



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2022; 12:1-18. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.15>  
Artigo Original. Recebido:27/02/2022. Aceito:23/05/2022. Publicado: 10/08/2022. Chave: e2022-17.  
<https://www.youtube.com/watch?v=6d4WqxZqAqo>

## Efeito do coumestrol sobre o epidídimo dos cães adultos

Effect of coumestrol on the epididymis of adult dogs

James-Romero Artemisa<sup>1,2</sup> , Pérez-Rivero Juan<sup>2\*</sup> , Herrera-Barragán José<sup>2</sup> ,  
Aguilar-Setién Alvaro<sup>3</sup> , Pérez-Martínez Mario<sup>4</sup> 



<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México. <sup>2</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. <sup>3</sup>Unidad de Investigación en Inmunología, Instituto Mexicano del Seguro Social. <sup>4</sup>Departamento de Morfología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. \*Autor para correspondência: Juan José Pérez Rivero. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Edificio Wbis, piso 3. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco Calzada del Hueso 1100, Coyoacán CDMX, CP. 04960. Correo electrónico: mvzajr@yahoo.com, jjperez1\_1999@yahoo.com, jherrerab@correo.xoc.uam.mx, balantiopterix@gmail.com, drmvzmariomt@gmail.com

### RESUMO

A preocupação do excesso de população canina está relacionada com zoonoses como a raiva, que é responsável por 99% dos casos de raiva humana, causando a morte de aproximadamente 59.000 pessoas por ano. A esterilização cirúrgica é um método de controlo eficaz, dispendioso e invasivo com impacto limitado. Os efeitos dos fitoestrogénios na actividade reprodutiva têm sido geralmente estudados nas fêmeas, e um número limitado nos machos. Portanto, o objectivo deste estudo era determinar o efeito da administração subcutânea de coumestrol na actividade gonadal em cães adultos como uma alternativa para o controlo reprodutivo. Foram determinados parâmetros básicos de avaliação seminal, estrutura epididimal por ultra-sonografia, características histológicas, bem como a presença de coumestrol por fluorescência e níveis séricos de testosterona e estrogénio. A administração de coumestrol durante cinco semanas reduziu a produção de esperma, e mostrou alterações na equodensidade epidídima e celularidade, associadas às concentrações de estradiol e testosterona no soro. Por conseguinte, conclui-se que o coumestrol administrado subcutaneamente tem um efeito estrogénico que pode ser utilizado como método não invasivo para ajudar a controlar a fertilidade em cães adultos.

**Palavras-chave:** epidídimo, espermatozóides, estrogénios, fitoestrogénicos, testículos, cão, controlo reprodutivo.

### ABSTRACT

The concern of canine overpopulation is related to zoonoses such as rabies, which is responsible for 99% of human rabies cases, causing the death of approximately 59,000 people per year. Surgical sterilization is an effective, costly and invasive control method with limited impact. The effects of phytoestrogens on reproductive activity have been commonly studied in females and a limited number in males. Therefore, the objective of this study was to know the effect of subcutaneous administration of coumestrol on the gonadal activity of adult dogs as an alternative for their reproductive control. Basic seminal evaluation parameters, epididymal structure by ultrasonography, histological characteristics, as well as the presence of coumestrol by fluorescence and serum levels of testosterone and estrogens were determined. The administration of coumestrol for five weeks reduced sperm production, and evidenced changes in the echodensity and cellularity of the epididymis, associated with serum concentrations of estradiol and testosterone. Therefore, it is concluded that coumestrol administered subcutaneously has an estrogenic effect that can be used as a non-invasive method to help control fertility in adult dogs.

