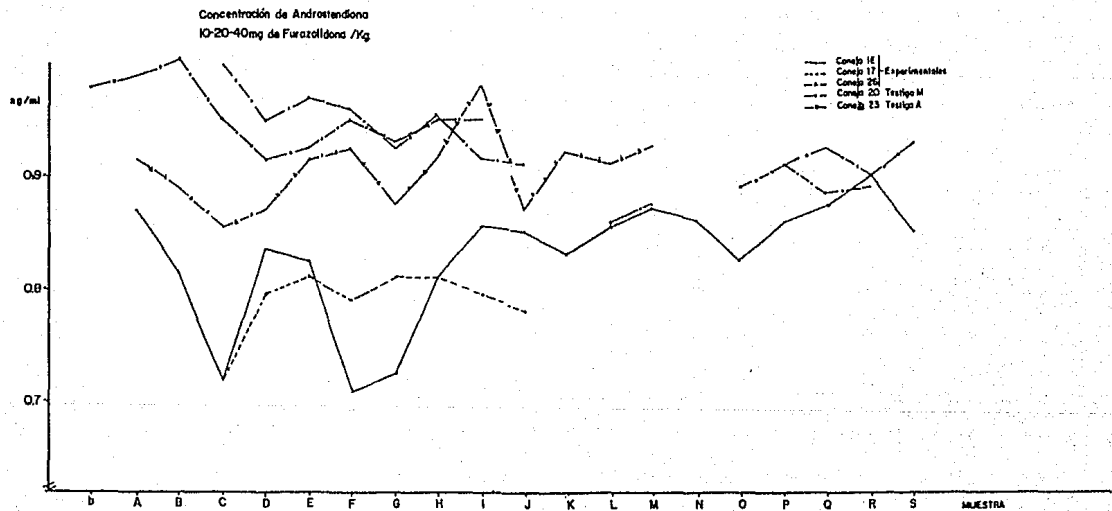
- no fue suficiente muestra

m muestra

O<sup>a</sup> organismo

†† sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

††† sacrificado en el momento de la oligospermia



Gráfica 11. Concentración de androstendiona (ng/ml)

### 2.3. Consumo de Alimento.

En la tabla XVIII, gráfica 12 se observa la cantidad de alimento (g) ingerido por los conejos durante todo el experimento. Se puede notar que el consumo del alimento no fue afectado en los conejos 16 y 26. El conejo 17 presentó una disminución en el consumo de alimento 5 meses después (XIV) de iniciado el tratamiento, deteriorándose rápidamente sus condiciones generales motivo por el cual se sacrificó. Cada registro es el promedio de alimento ingerido en 15 días.

R \ O <sup>o</sup>	16E	17E	26E	20T	23T
b	315	162	252	201	239
I	269	200	171	558	284
II	283	194	246	353	227
III	259	334	189	276	214
IV	357	357	201	275	348
V	360	384	202	165	211
VI	278	242	235	305	306
VII	341	297	428	246	270
VIII	342	220	248	216	253
IX	291	267	259	218	231
X	290	148	190	226	231
XI	269	19	202	237	247
XII	254	0	273	279	233
XIII	268	0	268	220	215
XIV	308	††	237	294	203
XV	244	††	217	322	321
XVI	303		†††	388	318
XVII	302		†††	297	333
XVIII	426			328	336
XIX	399			284	319
XX	366			368	428
XXI	501			320	342
XXII	442			263	258
XXIII	373			271	366
XXIV	217			316	221
XXV	399			311	287
XXVI	375			129	273
XXVII	311			259	232
XXVIII	368			312	241
XXIX	358			350	295
XXX	328			183	117
XXXI	299			190	120

Tabla XVIII. Consumo de alimento (g) con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

R registro

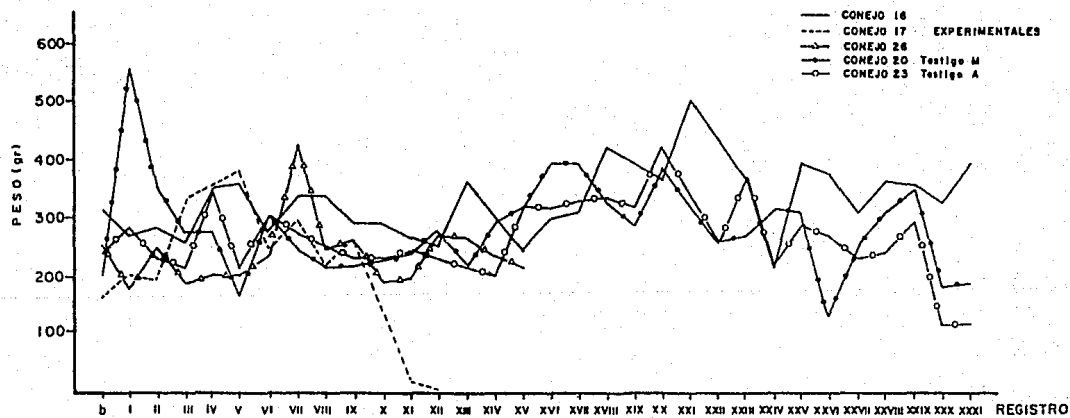
O<sup>o</sup> organismo

†† sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

††† sacrificado en la oligospermia



CONSUMO DE ALIMENTO  
10-20-40 de Furazolidona/kg



Gráfica 12. Consumo de alimento (g)

## 2.4. Peso Corporal.

La tabla XIX, gráfica 13 muestran los pesos corporales (kg) de los conejos ántes (b), durante (A-M) y después (N-S) de suspendido el tratamiento pudiéndose observar que los pesos de todos los conejos se encuentran dentro del rango normal durante todo el experimento, estos datos concuerdan con los obtenidos para el consumo de alimento (excepto para el conejo 17. Cada registro se hizo por semana.

R \ O <sup>o</sup>	16E	17E	26E	20T	23T
b	4.050	3.980	3.675	3.925	4.250
I	4.000	3.680	3.550	3.650	4.125
II	4.050	3.815	3.625	3.935	4.210
III	4.045	3.805	3.525	3.830	4.200
IV	4.160	3.785	3.625	3.605	4.200
V	4.265	4.015	3.650	3.780	4.255
VI	4.250	3.975	3.535	3.950	4.375
VII	4.355	4.100	3.450	3.800	4.325
VIII	4.150	4.020	3.450	3.910	4.320
IX	4.125	4.220	3.530	3.700	4.350
X	4.350	4.150	3.550	3.850	4.425
XI	4.450	4.200	3.410	3.800	4.400
XII	4.430	4.275	3.475	3.830	4.370
XIII	4.530	4.300	4.460	3.700	4.425
XIV	4.375	4.300	4.360	3.465	4.350
XV	4.410	4.270	3.520	3.995	4.595
XVI	4.670	4.230	3.630	3.425	3.950
XVII	4.590	4.325	3.710	4.040	4.540
XVIII	4.555	4.300	3.605	4.065	4.560
XIX	4.635	4.150	3.640	3.960	4.550
XX	4.675	3.665	3.620	4.000	4.600
XXI	4.740	3.185	3.625	4.000	4.600
XXII	4.625	††	3.660	4.090	4.560
XXIII	4.875	††	3.675	4.680	4.665
XXIV	4.850		3.680	4.160	4.670
XXV	4.725		3.700	4.215	4.670
XXVI	4.815		3.805	4.250	4.725
XXVII	4.865		3.750	4.215	4.670
XXVIII	4.700		3.680	4.250	4.605
XXIX	4.610		†††	4.325	4.750
XXX	4.795		†††	4.305	4.810
XXXI	4.750		†††	4.335	4.760
XXXII	4.800			3.950	3.990
XXXIII	4.910			3.990	4.630
XXXIV				3.990	4.500

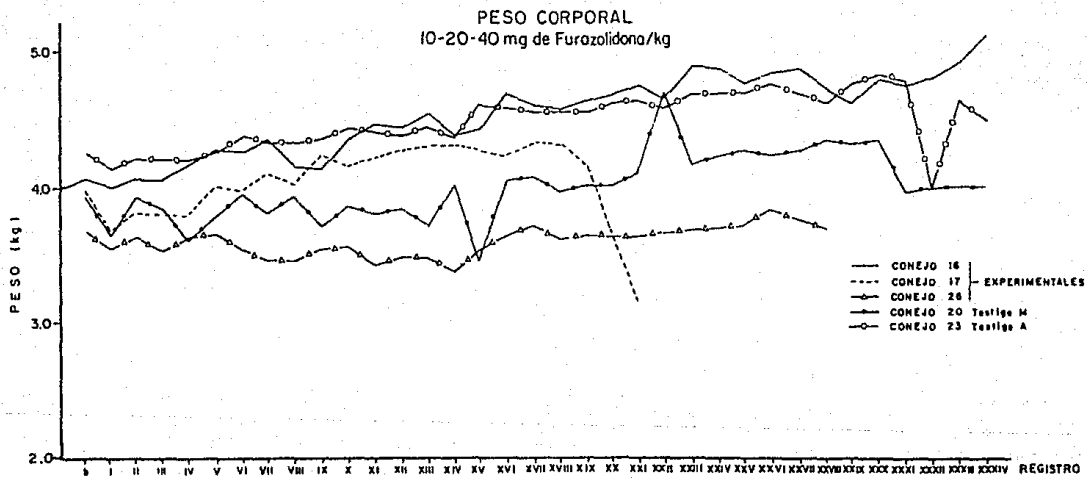
Tabla XIX. Pesos corporales (Kg) con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

R registro

O<sup>o</sup> organismo

†† sacrificado 4 meses después de iniciado el tratamiento

††† sacrificado en la oligospermia



Gráfica 13. Peso corporal (kg)

La tabla XX muestra el peso (g) de los testículos de los conejos experimentales (16, 17 y 26) y testigos (20 y 23) obtenidos por orquitectomía en el momento de la oligospermia, comparada con el peso de los testículos después de la recuperación de la cuenta espermática. Se observa una reducción del peso testicular de los conejos tratados en el momento de la oligospermia llegando solo el testículo del conejo 16 a su peso normal después de la recuperación.

CONEJO	OLIGOSP.	RECUPER.
16E	2.4	3.6
17E	1.0	1.0
26E	2.5	
20T	3.1	3.8
23T	4.9	4.8

Tabla XX. Peso testicular (g) con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

En la tabla XXI están contenidas las medidas (cm) de largo, diámetro mayor (D.MA) y diámetro menor (D.ME) de los testículos de los conejos experimentales (16, 17 y 26) y de los testigos (20 y 23) obtenidas en el momento de la oligospermia, comparadas con las medidas de los testículos después de recuperada la cuenta espermática. Se puede observar una disminución de las medidas de los testículos de los conejos experimentales en el momento de la oligospermia, alcanzando el conejo 16 sus medidas normales una vez lograda la recuperación. fotografía 1-2-3

CONEJO	OLIGOSPERMIA			RECUPERACION		
	LARGO	D.MA	D.ME	LARGO	D.MA	D.ME
16E	2.2	1.5	0.9	2.8	1.9	0.9
17E	1.1	0.7	0.4			
26E	3.5	1.7	1.3			
20T	3.0	1.5	0.6	2.7	1.5	0.6
23T	2.7	1.7	1.0	3.1	1.7	1.2

Tabla XXI. Medidas de los testículos (cm) con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

### Fotografía 1

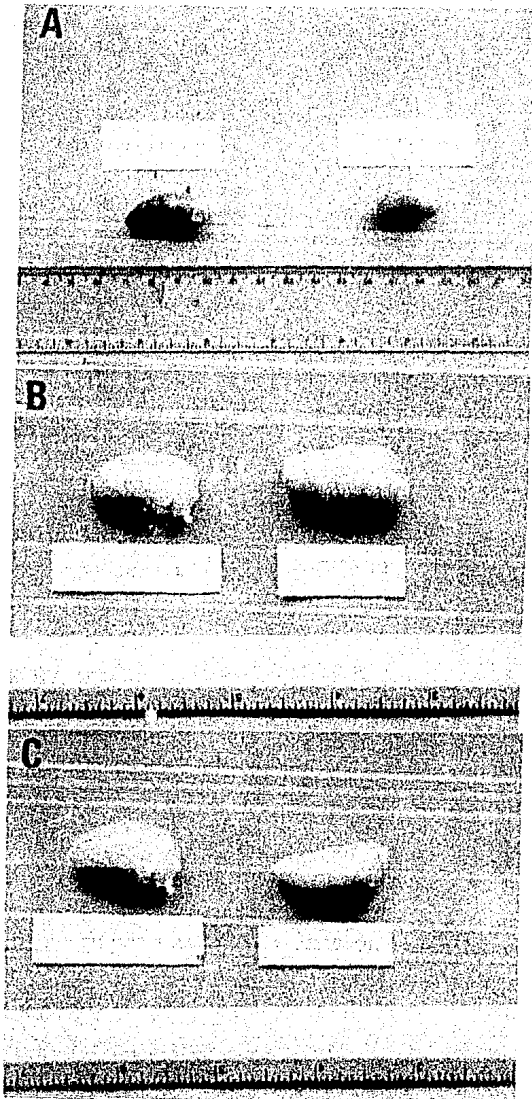
- A.- muestra el tamaño del testículo del conejo 16 tratado con una dosis de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal en el momento de la oligospermia comparado con el testículo del conejo testigo.
- B.- muestra el tamaño del testículo del conejo 16 tratado con una dosis de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de la recuperación comparado con el testículo del conejo 23 (testigo con agua).
- C.- muestra el tamaño del testículo del conejo 16 tratado con 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de la recuperación comparado con el testículo del conejo 20 (testigo con metil celulosa).

### Fotografía 2

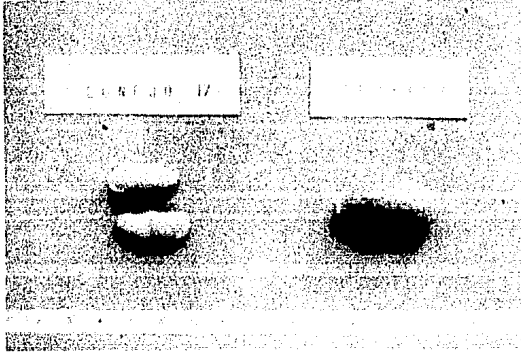
- A.- muestra el tamaño de los dos testículos obtenidos del conejo 17 tratado con una dosis de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal en el momento del sacrificio (4 meses después de iniciado el tratamiento).

### Fotografía 3

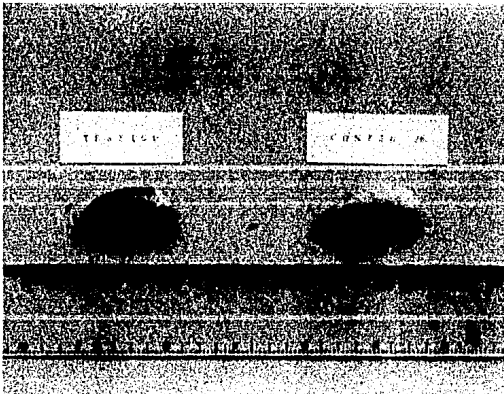
- A.- muestra el tamaño del testículo del conejo 26 tratado con una dosis de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal en el momento de la oligospermia (8 meses) comparado con el testículo del conejo testigo.