**Keywords:** epididymis, spermatozoa, estrogens, phytoestrogens, testis, dog, reproductive control.



## INTRODUÇÃO

A superpopulação canina é um problema mundial com impacto na saúde animal e pública (Rubel & Carbajo, 2019), uma vez que são uma fonte de problemas de saúde, políticos, socioeconômicos e de bem-estar, particularmente nos países em desenvolvimento. Estes problemas incluem a circulação nas ruas causando acidentes de trânsito, latidos, agressões e mordeduras. A crescente população de cães vadios nos países da América Latina é alarmante, com vários factores a contribuir para o aumento da sua população, sendo o mais comum o abandono pelos responsáveis, que é a principal causa do número de cães a vagarem pelas ruas ou a viverem em abrigos para cães (Mota-Rojas *et al.*, 2021). A principal preocupação da superpopulação canina está relacionada com doenças zoonóticas, especialmente a raiva canina, uma doença subdeclarada e negligenciada nos países em desenvolvimento, que é responsável por 99% dos casos de raiva humana mediada por cães em todo o mundo, matando anualmente cerca de 59.000 [intervalo de confiança de 95%: 25.000-159.200] pessoas em todo o mundo. Estão em curso esforços para reduzir a zero as mortes humanas devidas à raiva mediada por cães até 2030 (Hampson *et al.*, 2015; Hampson *et al.*, 2019).

A esterilização cirúrgica é o melhor método para impedir a reprodução e, conseqüentemente, a superpopulação de cães. No entanto, o impacto dos programas de esterilização tem sido limitado, principalmente devido aos elevados custos operacionais que tornam difícil chegar ao maior número possível de cães (Evans *et al.*, 2022; Belsare & Vanak, 2020). Devido a isto, o abate em massa continua a ser utilizado como o principal método de controlo populacional em grande parte do mundo, sendo mal aceite pela sociedade, pelo que a Organização Mundial de Saúde publicou directrizes em 1990 desencorajando o uso do abate e recomendando métodos alternativos, tais como métodos contraceptivos (Smith *et al.*, 2019).

Devido a isto, diferentes investigações têm-se concentrado em encontrar e propor métodos alternativos de controlo da fertilidade canina, incluindo a utilização de hormonas sintéticas (por exemplo, andrógenos sintéticos), esterilização química (por exemplo, gluconato de zinco neutralizado por arginina, cloreto de cálcio), imun contracepção (por exemplo, vacina inibidora da hormona gonadotropina) (Sandam *et al.*, 2021; Root Kustritz, 2018; Asa, 2018; Massei *et al.*, 2013), bem como, a utilização de ultra-sons terapêuticos a diferentes frequências (Leoci *et al.*, 2015), entre outros. No entanto, algumas metodologias podem apresentar efeitos adversos diferentes e não demonstraram ser totalmente eficazes (Sandam *et al.*, 2021; Asa, 2018; Root Kustritz, 2018). Por este motivo, a utilização de fitoestrogénios é considerada como um método complementar.



Os fitoestrogénios (FEs) são compostos polifenólicos derivados de plantas, divididos em vários grupos, incluindo isoflavonas (genisteína), lignanos (enterolactona), flavonas (luteolina), estilbenos (resveratrol) e coumestanos (coumestrol) (Adler *et al.*, 2015; Pérez-Rivero *et al.*, 2009). Têm estruturas semelhantes aos estrogénios endógenos e podem induzir ou inibir as respostas dos receptores hormonais porque têm a capacidade de se ligar aos receptores de estrogénio (RE) alfa (RE $\alpha$ ) e beta (RE $\beta$ ) localizados em tecidos de diferentes órgãos, incluindo os órgãos reprodutores. Esta ligação está com maior afinidade com RE $\beta$  (Rietjens *et al.*, 2017).

Algumas investigações indicam que os FE actuam como desreguladores endócrinos ao competirem com estrogénios endógenos para se ligarem aos seus receptores e podem produzir efeitos biológicos positivos ou negativos na saúde animal (Beszterda & Frański, 2018). Semelhante a qualquer droga, a intensidade do efeito no tecido alvo depende da dose ou da via de administração dos FE, uma vez que estes sofrem diferentes processos de absorção, biotransformação, distribuição e excreção. Além disso, os seus efeitos podem variar em função do fitoestrogénio, espécies expostas, sexo, via de administração, dose e duração da exposição, bem como o momento da exposição durante o desenvolvimento reprodutivo ou a vida adulta. Assim, os FE têm a capacidade de agir como estrogénios agonistas que produzem efeitos estrogénicos clássicos ou como antagonistas dos estrogénios (inibindo o efeito dos estrogénios) (Domínguez-López *et al.*, 2020; Mostrom & Evans, 2018).

Além disso, os EFs podem modular o eixo hipotálamo-hipófise, têm também a capacidade de inibir a expressão do mRNA aromatase (citocromo P450), resultando na diminuição da biossíntese local de estrogénios, resultando na inibição celular, incluindo a espermatogénese, participando como reguladores intracelulares do ciclo celular e da apoptose (Domínguez-López *et al.*, 2020; Lephart, 2015; Cerendolo *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2004).

Coumestrol (COU) está presente em alfafa (*Medicago sativa*), trevo branco (*Trifolium repens*), espinafre (*Spinacia oleracea*) e rebentos de soja (*Glycine max*) (Cerendolo *et al.*, 2009; Domínguez-López *et al.*, 2020). Tem a capacidade de agir como um disruptor endócrino de RE $\alpha$  e RE $\beta$ , que são amplamente distribuídos no aparelho reprodutor masculino durante o desenvolvimento e a idade adulta (Cooke *et al.*, 2021). No cão, foram detectadas RE em células intersticiais de Leydig, espermatids redondos, espermatogonia, e no tecido conjuntivo da epidídima (Serrano *et al.*, 2008).

Uma peculiaridade do COU é que pode ser detectado naturalmente por fluorescência quando se liga ao RE, é excitado a um comprimento de onda de 390-400 nanómetros (azul) e emite fluorescência a um comprimento de onda de 532-559 nanómetros (verde) (Wang *et al.*, 2014).



COU tem sido estudado como um possível método de controlo reprodutivo em cães. Nas cadelas, quando administrado oralmente, induz uma diminuição dos níveis de progesterona e um aumento dos valores de estrogénio sérico, sem afectar a celularidade do epitélio vaginal (Peña-Corona *et al.*, 2020). Nos homens, quando administrado oralmente, afecta a histoarquitectura do epitélio germinal dos tubos seminíferos (Pérez-Rivero *et al.*, 2009). O mesmo efeito também foi relatado em morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) em machos (Pérez-Rivero *et al.*, 2014).

Os espermatozóides que passam dos testículos para os epidídimos são gametas não funcionais, e é durante o seu trânsito através dos epidídimos que, através da sua interacção com proteínas, amadurecem, adquirem motilidade progressiva e a capacidade de fertilizar os ovos (Ali Hassan *et al.*, 2021; Cornwall, 2009), pelo que os epidídimos podem ser um alvo para o controlo reprodutivo de espécies consideradas transmissoras de doenças. Portanto, o objectivo deste estudo era determinar o efeito da administração subcutânea de coumestrol no epidídimo de cães adultos como alternativa para o controlo reprodutivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Bem-estar animal

O estudo foi aprovado com o número de protocolo DC-2017/2-4, pelo Comité Interno de Cuidados e Utilização de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Nacional Autónoma do México. Foi conduzido de acordo com os princípios dos 3 R's de investigação animal (NCRRAR).

### Animais

Foram incluídos dez cães machos entre 2 e 3 anos de idade, de raças diferentes, sexualmente maduros, com um peso médio de  $14 \pm 2,9$  kg. Clinicamente saudável com ambos os testículos escrotalizados.

### Experiência

Os cães foram divididos aleatoriamente em dois grupos com cinco cães cada: controlo (C) e tratamento com coumestrol (TCOU), e foram seguidos durante 5 semanas contínuas. Na primeira semana, o grupo TCOU recebeu uma dose única de 1,2 mg/kg subcutaneamente de coumestrol (COU, Sigma Aldrich® Lot# BCBH0742V Pcode: 101171142 e Lot# BCBN3969V Pcode: 101652427), dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co®) para dar uma concentração de COU de 100 µg/µl, que foi misturado com 300 µl de veículo quitosano. O Grupo C recebeu apenas DMSO e veículo chitosan na mesma quantidade e via de administração (Miranda-Castro & Lizarraga-Paulin, 2012).



## Estudos clínicos

Cada cão de ambos os grupos: C e TCOU, antes da administração do tratamento, na primeira semana da administração do tratamento e posteriormente todas as semanas por 4 vezes, foi submetido a quatro avaliações: avaliação da produção e qualidade seminal, ultra-som para avaliar testes e epidídimos e recolha de sangue para determinação de indicadores hormonais.

## Concentração de espermatozoides, morfologia e motilidade

Após a obtenção da ejaculação, a motilidade progressiva foi avaliada em 4X e 10X, a concentração e morfologia do espermatozoides foram determinadas de acordo com a metodologia proposta por [Zuvela & Matson \(2020\)](#) e [Johnston \(1991\)](#).