Fotografia 2



Fotografia 3



## 2.5. Conducta sexual.

La actividad sexual no presentó ninguna alteración a lo largo de todo el experimento observándose gran actividad de los machos en presencia de las hembras con montas repetidas

## 2.6. Condiciones de la descendencia.

El análisis de la descendencia de los conejos tratados realizada dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento reveló que no presentaban alteraciones ni en número ni en estructura, siendo macroscópicamente normales.

## 2.7. Estudio Histológico.

### I. Oligospermia.

El análisis de los cortes de los testículos de los conejos experimentales (16 y 26) obtenidos por orquitectomía, confirmó la oligospermia determinada por la disminución del número de espermatozoides. Se observó un bloqueo de la espermatogénesis a nivel de espermatozito primario. En algunos de los túbulos seminíferos del testículo del conejo 16 se observaron células gigantes multinucleadas. Las células de Leydig no presentaron alteración. (micrografías 3A-3B)

### II. Recuperación.

Los cortes del testículo del conejo experimental 16 obtenidos después de demostrada la recuperación de la cuenta espermática y la fertilidad mostraron una espermatogénesis completa con presencia de todas las células de la estirpe germinal. Las células de Leydig no presentaron ninguna alteración. (micrografía 3C)

En el conejo 16, el estómago, intestino, suprarrenales, riñón e hígado no mostraron ningún cambio estructural. En el conejo 17 se encontraron alteraciones a nivel de riñón que presenta una congestión del penacho glomerular compatible con la dilatación de los capilares glomerulares lo que determina la dilatación del espacio de Bowman. (micrografía 4)

En las muestras de los diferentes órganos de los conejos testigo 20 y 23 no se encontró ningún cambio estructural, los testículos presentaron una espermatogénesis completa y las células de Leydig no sufrieron modificación.



### Micrografía 3

- A.- corte de testículo de conejo tratado con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal. Se observa el bloqueo de la espermatogénesis a nivel del espermatocito primario (ep), la presencia de espermatogonias (eg), la ausencia de espermatozoides en la luz del túbulo (lt), túbulo seminífero (ts) y vaso sanguíneo (vs).
- B.- corte de testículo de conejo tratado de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal. Se observa la presencia de células gigantes multinucleadas (cg) como las reportadas por Green, N. N. y C. E. Friedgood, en 1948 y Prior, J. T. y J. H. Ferguson en 1950.
- C.- corte de testículo de conejo obtenido después de la recuperación. Se observa la espermatogénesis completa (ec) con presencia de espermatozoides (e) en la luz del túbulo (lt), túbulo seminífero (ts).

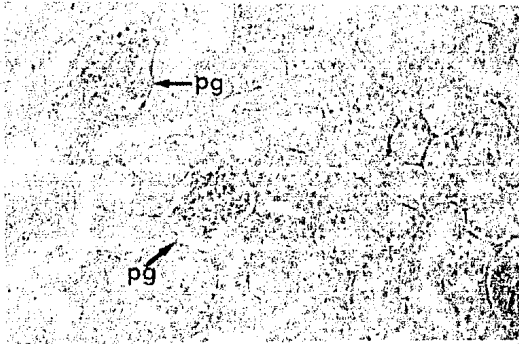
### Micrografía 4

Corte de riñón del conejo 17 tratado con una dosis ascendente de 10-20-40 mg de turazolidona/kg de peso corporal. Se observa una congestión del penacho - glomerular (pg).

Micrografia 3



Micrografía 4



### 3.0. DOSIS DE 30-45 mg DE FURAZOLIDONA/KG DE PESO CORPORAL.

#### 3.1. Espermatobioscopia.

Las muestras b1-G se tomaron cada 15 días, de la H-M cada 3 semanas y de N-S cada mes.

##### 3.1.1. Volumen.

La tabla XXII muestra el volumen (ml) del eyaculado de los conejos experimentales 11, 13 y 15 y testigos 20 y 23 antes (b1-b2), durante (A-N conejo 15, A-O conejos 11 y 13) y después (O-T conejo 15 y P-T conejos 11 y 13) de suspendido el tratamiento. Los conejos 11 y 13 muestran una disminución no significativa del volumen 10 meses después (Q) de iniciado el tratamiento, recuperándose los valores normales 1 mes (R) después. El conejo 15 no presenta disminución en el volumen del eyaculado manteniéndose dentro de los rangos normales durante todo el experimento. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos.

m	O <sup>o</sup>	11E	13E	15E	20T	23T
b1		0.6	0.5	1.5	0.5	1.3
b2		2.0	0.5	1.0	0.4	0.4
A		1.0	2.5	0.7	0.8	1.0
B		0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
C		0.6	0.5	0.3	0.5	0.5
D		0.1	0.5	0.5	1.0	0.5
E		1.0	1.2	1.5	0.5	1.0
F		0.2	1.0	1.0	1.0	1.0
G		0.5	0.5	0.5	0.7	0.7
H		0.5	0.5	1.0	1.0	0.7
I		0.1	1.0	1.4	0.5	1.0
J		1.0	1.0	0.5	0.5	0.5
K		-	0.5	1.2	0.8	1.0
L		-	0.4	-	0.5	0.5
M		-	0.7	0.8	0.5	1.0
N		1.5	1.0	1.0	-	0.5
O		0.1	0.1	1.0	0.5	1.0
P		1.0	0.8	-	1.0	1.0
Q		1.0	1.0	1.0	0.5	1.0
R		0.2	1.5	-	0.5	0.5
S		0.5	1.0	1.0	0.5	1.0
T		0.5		1.0	0.5	1.0

Tabla XXII. Volumen del eyaculado (ml) con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

- no hubo muestra

m muestra

O<sup>o</sup> organismo

### 3.1.2. Motilidad Espermática.

En la tabla XXIII, gráfica 14 están expresados los porcentajes de espermatozoides móviles en cada una de las muestras de eyaculado antes (b), durante (A-N, A-O) y después (O-T, P-T) del tratamiento. Se puede observar claramente una disminución de la motilidad llegando a ser nula en las muestras de eyaculado de los animales experimentales 11-13 y 15 en la etapa cercana a la oligospermia, a los 10(O) y 8(N) meses después de iniciado el tratamiento recuperándose posteriormente (Q-T, S-T) hasta niveles normales 4 y 9 meses después de suspendido el tratamiento. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos.

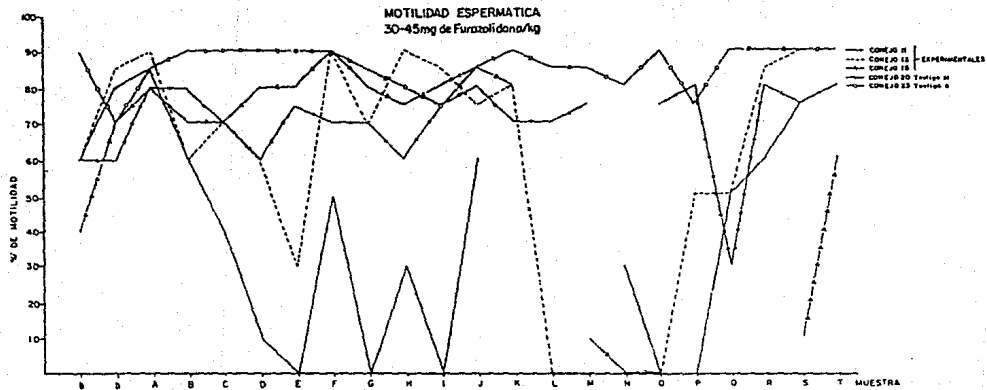
m \ O <sup>o</sup>	11E	13E	15E	20T	23T
b1	60	60	40	60	90
b2	80	85	70	60	70
A	85	90	80	80	85
B	60	60	70	80	90
C	40	70	70	70	90
D	10	60	80	60	90
E	00	30	80	75	90
F	50	90	90	70	90
G	00	70	80	70	85
H	30	90	75	60	10
I	00	85	80	75	75
J	60	75	85	80	85
K	-	80	80	70	90
L	-	00	-	70	85
M	-	00	10	75	85
N	30	00	00	-	40
O	00	00	00	75	90
P	00	50	-	80	75
Q	50	50	00	30	90
R	60	85	-	80	90
S	75	90	10	75	90
T	80		60	80	90

Tabla XXIII. Porcentaje de motilidad espermática con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

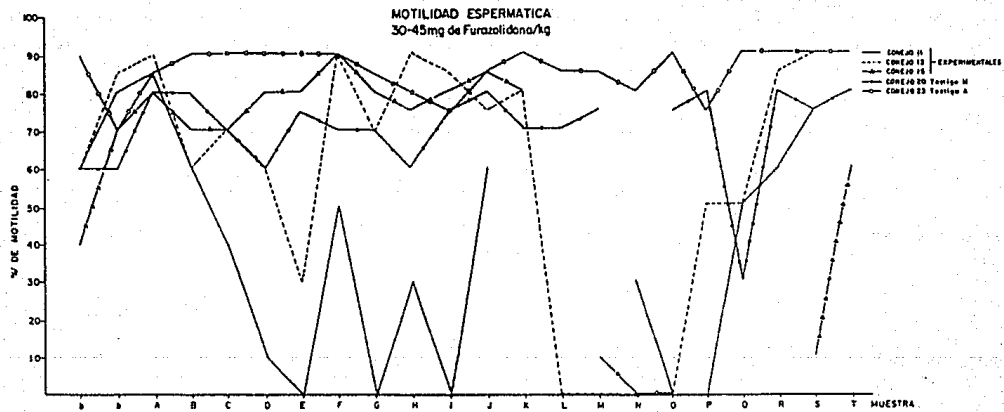
m muestra

O<sup>o</sup> organismo

- no hubo muestra



Gráfica 14. Porcentaje de motilidad espermática



Gráfica 14. Porcentaje de motilidad espermática

### 3.1.3. Densidad Espermática.

En la tabla XXIV, gráfica 15 se presentan los valores de densidad espermática (No. de espermatozoides/ml x 10<sup>6</sup>), ántes (b), durante (A-N, A-O) y después de suspendido el tratamiento. Los conejos experimentales 11-13 y 15 muestran una notoria disminución de la cuenta espermática 10 (N) y 8 (O) meses después de iniciado el tratamiento respectivamente, llegando a la oligospermia. La cuenta espermática recuperó sus valores normales a los 6 meses (S) para los conejos 11 y 13 y a los 9 meses (T) para el conejo 15 después de suspendido el tratamiento y de realizada la orquitectomía unilateral. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos.

m O*	11E	13E	15E	20T	23T
b1	339,500	308,750	327,125	299,166	448,500
b2	500,050	474,916	396,416	205,436	436,000
A	349,250	458,500	338,750	200,302	488,500
B	448,625	93,000	80,625	120,000	192,000
C	89,750	407,250	310,500	173,875	215,500
D	500,000	309,125	453,375	128,750	343,500
E	8,250	164,375	475,125	296,250	344,000
F	130,250	683,500	561,500	298,150	311,500
G	30,000	724,125	714,725	216,500	488,500
H	271,000	488,375	545,000	270,125	432,375
I	569,875	594,462	430,250	308,125	314,000
J	662,125	595,375	487,750	367,000	434,625
K	-	500,750	411,375	328,375	493,750
L	-	553,500	-	220,350	395,125
M	-	259,250	338,125	320,000	466,375
N	13,875	23,000	20,750	-	444,000
O	500	500	3,625	257,050	450,625
P	1,250	72,125	-	200,750	444,000
Q	96,875	229,625	7,000	259,000	450,625
R	238,750	322,125	-	254,000	344,875
S	381,250	406,000	251,000	315,125	374,750
T	479,000	-	354,000	230,350	302,500

Tabla XXIV. Densidad espermática (No. de espermatozoides/ml)\* con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

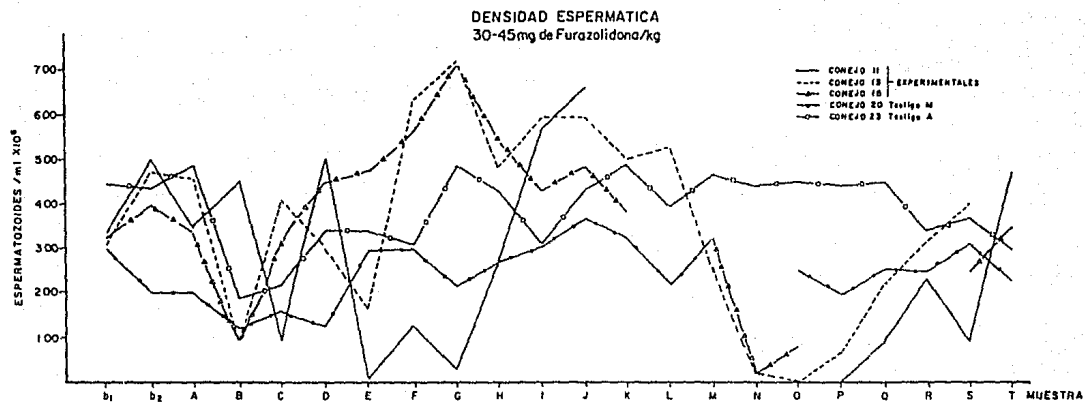
\* expresado x 10<sup>6</sup>

- no hubo muestra

m muestra

O\* organismo





Gráfica 15. Densidad espermática (no. de espermatozoides/ml  $\times 10^6$ )

### 3.1.4. Malformaciones Espermáticas.

En la tabla XXV, gráfica 16 se presentan los porcentajes de malformaciones encontradas en las muestras de eyaculado de los animales tratados 11, 13 y 15 y de los testigos 20 y 23. Se observa un incremento en el porcentaje de malformaciones espermáticas en los animales tratados siendo en promedio de un 35% a los 7.5 meses de tratamiento y antes de lograrse la oligospermia y disminuyendo a valores normales durante la recuperación. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos. El análisis cualitativo de los tipos de malformaciones reveló una alta frecuencia de espermatozoides con gota citoplásmica en el segmento intermedio (parte superior) (39.8%), espermatozoides con gota citoplásmica en el segmento intermedio (parte inferior) (27.18%), flagelos sueltos (11.65%), cabezas sueltas (11.65%), espermatozoides con el flagelo completamente enrollado (5.8%), espermatozoides con el flagelo parcialmente enrollado (2.91%). Micrografía 5 y 6

m \ O <sup>o</sup>	11E	13E	15E	20T	23T
b1	10	3	1	6	5
b2	0	2	7	7	6
A	9	4	2	4	10
B	10	3	2	3	4
C	16	5	4	0	3
D	20	28	7	9	1
E	52	14	6	0	6
F	26	15	7	3	5
G	8	5	13	3	2
H	27	4	7	9	2
I	30	4	10	4	4
J	27	11	10	5	8
K	-	32	14	5	11
L	-	26	-	5	7
M	-	35	31	8	3
N	36	39	30	-	4
O	S.C.	1	16	3	6
P	0	11	-	3	3
Q	16	7	7	6	4
R	10	3	-	7	6
S	6	5	4	3	6
T	5	-	2	8	6