## Ultrasonografia

Os cães foram colocados em decúbito lateral esquerdo sem sedação para avaliação ultrasonográfica transscrotal tanto dos testículos como dos epidídimos. Uma máquina de ultra-sons K10-Vet (KontroLab<sup>®</sup>) e um transdutor microconvexo de 7,5 MHz foram utilizados para determinar quantitativamente a ecogenicidade do testículo, do mediastino e da cabeça do epidídimo. Para cada região anatômica, foram obtidas e avaliadas imagens digitais no plano sagital, foram seleccionadas aleatoriamente vinte áreas em cada imagem para determinar os pixels da escala de cinzentos de cada uma. Foi considerado um valor de "0" todo preto e "255" todo branco. Foi utilizado o software ImageJ (NIH; [Morales et al., 2021](#)).

## Morfologia Gonadal

Na quinta semana, todos os cães de ambos os grupos foram submetidos a orquiectomia bilateral sob anestesia inalatória (isoflurano-oxigénio) e dissecação epidídimal de ambos os testículos. As secções da cabeça epidídima e do corpo foram fixadas na solução de Bouin para processamento por incorporação de parafina e foram obtidas secções de 3 micrómetros de espessura e coradas com hematoxilina e eosina ([Aziz & Zeman-Pocrnich, 2022](#); [Kurowicka et al., 2015](#)).

As secções da cabeça epidídima foram avaliadas por microscopia ligeira (Optisum<sup>®</sup> MIC 900T) e foram tiradas microfotografias a 20X e 40X. Posteriormente, o diâmetro, área e espessura do epitélio tubular, bem como a área ocupada pelo pacote de espermatozoides no lúmen de cada túbulo foram determinados com o software LSM 5<sup>®</sup> (Carl Zeiss).

## Identificação de receptores de estrogénio

Dois secções histológicas não manchadas de cada testículo de ambos os grupos (C e TCOU) foram avaliadas por microscopia confocal Leica TCS SP2 com um comprimento de onda de 400 nanómetros (luz azul) para excitação e 550 nanómetros para detectar a emissão de fluorescência verde associada a COU ligada aos receptores de estrogénio



presentes (Serrano *et al.*, 2008; Pérez-Rivero *et al.*, 2009). Foram também obtidas imagens digitais para determinar a intensidade da fluorescência emitida expressa em pixels com o programa ZEN Blue 3.5 Carl Zeiss Microscopy GmbH.

### **Parâmetros de testosterona sérica e estradiol**

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa jugular durante o dia com pelo menos 8 h de jejum, distribuídas em tubos sem anticoagulante. As concentrações de testosterona sérica e estradiol foram determinadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando kits comerciais (DRG Testosterone ELISA EIA-1559 e DRG Estradiol Sensitive ELISA EIA-4399, DRG Instruments GmbH®, Alemanha) e seguindo os protocolos do fabricante. A sensibilidade analítica dos testes de testosterona e estradiol foi de 0,083 ng/ml e <1,399 pg/ml respectivamente. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio dos testes foram: 3,59%, e 7,12% para a testosterona, e 6,36%, e 7,60% para o estradiol. Se a concentração de soro fosse inferior ao limite de quantificação, o valor limite inferior era atribuído a essa amostra.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o software PAST 3.01® (Hammer, 2001). Foram obtidas as medianas  $\pm$  erro padrão (EP) e o intervalo entre quartis (Q1-Q3) dos parâmetros de celularidade determinados nas gônadas, bem como a intensidade de pixel das imagens de ultra-som e fluorescência. As diferenças entre grupos foram analisadas com o teste Mann-Whitney. O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Produção de esperma**

A concentração inicial de esperma do grupo C era de  $1,79 \pm 0,001 \times 10^8$  espermatozoides/ml, que não mostraram variação nas semanas seguintes. Pelo contrário, no grupo TCOU (Tabela 1), a concentração de esperma nos ejaculados mostrou uma diminuição numérica evidente da primeira para a quarta semana, a concentração determinada na quinta semana que foi de  $0,420 \pm 0,002 \times 10^8$  espermatozoides/ml foi mais baixa ( $p < 0,05$ ) do que as concentrações determinadas nas quatro semanas anteriores.