Tabla XXV. Porcentaje de malformaciones espermáticas con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

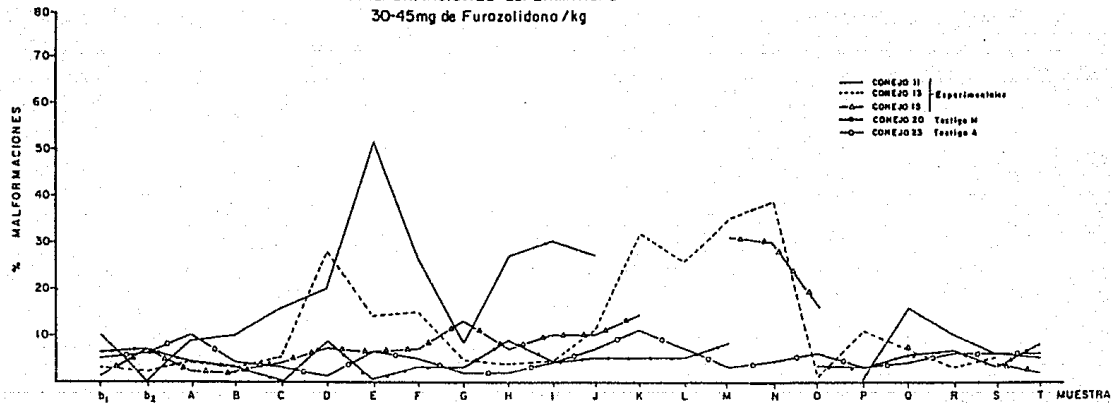
m muestra

O<sup>o</sup> organismo

- no hubo muestra

S.C. sin células

MALFORMACIONES ESPERMATICAS  
30-45mg de Furozolidono /kg



Gráfica 16. Porcentaje de malformaciones espermáticas

## Micrografia 5-6

Muestran los diferentes tipos de malformaciones presentes en los eyaculados de los conejos 11, 13 y 15 tratados con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

fs - flagelo suelto

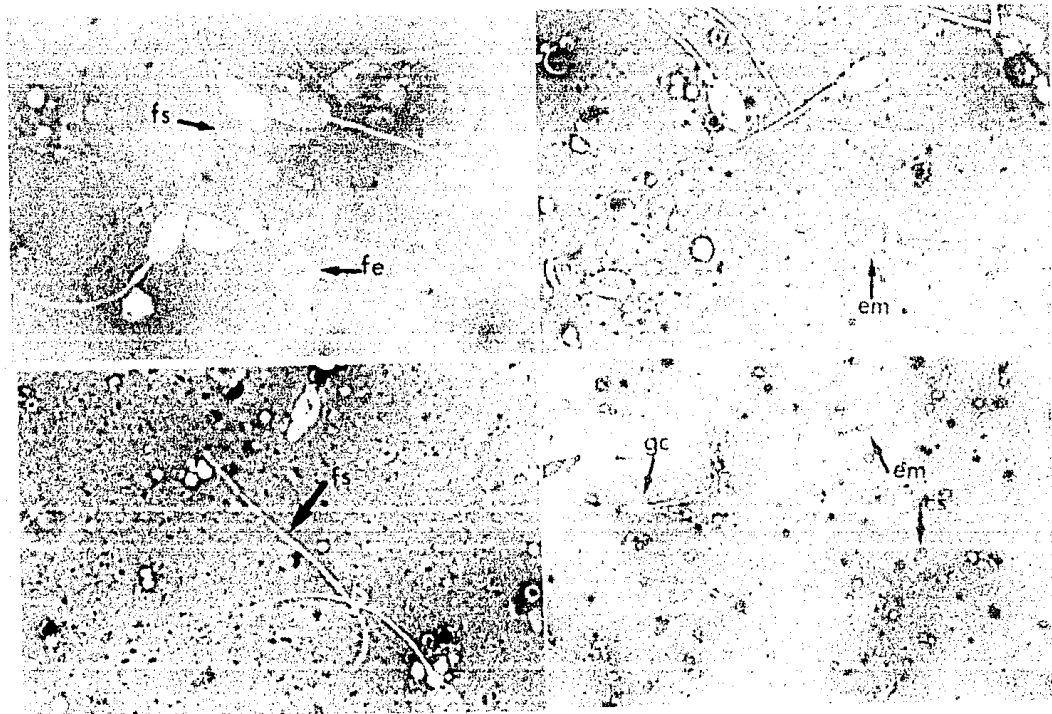
fe - flagelo enrollado

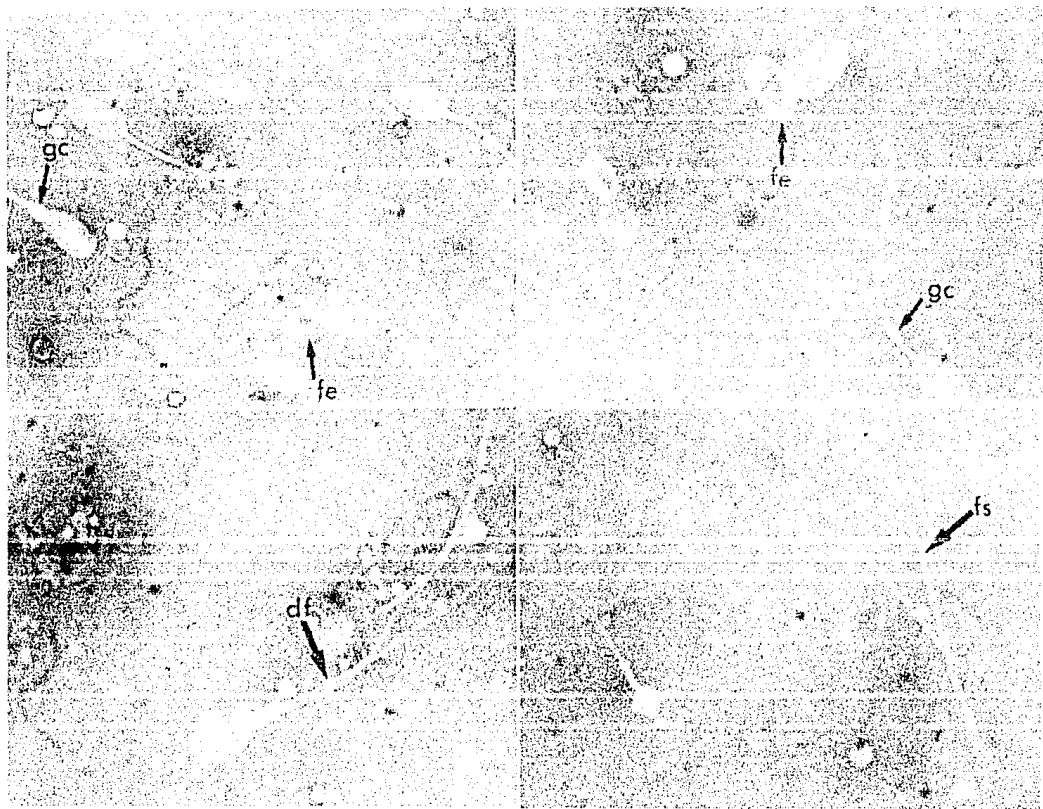
em - espermatozoide muerto

gc - gota citoplásmica

cs - cabeza suelta

df - doble flagelo





### 3.1.5. Mortalidad Espermática.

En la tabla XXVI, gráfica 17 se presentan los porcentajes de espermatozoides muertos en las muestras de los eyaculados ántes (b), durante (A-N, A-O) y después (O-T, P-T) de suspendido el tratamiento. Se observa claramente un incremento en la mortalidad de los espermatozoides (50% en promedio) al llegar a la oligospermia (O y N), recuperando los valores normales 6 (S, para los conejos 11 y 13) y 8 (T, para el conejo 15) meses después de suspendido el tratamiento. En algunos casos no hubo muestra debido a que no se logró la eyaculación de los conejos.

m \ O <sup>o</sup>	11E	13E	15E	20T	23T
b1	4	9	5	1	4
b2	1	3	0	3	11
A	5	3	1	0	4
B	9	4	3	6	6
C	6	6	3	2	11
D	13	9	8	6	6
E	21	9	4	2	5
F	10	5	3	8	4
G	9	13	9	1	6
H	11	4	2	9	5
I	19	1	9	1	11
J	49	10	7	6	3
K	-	12	30	3	10
L	-	64	-	5	9
M	-	58	43	2	4
N	56	50	45		2
O	S.C.	S.C.	13	6	6
P	0	9		3	0
Q	9	18	10	6	4
R	8	2		3	6
S	4	6	5	6	5
T	5	-	3	5	4

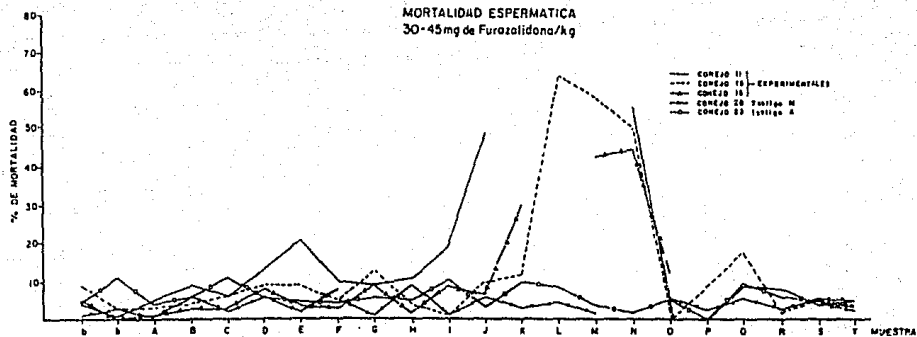
Tabla XXVI Porcentaje de mortalidad espermática con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

m muestra

O<sup>o</sup> organismo

- no hubo muestra

S.C. sin células



Cráfica 17. Porcentaje de mortalidad espermática



### 3.2. Concentraciones Hormonales.

#### 3.2.1. Testosterona.

La tabla XXVII, gráfica 18 muestran los niveles de testosterona (ng de testosterona/ml de suero) de los conejos experimentales 11, 13 y 15 y de los testigos 20 y 23 antes (b), durante (A-N, A-O) y después (O-T, P-T) de suspendido el tratamiento con furazolidona. Se observa que los niveles de testosterona no sufren ningún cambio a lo largo de todo el experimento conservándose dentro de los rangos normales.

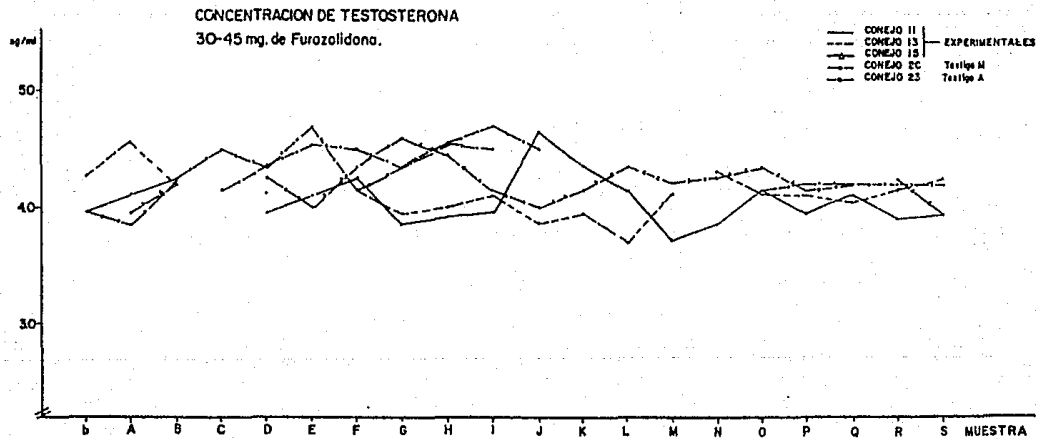
m \ O <sup>o</sup>	11E	13E	15E	20T	23T
b	3.96	4.27	-	-	3.95
A	4.11	4.56	3.95	-	3.85
B	4.25	4.20	4.20	-	4.25
C	-	-	-	4.15	4.50
D	3.96	4.12	4.25	4.36	4.35
E	4.10	-	4.00	4.54	4.70
F	4.25	4.15	4.35	4.50	4.15
G	3.85	3.95	4.60	4.35	4.36
H	3.92	4.00	4.45	4.56	4.56
I	3.96	4.10	4.15	4.70	4.50
J	4.65	3.86	4.00	4.50	-
K	4.35	3.95	4.15	-	-
L	4.14	3.70	4.35	-	-
M	3.72	4.10	4.20	-	-
N	3.86	4.31	4.26	-	-
O	4.15	4.12	4.35	-	-
P	3.95	4.11	4.15	4.15	4.15
Q	4.11	4.05	-	4.20	4.20
R	3.93	4.15	4.25	4.20	4.20
S	3.95	4.25	3.95	-	4.20

Tabla XXVII. Concentración de testosterona (ng/ml suero sanguíneo) con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

- no fue suficiente muestra

m muestra

O<sup>o</sup> organismo



Gráfica 18. Concentración de testosterona (ng/ml)

### 3.2.2. Dihidrotosterona.

En la tabla XXVIII, gráfica 19 se muestran los niveles de dihidrotosterona (ng de dihidrotosterona/ml de suero) de los conejos experimentales 11, 13 y 15 y de los testigos 20 y 23 ántes (b), durante (A-N, A-O) y después (O-T, P-T) de suspendido el tratamiento. Se observa que los niveles de dihidrotosterona se conservan dentro de los valores normales a lo largo de todo el experimento.

m \ O <sup>o</sup>	11E	13E	15E	20T	23T
b	0.380	0.315	-	0.380	-
A	0.375	0.380	0.450	-	0.395
B	0.380	0.396	0.407	-	0.415
C	-	-	-	0.375	0.425
D	0.365	0.400	0.400	0.390	0.400
E	0.390	-	0.435	0.380	0.385
F	0.470	0.395	0.410	0.360	0.390
G	0.385	0.385	0.390	0.400	0.400
H	0.400	0.410	0.395	0.390	0.415
I	0.380	0.370	0.390	0.410	-
J	0.370	0.400	0.400	0.400	-
K	0.365	0.390	0.410	-	-
L	0.380	0.395	0.390	0.395	-
M	0.370	0.450	0.370	0.390	-
N	0.380	0.410	0.385	-	-
O	0.375	0.385	0.410	0.400	-
P	0.380	0.400	0.410	0.360	0.415
Q	0.386	0.340	-	0.370	0.375
R	0.390	0.390	0.415	0.400	0.400
S	0.380	0.385	0.395	-	0.415

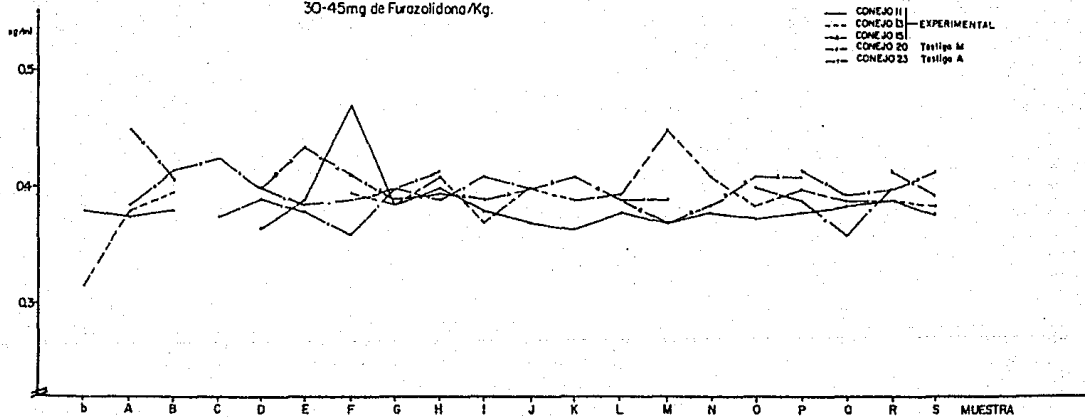
Tabla XXVIII. Concentración de Dihidrotosterona (ng/ml de suero sanguíneo) con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

- no fue suficiente muestra

m muestra

O<sup>o</sup> organismo

CONCENTRACION DE DIHIDROTESTOSTERONA  
30-45mg de Furazolidona/Kg.