A motilidade do esperma diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir da semana 3. Relativamente à morfologia do esperma, houve um aumento na semana 3 de alterações na cauda e nas gotas citoplasmáticas proximais e distais associadas à maturação na epidídima (Tabela 1).



## Indicadores sonográficos e morfologia gonadal

A ecogenicidade gonadal (Tabela 2), mostrou que o parênquima gonadal do grupo OCT (69,9±2,9) foi aumentado ( $p>0,05$ ) com respeito à ecogenicidade determinada no grupo C (63,9±2,6).

Na ecografia testicular (Figura 1), a intensidade dos pixels mostrou uma diminuição da ecogenicidade na região mediastinal (rede testicular) e na região da cabeça epididimal ( $p<0,05$ ).

A avaliação da celularidade na cabeça epidídima de ambos os grupos C e TCOU (Tabela 3) não mostrou diferenças entre eles, contudo, os intervalos dos valores determinados em cada grupo observados nos quartis eram evidentes.

Nas observações histológicas da celularidade epidídima (Figura 2), o grupo TCOU mostrou um decréscimo da massa espermática e dos microfilhos luminosos.

**Tabela 1. Concentração semanal de esperma, morfologia e motilidade em cães tratados com coumestrol (grupo TCOU)**

Semana	Concentração de espermatozoides X10 <sup>8</sup> espermatozoides/ml.					Mann-Whitney P
	1*	Mediana±EP (Q1-Q3)			5	
		2	3	4		
<b>Tratado</b>	1.79±0.001 (1.78-1.79)	1.58±0.05 (1.48-1.68)	1.17±0.09 (1.01-1.32)	0.952±0.03 (0.41-1.49)	<b>0.420±0.002<sup>a</sup></b> <b>(0.41-0.42)</b>	<0.05
<b>Controlo</b>	1.79±0.001 (1.78-1.79)	1.68±0.03 (1.68-1.78)	1.68±0.04 (1.58-1.70)	1.60±0.06 (1.55-1.79)	1.78±0.02 (1.70-1.79)	>0.05
<b>Motilidade do esperma %</b>						
<b>Mediana (Q1-Q3)</b>						
<b>Tratado</b>	>90 (89-92)	>90 (88-91)	<b>50<sup>a</sup></b> (50-50)	<b>50<sup>a</sup></b> (45-60)	<b>60<sup>a</sup></b> (50-60)	<0.05
<b>Controlo</b>	>90 (89-92)	>90 (89-92)	>90 (89-92)	>90 (89-92)	>90(89-92)	>0.05
<b>Morfologia do esperma % ± EP</b>						
<b>Tratado</b>	86±1.5	88±1.1	<b>65±7.0<sup>a</sup></b>	<b>56±5.5<sup>a</sup></b>	<b>57±2.9<sup>a</sup></b>	<0.05
<b>Normal</b>						
<b>Controlo</b>	86±1.5	87±2.0	88±1.0	86±2.0	89±1.5	>0.05
<b>Normal</b>						



<b>Tratado Cauda enrolada</b>	1±0.80	4±1.5	<b>10±4.5<sup>a</sup></b>	<b>9±4.5<sup>a</sup></b>	5±2.5	<0.05
<b>Controlo Cauda enrolada</b>	1±0.80	1±0.5	-	-	-	>0.05
<b>Tratado Gota proximal</b>	-	-	-	2±2	7±4	>0.05
<b>Controlo Gota proximal</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Tratado Gota distal</b>	-	1±0.5	1±0	<b>7±1<sup>a</sup></b>	-	<0.05
<b>Controlo Gota Distal</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Tratado Cauda dobrada</b>	4±2	2±0.25	18±10	<b>34±13<sup>a</sup></b>	<b>32±6.9<sup>a</sup></b>	<0.05
<b>Controlo Cauda dobrada</b>	4±2	2±1	-	-	2±1	>0.05

\*Início do tratamento. <sup>a</sup>Indica o parâmetro onde existe uma diferença significativa no teste Mann-Whitney

**Tabela 2. Ecogenicidade Gonadal em cães de controlo e cães tratados com coumestrol**

<b>Grupo/Quartil</b>	<b>Controlo Mediana±EP</b>	<b>Q1-Q3 Mediana</b>	<b>Coumestrol Mediana±EP</b>	<b>Q1-Q3 Mediana</b>	<b>Mann Whitney P</b>
Parênquima	63.9±2.6	45.5-77.5	69.9±2.9	51.5-83.5	>0.05
Mediastinum	67.3±2.0	55.5-77.0	60.0±2.4	46.5-73	<0.01
Cabeça epidídima	53±2.9	35.5-64	44±1.8	39-47	<0.05

Ultra-som Gonadal/Pixels cinzentos



**Tabela 3. Parâmetros de celularidade dos epidídimos dos cães tratados com coumestrol**

Cabeça epidídima	Controlo Mediana±EP	Q1-Q3 Mediana	Coumestrol Mediana±EP	Q1-Q3 Mediana	Mann Whitney P
<b>Morfometria</b>					
Diâmetro µm	273±5.7	235-306	314±5.3	279-340	<0.01
Área µm <sup>2</sup>	60882±2593	43665- 73608	79688±2716	61362- 90872	<0.01
Espessura do epitélio µm	59.7±1.0	53.4-64.4	75.9±1.0	67.0-83.6	<0.01
Comprimento do microvilli em µm	23.6±0.4	20.8-25.6	13.0±0.6	8.6-17.9	<0.01
Spermatozoa (Área da pacote espermático em µm <sup>2</sup> )	12703.9±2026.7	7991.1- 18201.5	8371.8±2605.5	781.0- 14181.5	<0.05

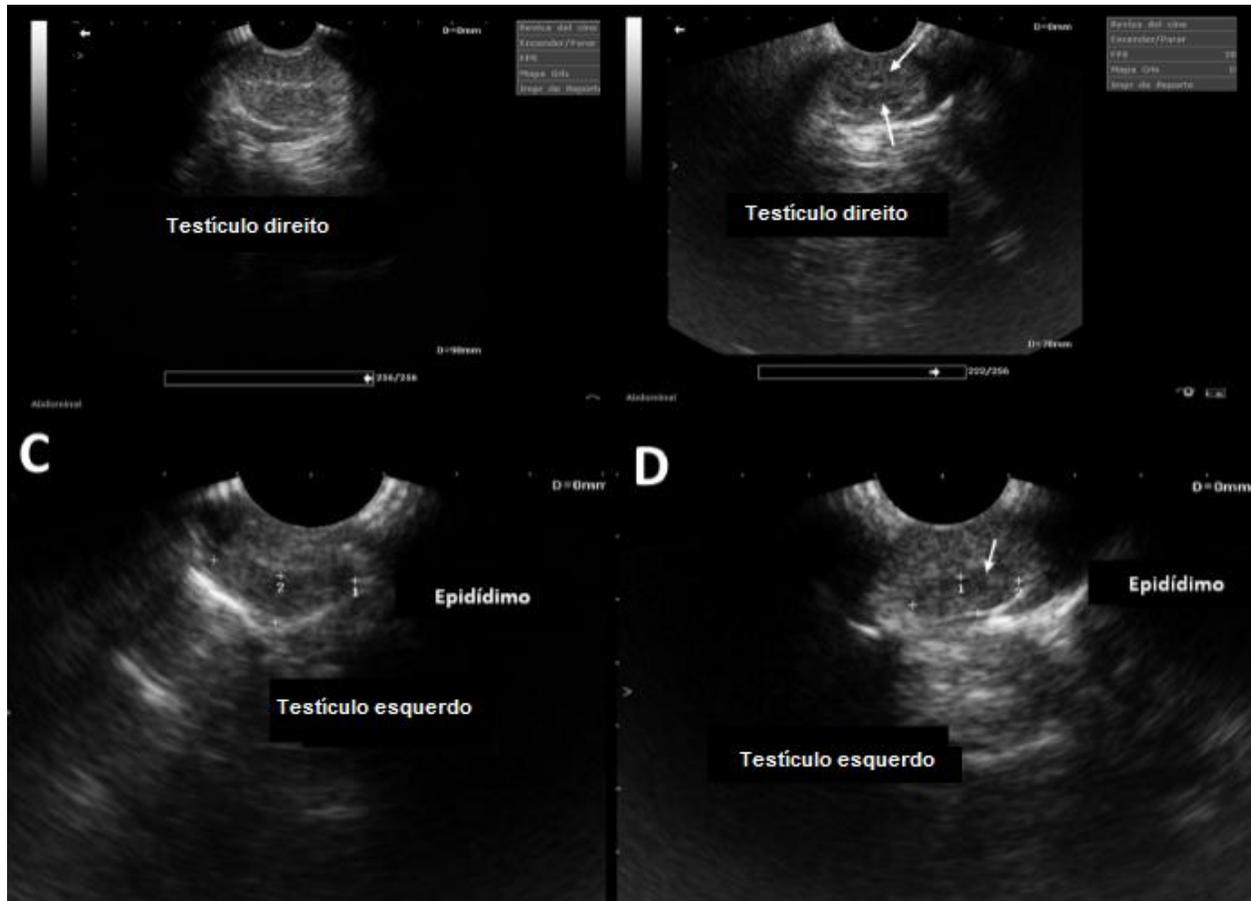
### Presença de receptores de estrogénio