Gráfica 19. Concentración de dihidrotestosterona (ng/ml)

### 3.2.3. Androstendiona.

La tabla XXIX, gráfica 20 muestran los niveles de androstendiona (ng de androstendiona/ml de suero) de los conejos experimentales 11, 13 y 15 y de los testigos 20 y 23 antes (b), durante (A-N, A-O) y después de suspendido el tratamiento. Se observa que los niveles de androstendiona no sufren cambios a lo largo de todo el experimento.

m	o'	11E	13E	15E	20T	23T
b		0.725	0.975	-	0.980	0.980
A		0.925	0.920	0.880	-	0.990
B		0.915	0.890	0.910	-	1.050
C		-	-	-	1.000	0.950
D		0.870	0.910	0.840	0.950	0.915
E		0.930	-	0.810	0.970	0.925
F		0.850	0.870	0.795	0.960	0.950
G		0.875	0.975	0.870	0.925	0.930
H		0.910	0.956	0.855	0.955	0.950
I		0.850	0.970	0.910	0.915	0.950
J		0.875	1.050	0.950	0.910	-
K		0.820	0.980	0.835	-	-
L		0.850	0.954	0.870	0.859	-
M		0.910	0.990	0.850	0.875	-
N		0.925	0.825	0.870	-	-
O		0.910	0.895	0.810	0.890	-
P		0.850	0.930	0.910	0.910	0.910
Q		0.910	0.945	-	0.875	0.925
R		0.900	0.875	0.875	0.890	0.800
S		0.875	0.900	0.860	-	0.930

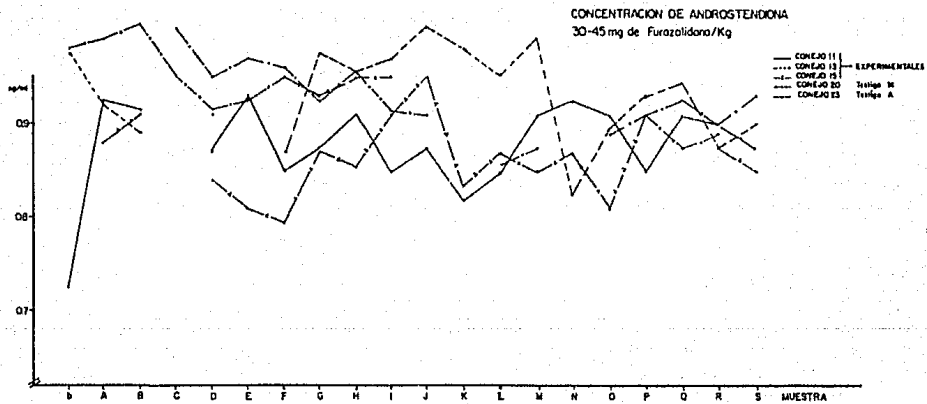
Tabla XXIX. Concentración de Androstendiona (ng/ml de suero sanguíneo) con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

- no fue suficiente muestra

m muestra

o' organismo

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Gráfica 20. Concentración de androstendiona (ng/ml)

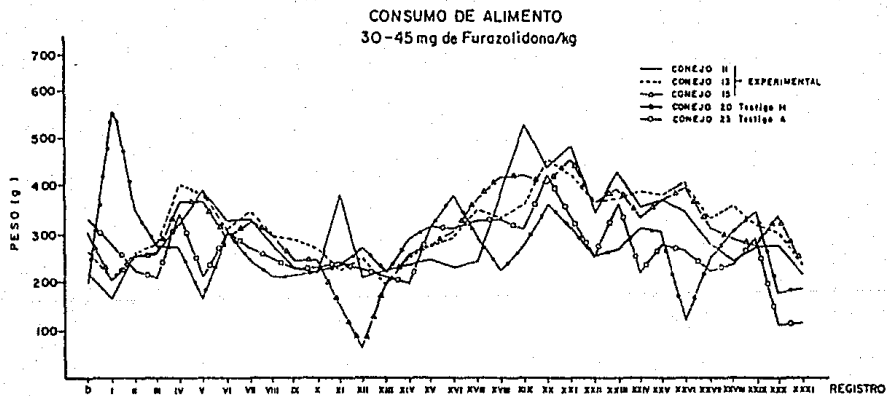
### 3.3. Consumo de Alimento.

La tabla XXX, gráfica 21 muestran la cantidad de alimento ingerido (g) antes (b), durante (I-XIV, I-XV) y después (XV-XXXI, XVI-XXXI) de suspendido el tratamiento pudiéndose observar que no fue afectada la ingestión de alimento durante todo el experimento. Cada registro es el promedio de alimento ingerido en 15 días.

R \ O <sup>o</sup>	11E	13E	15E	20T	23T
b	223	270	308	201	339
I	168	211	209	558	284
II	255	265	258	353	227
III	265	289	260	276	214
IV	323	407	373	275	348
V	396	389	370	165	211
VI	330	311	299	305	306
VII	337	352	329	246	270
VIII	289	300	305	216	253
XIX	232	292	247	218	231
X	214	276	250	226	231
XI	387	229	153	237	247
XII	213	259	78	279	233
XIII	230	198	203	220	215
XIV	243	305	258	294	203
XV	255	282	276	322	321
XVI	236	298	314	388	318
XVII	246	356	380	297	333
XVIII	387	342	428	228	336
XIX	534	367	433	284	319
XX	441	463	412	368	428
XXI	491	433	461	320	342
XXII	352	373	376	263	258
XXIII	437	389	401	271	366
XXIV	360	399	342	316	221
XXV	372	387	379	311	287
XXVI	358	417	404	129	273
XXVII	287	337	323	259	232
XXVIII	247	367	295	312	241
XXIX	276	323	280	350	295
XXX	281	314	344	183	117
XXXI	218	237	236	190	120

Tabla XXX. Consumo de alimento (g) con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

R registro  
O<sup>o</sup> organismo



Gráfica 21. Consumo de alimento (g)



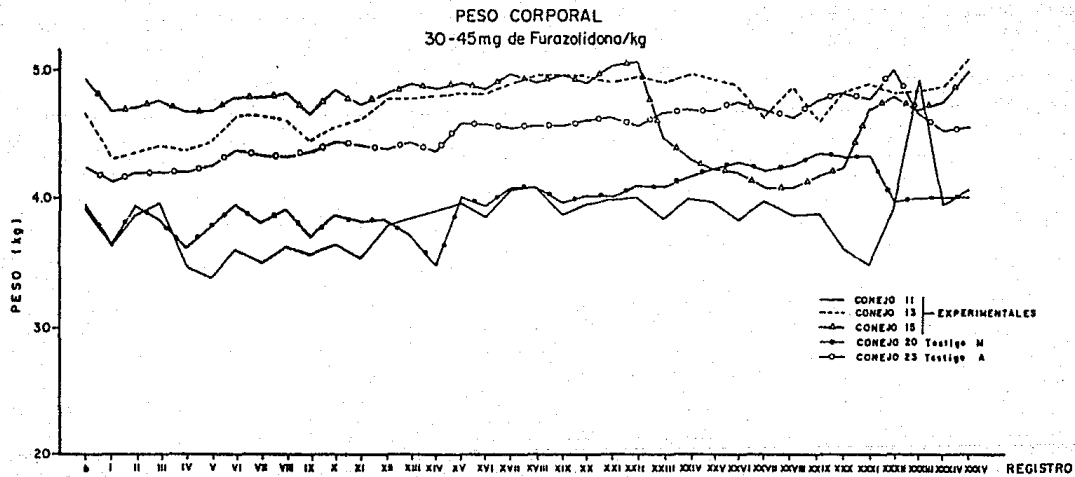
### 3.4. Peso Corporal.

La tabla XXXI, gráfica 22 contienen los pesos corporales (kg) de los conejos antes (b), durante (I-XXIII) y después (XXIV-XXXIII) de suspendido el tratamiento, datos que se encuentran dentro de los valores normales y que coinciden con los datos de consumo de alimento que demuestran que estos parámetros no son afectados por el tratamiento. Cada registro se hizo por semana.

R	O <sup>o</sup>	11E	13E	15E	20T	23T
	b	3.950	4.670	4.925	3.925	4.250
I		3.625	4.300	4.670	3.650	4.125
II		3.860	4.350	4.700	3.935	4.210
III		3.975	4.415	4.755	3.830	4.200
IV		3.455	4.370	4.675	3.605	4.200
V		3.385	4.425	4.675	3.780	4.255
VI		3.610	4.625	4.780	3.950	4.375
VII		3.520	4.625	4.775	3.800	4.325
VIII		3.625	4.600	4.815	3.910	4.320
IX		3.560	4.450	4.655	3.700	4.350
X		3.620	4.550	4.850	3.850	4.425
XI		3.525	4.615	4.725	3.800	4.400
XII		3.795	4.775	4.835	3.830	4.370
XXIII		3.855	4.765	4.880	3.700	4.425
XIV		3.895	4.785	4.860	3.465	4.350
XV		3.955	4.815	4.910	3.995	4.595
XVI		3.850	4.800	4.855	3.925	4.565
XVII		4.060	4.875	4.965	4.040	4.540
XVIII		4.070	4.950	4.920	4.065	4.560
XIX		3.850	4.950	4.955	3.960	4.550
XX		3.940	4.950	4.905	4.000	4.600
XXI		3.975	4.905	5.020	4.000	4.620
XXII		3.980	4.950	5.050	4.090	4.560
XXIII		3.830	4.900	4.460	4.080	4.665
XXIV		3.985	4.945	4.300	4.160	4.670
XXV		3.960	4.910	4.220	4.215	4.670
XXVI		3.820	4.860	4.205	4.250	4.725
XXVII		3.975	4.625	4.080	4.215	4.670
XXVIII		3.865	4.855	4.060	4.250	4.605
XXIX		3.895	4.605	4.175	4.325	4.750
XXX		3.605	4.810	4.230	4.305	4.810
XXXI		3.510	4.890	4.695	4.335	4.760
XXXII		3.940	4.815	4.795	3.950	4.990
XXXIII		4.920	4.820	4.695	4.990	4.630
XXXIV		3.950	4.860	4.750	3.990	4.500
XXXV		4.050	5.070	4.990	3.995	4.550

Tabla XXXI. Pesos corporales (kg) con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

R registro  
O<sup>o</sup> organismo



Gráfica 22. Peso corporal (kg)

La tabla XXXII muestra el peso (g) de los conejos experimentales (11, 13 y 15) y los testigos (20 y 23) obtenidos por orquitectomía en el momento de la oligospermia, comparados con los pesos testiculares después de la recuperación de la cuenta espermática. Se observa una disminución de los pesos testiculares de los conejos experimentales en el momento de la oligospermia recuperando sus pesos normales una vez lograda la recuperación.

CONEJO	OLIGOSPERMIA	RECUPERACION
11E	1.5	3.9
13E	2.7	4.7
15E	2.4	2.6
20T	3.1	3.3
23T	4.8	4.8

Tabla XXXII. Peso testicular (g) con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

En la tabla XXXIII, están contenidas las medidas (cm) de largo, diámetro mayor (D.MA) y diámetro menor (D.ME) de los testículos de los conejos experimentales (11, 13 y 15) y los testigos (20 y 23) obtenidos en el momento de la oligospermia, comparadas con las medidas de los testículos después de recuperada la cuenta espermática. No se observan cambios significativos en las medidas de los testículos en el momento de la oligospermia y si un incremento no significativo de éstas durante la recuperación. fotografías 4-5-6

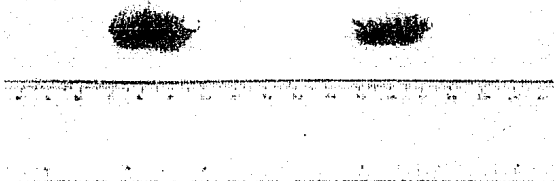
CONEJO	OLIGOSPERMIA			RECUPERACION		
	LARGO	D.MA	D.ME	LARGO	D.MA	D.ME
11E	2.5	1.3	0.8	3.0	1.7	1.0
13E	3.1	1.3	0.7	3.4	1.8	1.2
15E	2.6	1.3	0.9	2.6	1.3	0.9
20T	3.0	1.5	0.6	2.7	1.5	0.6
23T	3.5	1.7	1.3	3.1	1.7	1.2

Tabla XXXIII. Medidas de los testículos (cm) con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

#### Fotografía 4

- A.- muestra el tamaño del testículo del conejo 11 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal en el momento de la oligospermia comparado con el testículo del conejo testigo.
- B.- muestra el tamaño del testículo del conejo 11 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de la recuperación comparado con el testículo del conejo 23 (testigo con agua).
- C.- muestra el tamaño del testículo del conejo 11 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de la recuperación comparado con el testículo del conejo 20 (testigo con metil celulosa).