A presença de receptores de estrogénio (Figura 3 e Tabela 4), foi evidenciada pelo aumento numérico dos pixels médios no tecido conjuntivo nas estruturas epidídimas do grupo TCOU de 21,5±0,9 em comparação com o grupo C que apresentou 6±0,5 (p>0,05).

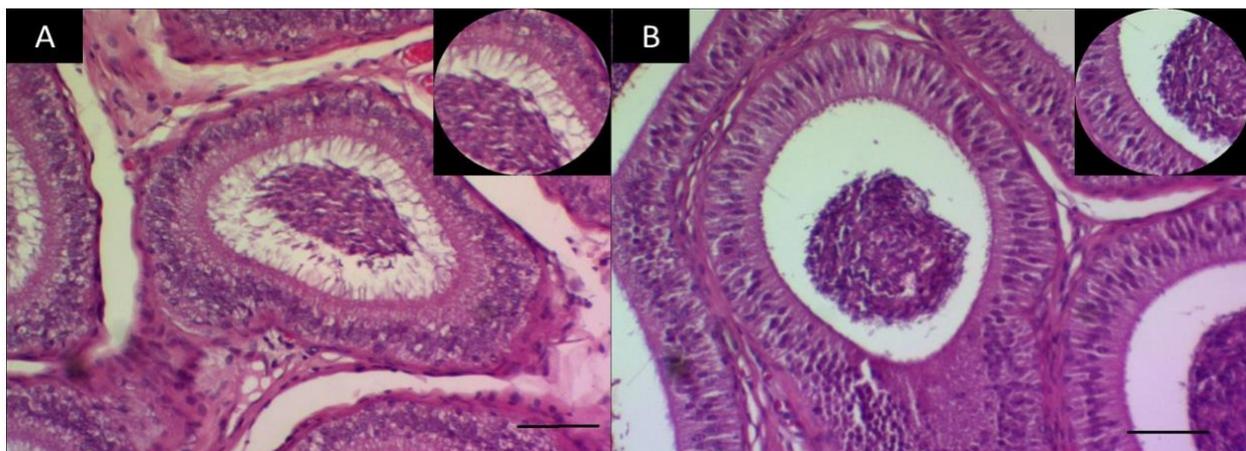
**Tabela 4. Intensidade da fluorescência associada com a presença de receptores de estrogénio**

Grupo/Quartil	Controlo Mediana±EP	Q1-Q3 Mediana	Coumestrol Mediana±EP	Q1-Q3 Mediana	Mann Whitney P
Epitélio	1.4±0.1	0-3	3.1±0.4	0-5.7	<0.01
Tecido conjuntivo	6.0±0.5	3-8	20.9±0.9	14.2-26	>0.05