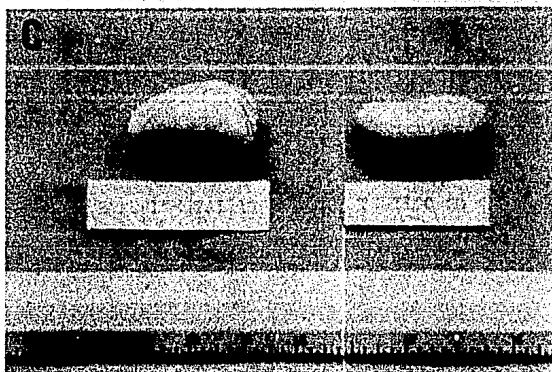
A



B

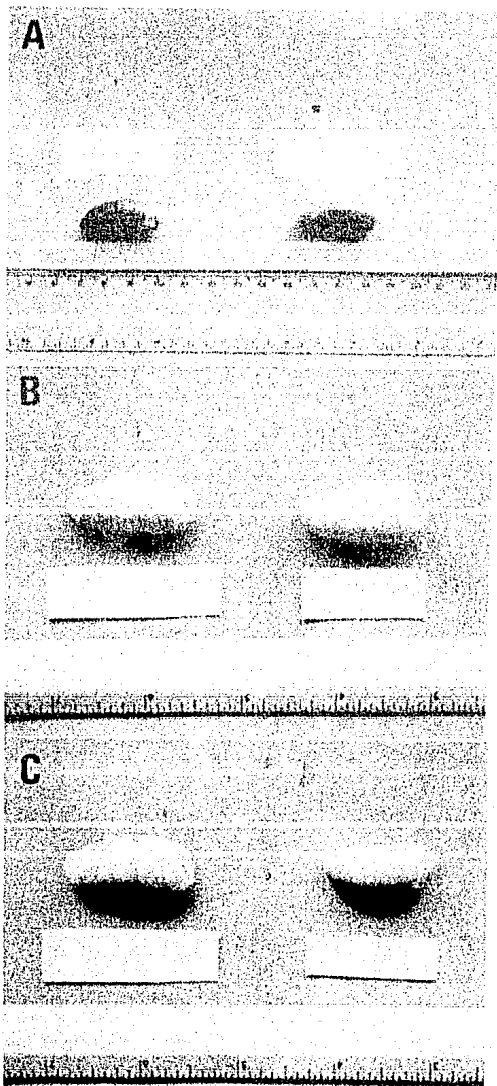


C



Fotografía 5

- A.- muestra el tamaño del testículo del conejo 13 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal en el momento de la oligospermia comparado con el testículo del conejo testigo.
- B.- muestra el tamaño del testículo del conejo 13 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de la recuperación comparado con el testículo del conejo 23 (testigo con agua).
- C.- muestra el tamaño del testículo del conejo 13 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de la recuperación comparado con el testículo del conejo 20 (testigo con metil celulosa).

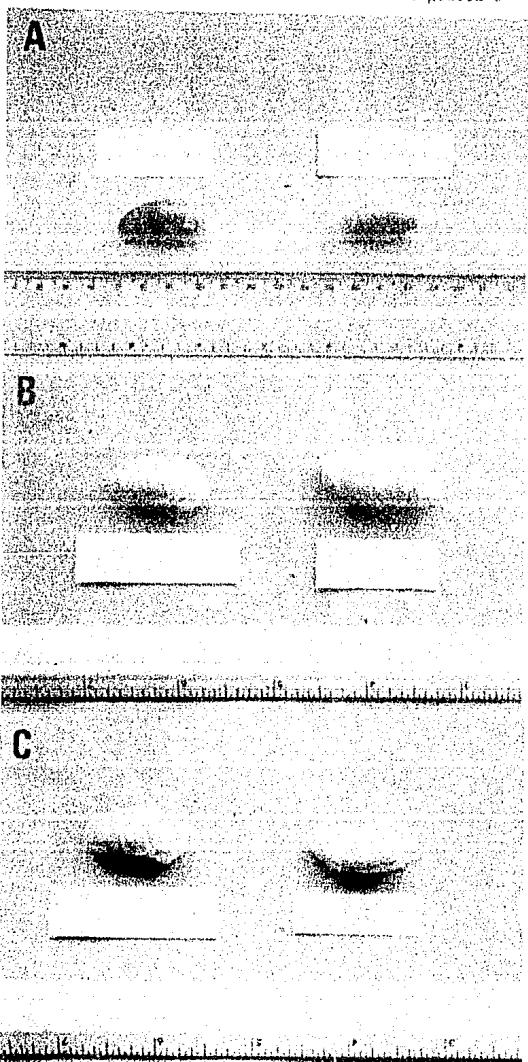


## Fotografía 6

- A.- muestra el tamaño del testículo del conejo 15 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal en el momento de la oligospermia comparado con el testículo del conejo testigo.
- B.- muestra el tamaño del testículo del conejo 15 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de la recuperación comparado con el testículo del conejo 23 (testigo con agua).
- C.- muestra el tamaño del testículo del conejo 15 tratado con una dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de la recuperación comparado con el testículo del conejo 20 (testigo con metil celulosa).



Fotografia 6



### 3.5. Conducta Sexual.

Este parámetro no presentó cambio alguno a lo largo de todo el experimento observándose gran actividad de los machos en presencia de las hembras con montas repetidas.

### 3.6. Condiciones de la descendencia.

El análisis de la descendencia de los conejos tratados realiza dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento reveló que no presentaban alteraciones ni en número (camada) ni en estructura, siendo macroscópicamente normales.

### 3.7. Estudio Histológico.

#### I. Oligospermia.

El análisis de los cortes de los testículos de los conejos experimentales (11, 13 y 15), obtenidos por orquitectomía reveló un bloqueo de la espermatogénesis a nivel de espermatozoides primario con una total ausencia de espermatozoides secundarios, espermátidas y espermatozoides en la luz del túbulo, confirmando así, la oligospermia determinada por la disminución de la cuenta espermática. Las células de Leydig no presentaron ninguna alteración. (micrografía 7A). Los testículos de los conejos testigos no mostraron ninguna alteración, observándose todas las células de la estirpe germinal en los túbulos seminíferos. Las células de Leydig no presentaron alteración.

#### II. Recuperación.

Los cortes de los testículos de los conejos experimentales (11, 13 y 15) obtenidos después de demostrada la recuperación de la cuenta espermática y la fertilidad, revelaron una espermatogénesis completa con la presencia de todas las células de la estirpe germinal. Las células de Leydig no presentaron alteración. (micrografía 7B). El análisis de las muestras de estómago, intestino, suprarrenales, riñón e hígado reveló que las características histológicas de éstos órganos no fueron afectadas por el tratamiento con furazolidona.

Las muestras de los diferentes órganos de los conejos testigo no presentaron ninguna alteración. La espermatogénesis fue completa y las células de Leydig eran normales.

## Micrografía 7

A.- corte de testículo de conejo tratado con una dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal. Se observa el bloqueo de la espermatogénesis a nivel de espermatocito primario (ep), la presencia de espermatogonias (eg), la ausencia de espermatozoides en la luz del túbulo (lt). (ts)túbulo seminífero. (vs) vaso sanguíneo.

B.- corte de testículo de conejo obtenido después de la recuperación. Se observa la espermatogénesis completa (ec) con presencia de espermatozoides (e) en la luz del túbulo (lt). (ts) túbulo seminífero.



## VII. DISCUSION:

Son varios los factores endócrinos y neuroendócrinos que regulan los mecanismos fisiológicos que participan en la producción, maduración y transporte de ovocitos y espermatozoides, en la fertilización e implantación, estos mecanismos involucran interacciones complejas entre el medio ambiente externo y el sistema nervioso central, las hormonas hipotalámicas, gonadotrópicas y gonadales. El conocimiento de estas interacciones ha dado por resultado el desarrollo y aplicación de diferentes métodos anticonceptivos que son el resultado de una gran cantidad de trabajos de investigación en fisiología de la reproducción.

Sin embargo la mayoría de estos estudios han sido enfocados a la anticoncepción femenina y es hasta fechas recientes en las que se ha trabajado más intensamente sobre la anticoncepción masculina.

La espermatogénesis es uno de los procesos sobre los cuales se ha trabajado en la búsqueda de un anticonceptivo masculino ideal que no comprometa la libido, que no dañe a otros órganos, que no tenga efectos colaterales y que sea reversible.

La furazolidona, un antimicrobiano de amplio espectro, ha demostrado tener efecto sobre la espermatogénesis de diferentes grupos zoológicos, sin embargo hasta el momento no se conocen las dosis a las cuales se pueda inducir la oligospermia incompatible con la fertilidad sin provocar efectos colaterales.

Estudios previos administrando a conejos una dosis diaria de 50 mg/kg de peso corporal suspendida en aceite vegetal demostraron el logro de la oligospermia incompatible con la fertilidad 9 meses después de iniciado el tratamiento. Por ser este un lapso de tiempo muy largo para los fines de anticoncepción se planteó la necesidad, de modificar el vehículo, la dosis y el esquema de tratamiento teniendo en cuenta que la LD50 es de 2125 mg/kg y que dosis diarias de 500-3000 mg/kg de furazolidona administrada durante un mes produce reacciones adversas como anorexia, diarrea, ataxia, depresión y disnea. El primer planteamiento fue mantener la misma dosis que ya había demostrado ser capaz de inducir oligospermia, modificando el vehículo con el fin de lograr una mayor absorción del medicamento. El análisis de los resultados demostró que la administración de una dosis diaria de 50 mg/kg de furazolidona utilizando como vehículo la dimetil celulosa produce a los 20 días de tratamiento síntomas de toxicidad semejantes a los reportados por Omer (54) para dosis mayores. Entre éstos, la anorexia fue uno de los principales, dando como resultado una drástica disminución en peso corporal del organismo que aunado a la depresión, a la pérdida de sensibilidad sin respuesta motora y a la postración total culminaron con la muerte del 75 % de los organismos. Lo anterior demostró que la dimetil celulosa promueve una mayor absorción del medicamento el cual tuvo un efecto letal a dosis muy por debajo de las reportadas como letales (54). La administración de la dimetil celulosa no produce daño alguno como quedó demostrado en los animales testigos.

El análisis de parámetros como volumen, motilidad, densidad, malformaciones y mortalidad espermática no pudo ser realizado ya que solo se logró obtener una muestra.

En cuanto a la concentración de testosterona, ésta mostró un drástico descenso por lo que se procedió a determinar las concentraciones de cortisol con el objeto de monitorear la actividad compensadora de las suprarrenales encontrándose que ésta hormona también sufría un drástico descenso.

Por lo anterior se procedió a establecer diferentes esquemas de tratamiento capaces de inducir la oligospermia, los cuales deberían de partir de concentraciones menores, proponiéndose los esquemas de 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal.

Al revisar los resultados de los diferentes parámetros analizados se observó que el volumen del eyaculado de los organismos tratados bajo ambos esquemas no sufrió cambios significativos, dato que concuerda con los resultados reportados por Zamaro en 1984 para el caso de gallos a los que se les administraron diferentes dosis (0.01, 0.02, 0.04, y 0.13 %) de furazolidona en el alimento (83). En el mismo trabajo el autor reporta no haber encontrado cambios significativos en la motilidad de los espermatozoides. Sin embargo en 1985 trabajando con gallos semipesados a los que se les administró una dosis de 0.022 % incluida en la dieta reporta una reducción de la motilidad espermática. Para el esquema de tratamiento de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal se observó claramente una disminución en la motilidad espermática 9 meses después de iniciado el tratamiento coincidente con la oligospermia, recuperándose la motilidad normal 4 meses después de suspendido el tratamiento. La disminución de la motilidad para el caso del esquema de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal fue mucho más drástica llegando a ser nula para todos los organismos a los 10 meses de tratamiento recuperándose 6 meses después de suspendido el tratamiento.

En relación a la densidad espermática, Zamaro en 1984 administrando dosis de 0.02, 0.04 y 0.13 % (82) y de 0.022% de furazolidona a gallos reporta una disminución significativa en la concentración espermática a los 13 días de tratamiento (83). Revilla et al. en 1987 trabajando con conejos a los que se les administró una dosis diaria de 50 mg de furazolidona /kg de peso corporal suspendida en aceite vegetal encuentran una disminución en la densidad espermática a los 9 meses de tratamiento (enviado a publicación).

Con el esquema de tratamiento de 10-20-40 mg la densidad espermática se reduce 9 meses después de iniciado el tratamiento entre los 9 y 10 meses para la dosis de 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal. Al realizar la prueba de fertilidad se comprobó que era negativa para los animales tratados bajo ambos esquemas. Resultados semejantes se obtienen en gallos tratados con 100, 200, 400 y 800 p.p.m. observándose un notable decremento en la cantidad de huevo fértil para la dosis de 800 ppm (83).

Las malformaciones espermáticas, otro de los parámetros estudiados, aumentan, según lo reporta Zamaro, con la administración de 0.02, 0.04 y 0.13%. Con una dosis de 0.04% el aumento en el porcentaje de espermatozoides anormales ocurre a partir del 3 día y con 0.01% y 0.02% de furazolidona las malformaciones aparecen a los 13 días de tratamiento (83). Con 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal suspendida en aceite vegetal administrada diariamente a conejos se observó un incremento en el porcentaje de malformaciones a los 6 meses de tratamiento. La administración de furazolidona bajo el esquema de 10-20-40 mg ocasiona un incremento significativo en el porcentaje de malformaciones a los 9 meses de tratamiento, momento en que se logra la oligospermia recuperándose los valores normales 7 meses después de suspendida la administración. Con el esquema de 30-45 mg el porcentaje de malformaciones aumenta a un 35% en promedio entre los 9 y 10 meses disminuyendo a los valores normales durante la recuperación.

El análisis cualitativo reveló que para el esquema de 10-20-40 mg el tipo de malformación más frecuente era el enrollamiento del flagelo seguido por la presencia de gota citoplásmica a nivel de segmento intermedio. Para la dosis de 30-45 mg la gota citoplásmica a nivel de segmento intermedio seguida por el flagelo completamente enrollado fueron los principales tipos de malformaciones. La presencia de la gota citoplásmica a nivel de segmento intermedio implica una falta de maduración de los espermatozoides a nivel de epidídimo (30) y el enrollamiento del flagelo una alteración a nivel de los microtúbulos (1).

La mortalidad espermática es un parámetro que mostró un importante incremento (56.5 %) a los 9 meses de administrar el esquema de 10-20-40 mg recuperando sus niveles normales después de 6 meses de suspendido el tratamiento. Un incremento semejante (50%) se encontró al analizar las muestras de los conejos tratados con el esquema de 30-45 mg recuperándose los valores normales 4 meses después de suspender el tratamiento.

Teniendo en cuenta que uno de los efectos adversos de la furazolidona es la anorexia se determinó el consumo de alimento correlacionándolo con el peso corporal. Con el esquema de 10-20-40 mg sólo uno de los organismos (conejo 17) presentó una disminución en el consumo de alimento que repercutió en la pérdida de peso. Con el esquema de 30-45 mg tanto el consumo de alimento como el peso corporal se conservaron dentro de los rangos normales a lo largo de todo el experimento.

En relación a los niveles hormonales Hernández Jáuregui *et al*, en 1982 reportan que a dosis de 0.01 % y 0.02 % de furazolidona administrada en el alimento a gallos durante un mes no induce alteración en el tamaño de crestas y barbillas (3). En 1984 Ali y Kogali demuestran que a dosis de 0.08% peso/peso, 40 y 80 mg de furazolidona/kg incluida en la dieta durante 5 días disminuye el tamaño de crestas y barbillas e induce una reducción en la concentración de testosterona (33).

En 1985 Hernández Jáuregui et al, demostraron que concentraciones de 0.03% y 0.04% administradas a ratones durante un mes no producen disminución en los niveles de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona sin embargo una dosis de 0.06% durante 15 días produce un aumento no significativo de dihidrotestosterona y una disminución significativa en los niveles de androstendiona siendo estos cambios reversibles 1 mes después de suspendido el tratamiento (32). Con los esquemas de tratamiento de 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal las concentraciones de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona se conservaron dentro de los rangos normales para ambos esquemas de tratamiento.

Paul et al, (1953-1954) observaron un decremento en el tamaño de los testículos de ratas alimentadas con 0.01% de furazolidona durante 2 semanas (55 y 56). Satoru et al, (1977) trabajando con cobayos reportan que dosis de 400, 700, y 1000 ppm de furazolidona administrada durante 2 meses inducen una disminución en el tamaño de los testículos (63). Sin embargo Hernández Jáuregui et al en 1982 reportan que dosis de 0.011% durante 2 meses y 0.022% durante 15 días, administradas en el alimento a gallos no inducen cambios significativos en el tamaño y peso testicular (56, 64, 32). En 1984 Ali y Kogali demostraron que una dosis de 0.08% peso/peso (7), 40 y 80 mg de furazolidona/kg de peso corporal incluida en la dieta de gallos durante 5 días, provoca una disminución en el peso de los testículos (33). Zermeno en 1984 reporta que la administración de diferentes dosis de furazolidona a gallos produce una reducción significativa del tamaño y peso testicular (83). Hernández Jáuregui et al, en 1985 administrando a ratones una dosis de 0.06% durante 15 días observó una disminución en el peso testicular (33). La dosis de 10-20-40 mg de furazolidona/kg de peso corporal induce una disminución tanto en el peso testicular como en el tamaño coincidente con el logro de la oligospermia. Resultados semejantes se obtuvieron bajo el esquema de 30-45 mg en cuanto al peso sin embargo las medidas testiculares para esta dosis no presentan una reducción significativa. Durante la recuperación los pesos testiculares de los conejos alcanzaron sus valores normales.

Satoru et al, (1977) en ratas y Koeda et al, (1977) en cobayos reportan que a una dosis de 400, 700, y 1000 ppm. de furazolidona produce una hipoplasia extrema del testículo y ausencia de espermatoцитos y espermatozoides en los túbulos seminíferos (64). En 1982 Hernández Jáuregui et al administrando durante 2 meses 0.011% y 0.022% durante 15 días de furazolidona en la dieta a gallos reportan un retardo en la espermatogénesis a nivel de espermatoцитo primario con lesiones a nivel de espermatogonias y espermatoцитos (32).

Ali y Kogali (1984) demuestran que dosis de 0.08% peso/peso, 40 y 80 mg de furazolidona/kg de peso corporal inducen una marcada atrofia de los túbulos seminíferos (33).



Zermeño (1984) reportó que dosis mayores de 0.04% de furazolidona administrada a aves durante 35 días provoca una disminución en el número de células germinales (83).

En 1985 Hernández Jáuregui *et al*, demostraron que a concentraciones de 0.03% y 0.04% administrada a ratones machos durante un mes produce un retardo en la espermatogénesis quedando detenida a nivel de espermatocito primario produciendo además alteraciones morfológicas; en las espermatogonias y espermatocitos a dosis de 0.06% durante 15 días los cambios son más severos afectando la fertilidad de los machos (33). Los resultados obtenidos bajo los esquemas de 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal concuerda con los resultados reportados por otros autores (32, 33, 36 y 64) produciéndose un bloqueo de la espermatogénesis a nivel de espermatocito primario con ausencia de espermátidas y espermatozoides y con la consecuente infertilidad. Una vez suspendido el tratamiento se inicia la recuperación que se logra totalmente 9 meses después para el esquema de 10-20-40 y 10 meses después para el esquema de 30-45 mg solo en el testículo del conejo 16 se observó la presencia de células gigantes multinucleadas como las reportadas por Green y Friedgood en 1948 y por Prior y Ferguson en 1950 (28 y 60).

El estudio histológico realizado de las muestras de los conejos tratados con el esquema de 10-20-40 mg reveló que sólo el conejo 17 presentó daños a nivel de riñón lo cual concuerda con los datos reportados por Ali y Khogali (1984) que reportan una congestión e hipoplasia glomerular en el riñón de pollos tratados con una dosis de 0.08 mg de furazolidona/kg durante 5 días (7). Sin embargo, Satoru *et al*, (1977) reportan que dosis de 400, 700 y 1000 ppm. de furazolidona provocan a nivel del estómago una atrofia con desnaturalización y disminución en el número de células de la mucosa gástrica siendo los daños más severos con 700 y 1000 ppm (64). Koeda *et al*, (1977) reportan que dosis de 200 a 1000 ppm. administradas a cobayos provoca en el estómago cambios semejantes a los reportados por Satoru *et al*, (1977) (64). A nivel de glándulas suprarrenales éstos autores demuestran cambios muy marcados con disminución a menos de un tercio del tamaño normal y atrofia de la corteza adrenal lo cual se contrapone con los resultados obtenidos por Ali en 1983 que reporta que a una dosis de 0.04% de furazolidona peso/peso administrada en el alimento a pollos y cerdos durante 10 días produce un incremento en el peso de la glándula adrenal que representa probablemente una hipertrofia de la corteza (36, 64).

El estudio histológico realizado de las muestras de estómago, intestino, suprarrenales, riñón e hígado de los conejos tratados con 30-45 mg de furazolidona/kg de peso corporal después de lograda la recuperación demuestra que no hay alteración estructural en ninguno de los órganos, lo cual concuerda con los datos de Ali y Khogali en 1984 que reportan que la estructura del hígado, corazón, riñón, cerebro y cerebelo de pollo no es afectada con la administración de 0.04% peso/peso de furazolidona durante 10 días o una dosis de 40 y 80 mg/kg de peso corporal durante 5 días (7).

#### VIII. CONCLUSIONES:

- 1.- La dosis diaria de 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal utilizando como vehículo la metil celulosa es letal para los conejos.
- 2.- La dosis ascendente 10-20-40 mg. de furazolidona/kg de peso corporal induce a los 8 meses la oligospermia incompatible con la fertilidad siendo ésta reversible 9 meses después de suspendido el tratamiento.
- 3.- La dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona /kg de peso corporal induce a los 9 meses la oligospermia incompatible con la fertilidad siendo ésta reversible 10 meses después de suspendido el tratamiento.
- 4.- El mayor índice de malformaciones y mortalidad espermática en ambos esquema coincide con la oligospermia.
- 5.- La motilidad espermática disminuye significativamente coincidiendo con la oligospermia.
- 6.- Todas las alteraciones en los diferentes parámetros son reversibles después de suspendido el tratamiento recuperando los valores normales.
- 7.- El volumen del eyaculado no es afectado con el tratamiento con furazolidona.
- 8.- Los niveles hormonales de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona no se alteran con los esquemas de tratamiento 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona /kg de peso corporal.
- 9.- El consumo de alimento y peso corporal no sufren alteraciones bajo los dos esquemas de tratamiento.
- 10.-Las alteraciones histológicas a nivel de riñón presentadas por el conejo 17 no interfieren con su fertilidad.
- 11.-La administración de furazolidona a dosis de 10-20-40 y 30-45 mg/kg de peso corporal no afectan el número ni apariencia macroscópica de la descendencia.
- 12.-Los tiempos a los que se logró inducir la oligospermia (8 y 10 meses) son demasiado largos para cumplir con el objetivo de la anticoncepción.
- 13.-Los tiempos en los que se logra la recuperación (3, 6 y 9 meses) no son los apropiados para el restablecimiento de la fertilidad.
- 14.-Se deberán realizar otros experimentos piloto para encontrar las dosis y los esquemas de tratamiento adecuados.

#### VIII. CONCLUSIONES:

- 1.- La dosis diaria de 50 mg de furazolidona/kg de peso corporal utilizando como vehículo la metil celulosa es letal para los conejos.
- 2.- La dosis ascendente 10-20-40 mg. de furazolidona/kg de peso corporal induce a los 8 meses la oligospermia incompatible con la fertilidad siendo ésta reversible 9 meses después de suspendido el tratamiento.
- 3.- La dosis ascendente de 30-45 mg de furazolidona /kg de peso corporal induce a los 9 meses la oligospermia incompatible con la fertilidad siendo ésta reversible 10 meses después de suspendido el tratamiento.
- 4.- El mayor índice de malformaciones y mortalidad espermática en ambos esquemas coincide con la oligospermia.
- 5.- La motilidad espermática disminuye significativamente coincidiendo con la oligospermia.
- 6.- Todas las alteraciones en los diferentes parámetros son reversibles después de suspendido el tratamiento recuperando los valores normales.
- 7.- El volumen del eyaculado no es afectado con el tratamiento con furazolidona.
- 8.- Los niveles hormonales de testosterona, dihidrotestosterona y androstendiona no se alteran con los esquemas de tratamiento 10-20-40 y 30-45 mg de furazolidona /kg de peso corporal.
- 9.- El consumo de alimento y peso corporal no sufren alteraciones bajo los dos esquemas de tratamiento.
- 10.-Las alteraciones histológicas a nivel de riñón presentadas por el conejo 17 no interfieren con su fertilidad.
- 11.-La administración de furazolidona a dosis de 10-20-40 y 30-45 mg/kg de peso corporal no afectan el número ni apariencia macroscópica de la descendencia.
- 12.-Los tiempos a los que se logró inducir la oligospermia (8 y 10 meses) son demasiado largos para cumplir con el objetivo de la anticoncepción.
- 13.-Los tiempos en los que se logra la recuperación (3, 6 y 9 meses) no son los apropiados para el restablecimiento de la fertilidad.
- 14.-Se deberán realizar otros experimentos piloto para encontrar las dosis y los esquemas de tratamiento adecuados.

IX. BIBLIOGRAFIA:

- 1.- ALBERTS, B. et al. 1989. Molecular Biology of THE CELL. Second Edition. New York & London. pp 613-629
- 2.- ALBERT, P.S. et al. 1974. Nitrofuranos: Sperm immobilizing agents. Their tissue toxicity and clinical application. Urology 4: 307-310.
- 3.- ALBERT, P.S. et al. 1975. Nitrofurans: As sperm immobilizing agents. Their tissues toxicity and their chemical application. Brit. J. Urol. 47: 459-462.
- 4.- ALI, B.H. et al. 1983. The effect of furazolidone on fertility of male chickens. Comp Biochem. Physiol. 78(1): 43-47.
- 5.- ALI, B.H. 1983. Some pharmacological and toxicological properties of furazolidone. Vet. Res. Commun. 6: 1-11.
- 6.- ALI, B.H. 1983. The effect of furazolidone on the adrenal glands of the chickens. The Veterinary Quarterly. 5 (4): 190-192.
- 7.- ALI, B.H. and A.KHOGALY. 1984. Plasma and histological changes in furazolidone treated chickens. Research in Veterinary Science 37: 290-292.
- 8.- BENDER, R.C. and H.E. PAUL. 1951. Metabolism of the Nitrofurans. Pharmacol. 191 : 217-222.
- 9.- BRIAND, M. and J. M. LAPORTE. 1985. Inhibition of conjugal transfer of R. plasmids by nitrofurans. J. of Gen. Microbiology. 131 : 2281 - 2284
- 10.- BUZARD, J.A. et al. 1956. Colorimetric determination of nitrofurazone, nitrofurantoin and furazolidone in plasma. Antibiotics and Chemoterapyc. 6(12): 702-707.
- 11.- BUZARD, J.A. et al. 1956. Colorimetric determination of nitrofurazone and furazolidone in feed and premixes. Association of official agricultural chemists. 39(2): 512-518.
- 12.- CALESNICK, B. 1958. Amer. J. Med. Sci. 236: 736 - 746. citado en 76
- 13.- CHAPMAN, J. D. et al. 1973. Radiation chemical studies with nitrofurazone as related to its mechanism of radio sensitization. Radiation Res. 53: 190 - 203
- 14.- CHAPMAN, J. D. et al. 1974. Effectiveness of nitrofurans derivatives in sensitizing hypoxic mammalian cells to X - rays. Brit. J. Radiol. 46: 623 - 630

- 15.-CHATTERJEE, C. M. et al. 1983. DNA damage, prophage induction and mutation by furazolidone. Chem. Biol. Interactions. 45: 315 - 326
- 16.- COHEN, M. M. & M. SAGI. 1979. The effect of nitrofurans on mitosis, chromosome breakage and sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. Mutation Research. 59: 139 - 142
- 17.- CRAINE, M.E. & H. R.WILLIAMS. 1972. Metabolites of furazolidone in urine of chickens. J. Pharmaceutical Sci. 61(9): 1495-1497
- 18.- CZARNECKI, C.M. & E.F. JANKUS. 1975. Effect of furazolidona on heart weights and myocardial moisture content in turkey poults. Avian Diseases. 3(19): 622-625.
- 19.- CZARNECKI, C.M. & O.A. EVANSON. 1983. Myocardial calcium levels in furazolidone-induced cardiomyopathy in turkey poults. Comp. Biochem. Physiol. 75C: 207-209.
- 20.- CZARNECKI, C.M. et al. 1983. Delayed-T-cell maturation and suppression of mitogen-induced blastogenesis in turkey poults fed cortisone acetate and furazolidona. Avian Disease. 4(27): 1051-1057.
- 21.- DODD, M.C. & W.B. STILLMAN. 1944. The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivates. J. Pharmacol. Exper. Therap. 82: 11.
- 22.- DODD, M.C. 1946. J. Pharmacol. Exper. Therap. 86: 311. Citado en 26.
- 23.- FONASTSCH, C. 1977. Effect of nitrofurantoin of meiosis of the male mouse. Human Genetics. 39: 345-351.
- 24.- FRIEDGOOD, C.E. & M.N. GREEN. 1950. The effect of nitrofurazone on growth of fibrosarcoma in mice. Cancer Res. 10: 613-615.
25. - FRIEDGOOD, C.E. & C.B.RIPSTEIN. 1951. Effect of nitrofurazone on tumors of the testis and prostate gland. Surg. Forum. 2: 329-339.
- 26.- GERSTMANN, P. E. & G. D. La VECK. 1963. Amer. J. Public. Health. 53: 266 - 273. Citado en 76.
- 27.- GOMEZ, W.R. 1970. Chemicals agents affecting testicular function and male fertility. Academic. Press. 438.
- 28.- GREEN, M.N. & C.E. FRIEDGOOD. 1948. Action of furacin in delaying growth of a transplanted fibrosarcoma in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 69:603-604.
- 29.- GWATHMEY, J.K. 1984. The effect of digitalis or propranolol on furazolidone-induced cardiomyopaty in turkey poults. Dissertation Abstracts International. 9(44): 2605B.

- 30.- HAFEZ, E.S.E. 1980. Human reproduction. Conception and contraception. Male contraception. Harper and Row. 2a. Ed. pp. 849-853.
- 31.- HAYLLAR, L.B. et al. 1960. J. Urol. 84: 565. Citado en 42
- 32.- HERNANDEZ, J.P. et al. 1982. Estudio ultraestructural de la morfología del testículo de gallo después del tratamiento con furazolidona. Arch. Invest. Med. México. 14: 1-8.
- 33.- HERNANDEZ, J. P. et al. 1985. Effect of furazolidone on spermatogenesis in mice: a fertility and morphophysiological correlation. Neurobi. Kenya. 52: 22-25.
- 34.- HOLLIFIELD, R.D.T. & J.D. CONKLIN. 1968. J. Pharm. Sci. 57: 325. Citado en 54.
- 35.- JANKUS, E.F. et al. 1972. Furazolidone- induce cardiac dilatation in turkeys. Avian Diseases. Research Note. 958-961.
- 36.- KOEDA, T. et al. 1977. Subacute toxicity of furazolidone for guinea pig after two month's administration changes on adrenal glands, testis, and stomach. Ann. Rep. Nat. Vet. Assay 14: 21-30
- 37.- KONDRA, P.A. & W.GUENTER. 1968. effect of nitrofurazone and furazolidone on reproduction in chickens. Poult. Sci. 47: 1642-1643.
- 38.- KURODA, Y. 1975. Mutagenesis in cultured human diploid cells, III. Induction of 8-azaguanine-resistant mutation by furyl furamide. Mutation Research. 30: 229-238.
- 39.- LANDAIS, G.M. et al. 1975. Non- absorption of furazolidone from the vagina in women. Current. Therapeutic. Research. 3(18): 510-512.
- 40.- LANDAIS, G.M. et al. 1976. Non-absorption of nitrofurazone from the urethra in men. Current. Therapeutic. Research. 5(19): 550-553.
- 41.- MAIMON, M.C. & M. SAGI. 1979. The effect of nitrofurans on mitosis, chromosome breakage and sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. Mutation Research. 59: 139-142.
- 42.- McCALLA, D.R. et al. 1971. "Activation" of nitrofurazone in animals tissues. Bioch. Pharm. 20: 3532-3537.
- 43.- McCALLA, D.R. & D. VOUTSINOS. 1974. On the mutagenicity of nitrofurans. Mut. Res. 26: 3-16.
- 44.- MUSGRAVE, M.E. & H.G. ARM. 1959. Antibiotic. Med. Clin. Therapy. 7: 17-20.

- 45.- NAOMICHI, I. et al. 1976. Mutagenic effects of AF - 2, a food additive, on embryonic cells of the syrian golden hamster on transplacental application. Mutation Research. 41: 351 - 360
- 46.- NELSON, W.O. & E. STEINBERGER. 1953a. Effect of nitrofurans compounds on the testis of the rat. Fed. Proc. Am. Physiol. Soc. 12: 103.
- 47.- NELSON, W.O. & E. STEINBERGER. 1953b. Failure of pregnancy in rats treated with furadroxyl. Anat. Record. 115: 352.
- 48.- NELSON, W.O. & R.G. BUNGE. 1957. Effect of therapeutic dosage of nitrofurantoin (Furadantin) upon spermatogenesis in man. J. Urol. 77: 275-281.
- 49.- NELSON, W.O. & D.J. PATANELLI. 1961. Fed. Proc. 20: 418. Citado en 76.
- 50.- OLIVARD, J.S. et al. 1962. Med. Pharm. Chem. 5: 524. Citado en 42.
- 51.- OLIVE, P.L. & D.R. MCCALLA. 1975. Damage to mammalian cell DNA by nitrofurans. Cancer Research. 35: 781-784.
- 52.- OLIVE, P.L. & D.R. MCCALLA. 1977. Citotoxicity and DNA damage to mammalian cells by nitrofurans. Chem. Biol. Interaction. 16: 223-233.
- 53.- OLIVE, P.L. 1978. Nitrofurazone-Induce DNA damage to tissue of mice. Chem. Biol. Interactions. 20: 323-331.
- 54.- OMER, V.V. 1978. Efficacy and toxicity of furazolidone in veterinary medicine. Vet. Med./Sm. Anim. Clin. 73: 1125-1132.
- 55.- PAUL, H.E. et al. 1952b. Effect of furacin on the in vitro metabolism of mammalian tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79: 555-558.
- 56.- PAUL, H.E. et al. 1960. Metabolism of nitrofurans. J. Med. Pharm. Chem. 2: 563.
- 57.- PLAMM, D. et al. 1967. Hemmung der monoamin oxydase durch bakteriostatisch wirksame nitrofurane derivative. Naum. Schm. Arch. Pharmak. Exp. Path. 256: 281-300.
- 58.- POLITANO, V.A. et al. 1958. Use of furacin in treatment of testicular tumors. A case report. J. Urol. 79: 771-774.
- 59.- POWERS, M.D. et al. 1983. Monoamine oxidase inhibition and furazolidone-induced cardiomyopathy in turkey poults. Poultry Science 62: 1850-1855.
- 60.- PRIOR, J.T. & J.H. FERGUSON. 1950. Cytotoxic effects of a nitrofurane on the rat testis. Cancer. 3: 1062-1072.

- 61.- PRYTHERCH, J.P. et al. 1984. General reproduction, perinatal-postnatal and teratology studies of nitrofurantoina macrocrystals in rats and rabbits. J. of Toxicology and Environmental Health. 13: 811-823.
- 62.- RAYCHAUDHURI, S. N. et al. 1970. Effects of furazolidone on the macromolecular synthesis and morphology of Vibrio cholerae cells. Biochem. Biophys. Acta. 222: 637.
- 63.- REUVERS, A.P. et al. 1972. Potencial use of nitrofurans in radiotherapy. Nature. 237: 402-403.
- 64.- SATORU, K. et al. 1977. Furazolidone-induced changes in testis, ovary and stomach of rats. Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. 74: 30-38.
- 65.- SIDOROV, I. & LÜDERS. 1971. Untersuchungen des plasma corticosteron Spiegels von ken nach orale applikation von furazolidone. Dent. Tierärztl. Wschr. 78: 375 - 378
- 66.- STEINMERGER, E. & G. E. DUCHOTT. 1964. Effects of sex steroids on furadoxyl-induced damage to rat testes. Anat. Rec. 148: 340
- 67.- SZCZUKOWSKI, M.J. et al. 1958. Metastatic testicular tumor treated with nitrofurazona. J. A. M. A. 167: 1066-1068.
- 68.- TATSUMI, et al. 1981. Metabolism of furazolidone by milk xanthine oxidase and rat liver 9000g, supernatant: formation of a unique nitrofurant and aminofuran derivate. Arch. of Biochem. and Biophysics. 208(1): 167-174.
- 69.- TATSUMI, et al. 1984. Metabolism "in vivo" of furazolidone. Evidence for formation of an open chain Carboxylic acid and alfa-Ketoglutaric acid from the nitrofurant in rats. Arch. Biochem. and Biophysics. 234(1): 112-116.
- 70.- TAZIMA, Y. et al. 1975. Mutagenicity of nitrofurans derivatives, including furylfuramide, a food preservative. Mut. Res. 32: 55 - 80
- 71.- TENNENT, D.M. & W.H. RAY. 1963. Fed. Proc. 22: 367. Citado en 72.
- 72.- TENNENT, D.M. & W.H. RAY. 1971. Metabolism of furazolidone in swine. P. S. E. B. M. 138: 808-810.
- 73.- TONOMURA, A. & M.S. SASAKI. 1973. Chromosome aberrations and DNA repairs synthesis in cultured human cells exposed to nitrofurans. Jap. J. Genet. 48: 291-294.
- 74.- UMEDA, M. et al. 1975. Mutagenic activity of furylfuramide on cultured mouse cells. Jap. J. Exp. Med. 45: 161-170.



- 75.- VAN VLEET, J.F. et al 1982. Congestive cardiomyopathy induced in ducklings fed graded amounts of furazolidone. Am. J. Vet. Res. 1(44): 76-85.
- 76.- VILLASEÑOR, M.J. 1968. Consideraciones farmacológicas y aplicaciones de los nitrofuranos. Norwich Pharmacol of México. 82-90.
- 77.- WANG, C.Y. & L.H. LEE. 1976. Mutagenic activity of carcinogenic and non carcinogenic nitrofurans and of urine of rats fed these compounds. Chem. Biol. Interact. 15: 69-75.
- 78.- WILDERMUTH, O. 1955. Testicular cancer: management of metastases, with report of a new chemotherapeutic agent. Radiology. 65: 599 - 602
- 79.- YAHAGI, T. et al. 1974. Relationships between the carcinogenic and mutagenic or DNA-modifying effects of nitrofurans derivatives, including 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) Acrylamide, a good additive. Cancer Res. 34: 2266-2273.
- 80.- YAHAGI, T. et al. 1976. Mutagenicities of nitroFuran derivatives on a bacterial testers strain with an R factor plasmid. Mut. Res. 40: 9-14.
- 81.- YANKUS, E. F. et al. 1972. Furazolidone-induce cardiac dilatation in turkeys. Avian diseases. Research Note. 958 - 961
- 82.- YUNDA, I.F. & Y.I. KUSHNIROK. 1974. Effect of nitroFuran preparation on spermatogenesis. Bull. Exp. Biol. Med. 77: 68-77.
- 83.- ZAMARO, Q.M.A. et al. 1985. Efecto de la furazolidona sobre el semen de gallos. IX Congreso Latinoamericano de Avicultura. XXIV Congreso Nacional de Avicultura. X Convención Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Acapulco, Guerrero, México. 325-332.
- 84.- ZERMEÑO, H.A. & M.L. PAASCH. 1984a. Evaluación de las lesiones producidas en el testículo de gallos reproductores por furazolidona. Veterinaria, México. 15: 263-266.
- 85.- ZERMEÑO, H.A. & H.L. PAASCH. 1984b. Evaluación y cuantificación de las lesiones producidas en el testículo de aves reproductoras por la furazolidona a diferentes dosis. IX Congreso Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas. Guanajuato, México. 38-46.

## X. ANEXO:

### 1.- Conteo de espermatozoides en la Cámara de Neubauer:

a) Tomar una muestra del eyaculado y realizar una dilución 1/10 en azida de sodio al 0.2% y agitar.

b) Descartar las dos primeras gotas y colocar la tercera en la cámara de Neubauer.

c) Hacer la observación con un microscopio de luz con objetivos de 10 y 40X, para poder enfocar perfectamente cada subcuadrante de la cámara, así como los espermatozoides contenidos en los mismos (fig. 2).

d) Una vez enfocado el cuadrante general (como se ilustra en la figura 2a), únicamente se tomarán en cuenta para el conteo de espermatozoides que se encuentren en los subcuadrantes: I, II, III, IV y V (fig. 2b).

e) En cada subcuadrante el conteo se realizará en zig-zag de izquierda a derecha

f) De cada subcuadrante se contarán únicamente los espermatozoides que se encuentren dentro del mismo y sólo se considerarán aquellos que estén situados en las orillas internas de cada subcuadrante, excepto el subcuadrante V, en el que se tomarán en cuenta los espermatozoides que se encuentren en todas las líneas, (fig. 2b).

g) Realizar el conteo con un contador Press Keys (Clay-Adams).

h) Cada conteo se realizó por duplicado con un contador Press Keys (Clay-Adams) promediándose los valores y multiplicando por 500,000, factor que considera la dilución y a los demás subcuadrantes. Así se podrá obtener la concentración espermática por milímetro cúbico de eyaculado por organismo.

La cámara de recuento está formada por portaobjetos grueso rectangular de vidrio. En el centro de la superficie superior se encuentran cuadrículas, separadas del resto del portaobjetos por surcos, y por dos barras transversales elevadas, una a cada lado de la cuadrícula. La cuadrícula en cuestión se encuentra en el centro del área central.

Cuando se coloca sobre las barras elevadas un cubreobjetos ópticamente plano se forma entre el cubreobjetos y la cuadrícula una cámara de mediciones precisas. La cuadrícula a su vez, presentan líneas que forman una imagen que representa múltiplos de milímetro cuadrado.

La dilución de la muestra se puede hacer con una pipeta de dilución que se llena hasta el nivel establecido.

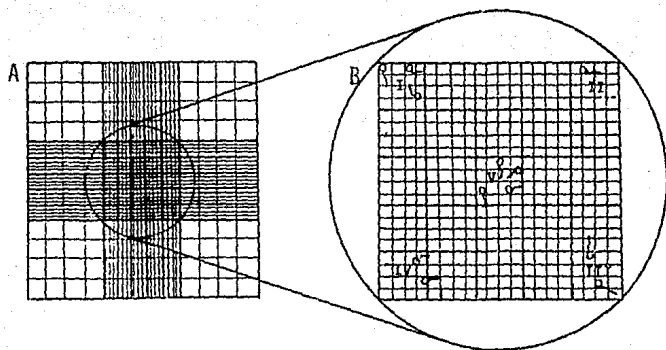


Figura 2. Cámara de Neubauer. Se muestra en A el cuadrante general y en B los subcuadrantes.

La suspensión diluida de células se introduce en la cámara de recuento, y se espera que las células se sedimenten. Luego se cuenta el número de ellas en la o en las zonas deseadas. Las células que cubren o tocan las líneas intermedias superior o izquierda se incluyen en el área de recuento; las correspondientes a bordes inferior y derecho no se incluyen. La distancia entre la superficie inferior del cubreobjetos, colocadas sobre las barras elevada, y la cuadrícula es de 0.1 mm. Cada zona de la cuadrícula corresponde a un cuadrado de 3 mm de lado, dividido en nueve cuadrados grandes cada uno de 1 mm de lado. El cuadrado central se divide a su vez en 400 cuadrados pequeños; dispuestos en 25 grupos de 16 limitados por líneas triples. Cada cuadro representa 1mm cuadrado, y cada uno de los 25 cuadrados pequeños tiene 0.2 mm de lado (0.04 mm cuadrados de superficie); cada uno de los 400 cuadrados menores tienen 0.05 mm de lado (0.0025 mm cuadrados de superficie).

## 2.- Método para la determinación cuantitativa de andrógenos (testosterona, androstendiona y 5-alfa-dihidrotestosterona):

La determinación cuantitativa de los andrógenos consta de varias etapas: preparación, trazadores, extracción, separación y radioinmunoanálisis.

a) Preparación.- incluye procedimientos previos al manejo de los esteroides. El primer paso es hacer un protocolo en el que se describe el seguimiento de los pasos involucrados e inscribiendo en él los pormenores e incidentes ocurridos, durante el desarrollo. Se hace una lista en numeración corrida, los que correspondencia a la clave o identificación de la muestra específica de que se trate. En la lista numérica se procura formar lotes de 8 muestras, las que llevarán los números que tengan como último dígito del 2 al 9 dejando a los dígitos terminales 1 y 0 para los llamados blancos del método (tubos que deberán tener idéntico tratamiento que las muestras, pero en los que no habrá esteroides, por lo que al final deberán tener una concentración de 0). En el caso de los controles de calidad se agregan por quintuplicado 5 tubos a los que se les agregan cantidades conocidas de esteroides (25 y 250 pg), mismos que deberán ser recuperados al final del procedimiento.

b) Trazadores.- en tubos de centrifuga con tapón (de vidrio, fondo cónico, 15 ml de capacidad), se colocan 100 microlitros de soluciones etanólicas de cada uno de los esteroides a determinar, que contienen aproximadamente mil cuentas por minuto (cpm), asimismo se colocan en viales y por separado, idénticas alícuotas, éstas últimas servirán como controles de referencia en la evaluación de las pérdidas de material durante los procedimientos subsiguientes. Después de la colocación de los trazadores se agrega la muestra, en nuestro caso hasta 1 ml de suero de conejo y se agita 5 segundos para asegurar la incorporación de los trazadores al resto de los componentes del

suero (la presencia de 30 microlitros de etanol no modifica en forma notable la solubilidad de los componentes normales del suero; en todo caso, dada la miscibilidad del etanol con el agua, la estabilidad de los componentes poco solubles-lípidos- sería incrementada).

c) Extracción.- no obstante la naturaleza lipídica de los esteroides, éstos se encuentran disueltos en el suero, tanto por la capacidad propia del poder de disolución de los esteroides y el agua, como por la presencia y efectos del resto de los componentes séricos. Ya que los esteroides están disueltos en el suero sanguíneo, se requiere extraerlos. Al tubo de extracción ya preparado se agregan 5 ml de éter dietílico (disolvente orgánico de polaridad adecuada para la extracción de los esteroides e inmiscibles con el agua), se pone el tapón de vidrio y se agitan en el agitador por vibración, procurando que el remolino llegue hasta el tapón, ya que la fluidez del éter le permite salir entre las paredes del tapón y del tubo, la posible fuga del éter se ve favorecida por el incremento de la presión interna debida a la rápida evaporación del disolvente orgánico. La agitación debe ocurrir durante 1 minuto y debe permitir la formación de pequeñas gotas de éter en el suero y de suero en el éter; después de agitados los tubos deberán permanecer en reposo para que se separen las dos fases y que la separación entre ellas sea clara (la fase acuosa más densa queda bajo la fase orgánica). La fase acuosa se congela colocándo los tubos en un baño de acetona con hielo seco, las propiedades de las fases permiten que la fase acuosa se congele en un sólo cuerpo sólido mientras que en la fase orgánica sólo se forman pequeños núcleos de cristalización, cuando las fases no se han separado completamente pueden quedar pequeños fragmentos de agua congelada, suspendida en el éter líquido. La fase orgánica es decantada a tubos de centrifuga (de vidrio, de fondo cónico, de 15 mililitros de capacidad), ya que la mayor parte del éter permanece líquido y que los pocos cristales de éter sólido formados se funden rápidamente a la temperatura ambiente, 18-22°C, se recupera casi la totalidad del disolvente de extracción, quedándo remanentes en los tubos entre 100 y 200 microlitros (2-4%); no se debe permitir que se pierda más del 10%- 0.5 mililitros. La fase orgánica se evapora hasta sequedad en horno a 30°C y presión reducida a 0.1 atm. ya que el proceso de evaporación en particular del éter etílico enfría los tubos, se debe de evitar que se condense agua en el interior de los tubos, por efecto de la temperatura y de reducir la presión, el éter empieza a ebullicar; se deberán tomar medidas pertinentes a fin de evitar la contaminación de las muestras entre sí y de la pérdida de material. Ya evaporado cualquier líquido contenido en los tubos, se puede proceder a la separación de los esteroides.

d) Separación.- entre los múltiples procedimientos cromatográficos aplicables a los esteroides se eligió la cromatografía en capa fina de sílica-gel, ya que se adapta en forma adecuada a nuestros propósitos. Se utilizaron cromatoplasas de sílica-gel G-60 F.254, con espesor de 0.25 milímetros sobre un soporte de vidrio de 20 X 20 cm (Merck). En uno de los lados de

la cromatoplaque se marcó con un lápiz una línea a 2 cm del borde que servirá de origen para el sistema; sobre la línea de origen se marcan 10 líneas de 1.0 cm de longitud, separados entre sí por espacios de 0.5 cm, procurando que todas ellas queden en la zona central de la línea de origen, hacia los extremos, a dos centímetros de las muestras y a 1.5 cm del borde lateral se marcan las zonas de los estándares cromatográficos. Si se tomaran las acciones indicadas en la "preparación" en cada cromatoplaque quedarían 10 tubos, el primero y el último de cada placa serán "blancos" y las muestras quedarán en el centro de la cromatoplaque.

De nuevo con un lápiz se marca bajo cada zona de 1 cm, el número del tubo correspondiente. Se hace la transferencia del extracto étereo a la correspondiente zona de aplicación, primero se agregan de 6 a 7 gotas de una mezcla de éter dietílico-metanol (9:1), sobre las paredes del tubo que contiene el extracto, de manera que el líquido disuelva y concentre el extracto en el fondo del tubo. Después, el extracto disuelto es transferido con una pipeta Pasteur con la punta adelgazada como un capilar; de manera que la solución pase a la sílica sin raspar la superficie de la misma; la zona de aplicación no deberá extenderse por más de dos milímetros de la línea de origen por lo que la operación de transferencia deberá repetirse cuantas veces sea necesario, para hacer que la totalidad del extracto sea colocado en la línea de origen; después de transferir el remanente de las primeras gotas del disolvente, se repetirá la operación con 4-5 gotas de la misma mezcla y se hará una tercera limpieza de los tubos con 2-3 gotas de la misma solución antes mencionada y haciendo la transferencia en cada caso con todas las precauciones indicadas. Cuando todos los extractos han sido transferidos a las correspondientes áreas de aplicación, se aplican los estándares de cromatografía de soluciones de los esteroides séricos. Las soluciones de los estándares tienen una concentración de 1 miligramo por mililitro. La aplicación de los estándares servirá para la localización e identificación de las áreas de desarrollo de cada esteroide; la aplicación de los estándares cromatográficos se realiza con una jeringa Hamilton en forma de un círculo de no más de 2 milímetros de diámetro, con el centro en la línea de origen. Las cromatoplaques se colocan en las cámaras con los disolventes para el desarrollo y separación de los esteroides, por pares, con la línea de origen hacia abajo y la superficie sílica hacia el centro, pero recargados contra las paredes de la cámara cromatográfica, se colocan en la cámara que contiene aproximadamente 100 mililitros de benceno puro, las cámaras se tapan y se agregan pesos sobre las tapas de manera que los vapores del disolvente no puedan salir de la cámara, ya que de ser así la atmósfera estaría insaturada e impediría el avance del disolvente. El movimiento del disolvente es ascendente por lo que al pasar por la línea de origen se inicia el proceso de competencia, entre la fuerza de adsorción de los esteroides con la sílica por una parte y la fuerza de disolución de los esteroides hacia el disolvente; dado que la adsorción de los esteroides depende de la polaridad de los mismos, se requerirá de disolventes o mezcla de disolventes con la polaridad adecuada para hacer migrar a los distintos esteroides, permitiéndoles manifestar las pequeñas diferencias de polaridad relativa entre

ellos. El primer sistema benceno 100% sólo mueve a los esteroides de polaridad menor y sólo algunos milímetros (5-10 milímetros), pero si mueve a compuestos menores polares como colesterol y ácidos grasos de cadena larga, saturadas e insaturadas, lo que en principio limpia la muestra de posibles interferentes, que se encuentran como componentes normales del suero. El disolvente se deja llegar hasta el borde superior (90-120 minutos), se destapa la cámara, sin tocar la sílica, se sacan las cromatoplas, con cuidado de no gotear el exceso de disolvente, sobre la otra placa.

Se dejan en posición horizontal sobre la mesa, para facilitar la evaporación del disolvente, la cámara es vaciada y secada con la ayuda de un ventilador de mano. A la cámara se agregan aproximadamente 100-125 mililitros, de la mezcla de benceno-acetato-etilo en 7:3; las cromatoplas ya secas de benceno se vuelven a introducir a la cámara con iguales precauciones, de nuevo el disolvente se deja llegar hasta el borde superior, siguiendo los mismos pasos y cuidados, se colocan en un tercer sistema de benceno-metanol 9:1. Se hace notar que la polaridad de los disolventes (puros y/o mezclas) es cada vez mayor. El resultado del desarrollo por los 3 sistemas cromatográficos se revela al colocar la cromatoplas bajo la luz ultravioleta (UV) de 254 nm, el componente F.254 en la cromatoplas, permite que la luz UV haga aparecer a la sílica con una fluorescencia verdosa, en aquellos lugares en donde exista algo con capacidad de absorber esta longitud de onda, impedirá que la luz UV llegue al componente fluorescente y será observado como una zona morada o violeta. La luz UV de 254 es característicamente absorbida por sistemas de dobles enlaces conjugados de átomos de carbono o bien de sistemas alfa-ceto insaturados, por lo que los esteroides de la serie A<sup>3</sup> cetona pueden absorber este tipo de longitud de onda, la Testosterona y la Androstendiona tienen sistema A<sup>3</sup> cetona en su estructura por lo que los dos microgramos de esteroide estándar se observan fácilmente sobre el fondo verdoso de la cromatoplas; con lápiz se marcan los contornos de las áreas de desarrollo de ambos estándares, en los dos lados de la cromatoplas se hace notar que las áreas paralelas en las zonas de muestras no se observa ninguna mancha morada ya que las cantidades de A y T de las muestras son varios ordenes de magnitud menores a la de los estándares. Dado que la 5-alfa-dihidrotestosterona no posee la característica de absorber la luz UV, se revela por la formación de un compuesto colorido al realizar la reacción de Zimmerman, se agrega metadinitrobenzono en medio alcalino con una pipeta Pasteur en una línea recta que una las áreas reveladas de A y T, se calienta con una pistola de aire y la dihidrotestosterona reacciona formando una línea de color rosado que cambia a morado, se marcan los límites superior e inferior de la línea coloreada.

Revelados los 3 esteroides estándares, se marcan las áreas paralelas trazando líneas horizontales desde el borde superior del estándar más alto y desde el borde inferior del estándar más bajo, para cada esteroide implicando así una gran zona en la que deberían poder localizarse los mismos esteroides pero de las muestras, se marcan así mismo con líneas verticales, los límites

izquierdo y derecho de cada zona de aplicación quedando así una cuadrícula en los que se localizan las áreas de desarrollo de cada esteroide para cada muestra. A estas zonas se les raspa la sílica en la que se encuentran adsorbidos los esteroides utilizando para ello una navaja, el polvo y los fragmentos de sílica desprendidos son absorbidos mediante vacío hacia una pipeta Pasteur, la que ha sido previamente empacada con fibra de vidrio, formándose así una pequeña columna de sílica que contiene sólo uno de los esteroides, la operación es repetida utilizando muchas pipetas empacadas como áreas de ocupación de los esteroides a determinar. Los esteroides contenidos en cada pequeña columna de sílica son eluidos con 1.2 mililitros de la mezcla de disolventes, éter dietílico metanol (9:1), hacia tubos de vidrio de 10 X 75 milímetros en los que se coleccionan aproximadamente 1050-1100 microlitros, la alución se realiza en forma rápida en grupos de 10 tubos e inmediatamente los tubos se agitan de 1 a 2 segundos en el agitador por vibración procurando no sacar el líquido, se toman dos alícuotas iguales de 500 microlitros, la primera se coloca en tubos de ensayo de 10 X 75 milímetros y la segunda a viales de conteo, ambos marcados previamente con el código de muestra y esteroide correspondiente. Las dos alícuotas se evaporan a sequedad, la de los tubos para radioinmunoanálisis, las muestras de los viales son para la evaluación de las pérdidas de material radioactivo agregado en la etapa de preparación, a estos últimos viales de preparación y los controles correspondientes, se les añade 5 mililitros de líquido de centelleo Fluor (tolueno-PP0-POPOP), se tapan y se agitan suavemente, se evalúa el contenido de radioactividad presente en cada nivel contando los centelleos en un espectrofotómetro de centelleo Packard 3390, durante períodos de 10 minutos.

e) Radioinmunoanálisis. La determinación cuantitativa por radioinmunoanálisis, se basa en el análisis por saturación, en el que una molécula demuestra tener capacidad de unir a S con cierta afinidad, la molécula P en determinada concentración es saturada con una población de S\*, y si se coloca en un medio con diversas concentraciones de S, podrían formarse dos tipos de complejos: PS y PS\*, dado que la unión de P y S o P y S\* no es definitiva se establecerá un equilibrio en donde habrá los dos tipos de complejo, pero la proporción de cada uno de ellos dependerá de las concentraciones relativas de S y S\*, en el radioinmunoanálisis, P es un anticuerpo y S es un esteroide ya sea androstendiona, testosterona o dihidrotestosterona y S\* es un esteroide idéntico pero marcado radiactivamente (<sup>3</sup>H).

En tubos de ensayo de vidrio de 10 X 75 milímetros marcados como curva, se agregan cantidades de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 50 000 pg de un esteroide, A (androstendiona), T (testosterona) o DHT (dihidrotestosterona), tomando alícuotas por triplicado de soluciones etanólicas de concentración conocida, el disolvente se evapora a sequedad. Se prepara una solución que contiene S\*, con cantidad suficiente para dar 5000 cpm en cada 500 microlitros de solución (solución en amortiguador de fosfatos 0.15 M con 0.1% de gelatina y 0.1% de azida de sodio), a la cual se agrega el suero de conejo que contiene los anticuerpos



antiesteroides específicos (T, 1:10000; A, 1:7:500 y DHT, 1:10000). De esta mezcla de ensayo, se agregan 500 microlitros de cada tubo de curva o muestra y se dejan en incubación a 4°C. durante 18-20 hrs. tiempo en el que se ha establecido el equilibrio. Para separar el S y el S\* libres remanentes de los complejos PS y PS\*, se añaden 200 microlitros de una suspensión de carbón activado y Dextrón T-70 (625-62.5 miligramos%), se agitan y se hacen sedimentar las partículas de carbón por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos a 4°C; los complejos PS y PS\* quedan en el sobrenadante, mientras que el S y S\* libres quedan ahora adsorbidos con las partículas de carbono, el sobrenadante se decanta a viales de conteo, a los que se agregan 5 mililitros de líquido de centelleo Instagel, se tapan y se agitan vigorosamente. El Instagel se agrega por la gran dificultad de evaporar 700 microlitros de agua, éste tiene un detergente por lo que puede incorporar el agua y formar una sola fase, haciendo posible el conteo de radioactividad. Se evalúa el contenido de radioactividad tanto de la curva como de las muestras.

Se realizan una serie de cálculos para obtener el dato de concentración de esteroides en las muestras.

Con los datos de la curva se calcula el porcentaje de unión neto, tomando como 100 por ciento la cantidad de cuentas de esteroides radioactivo, unido a la dosis de cero pg de esteroide no radioactivo y después de restar la llamada unión inespecífica (las cuentas obtenidas en los tubos de 50 000 pg, en un exceso de masa que debería desplazar a todo el esteroide radioactivo unido). Así a cada punto de la curva se le calcula su porcentaje unión neto el cual se expresa en su transformación Log<sub>e</sub>t. Como función del logaritmo de la cantidad de masa agregada para que nos dé una recta de pendiente negativa de la que se calcula su ecuación. Ya sea en forma manual o mecánicamente los porcentajes unión neto de cada muestra, se interpreta en la curva patrón obteniendo la respectiva cantidad de masa. Dado que al final de la etapa de separación se tomaron dos alícuotas iguales, la cantidad de trazador recuperado expresado como el porcentaje del total agregado al inicio, es equivalente a la cantidad de masa de esteroide remanente o contenida en la alícuota del tubo, por lo que se hace la corrección correspondiente y se obtiene la cantidad de masa de esteroide inicial; conociendo la alícuota de muestra tomada, la cantidad de esteroide inicial se transforma a términos de concentración pg/mililitros de cada esteroide y de cada muestra.