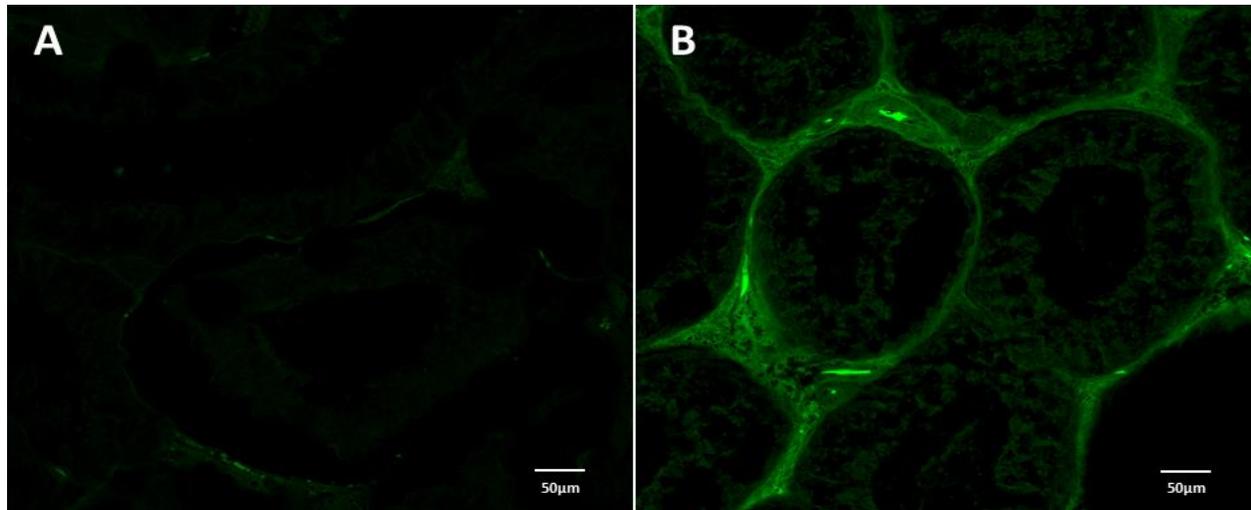
Intensidade da fluorescência/Pixels verdes



**Figura 1. Ultra-som do testículo e epidídimo. A.** Grupo de controle. **B.** Grupo OCT, notar a diminuição da ecogenicidade ao nível do hilo testicular (setas). **C.** Ecogenicidade evidente no epidídimo dos cães do grupo de controle. **D.** Diminuição da ecogenicidade no epidídimo dos cães do grupo OCT



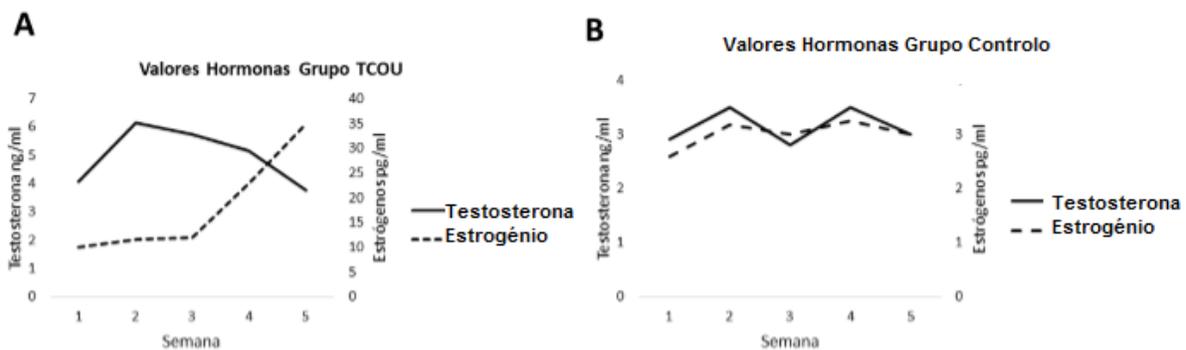
**Figura 2. Secção histológica de um segmento da cabeça epidídima. A.** Cabeça do grupo de controle epididymis (40X), detalhe do inset de microvilli. **B.** Cabeça do grupo epidídimo tratado coumestrol (40X), detalhe do inset mostrando ausência de microvilli. Cabeça do grupo epidídimo tratado coumestrol (40X), ampliação de detalhe inset mostrando ausência de microvilli. Bar 100µm



**Figura 3. Fluorescência, em epidídimo, demonstrando a presença de receptores de estrogênio (coumestrol).** A. Fluorescência escassa no epidídimo dos cães do grupo de controle, no qual a diminuição do epitélio é proeminente. B. Intensa fluorescência no epidídimo de cães tratados com coumestrol mostrando um aumento do tecido conjuntivo.

### Parâmetros hormonais

Os níveis hormonais determinados (Figura 4), mostraram diferenças entre o grupo C e o grupo TCOU. No grupo C, os níveis de testosterona eram constantes, mas havia uma variação nos níveis de estradiol. No grupo TCOU, uma diminuição dos níveis de testosterona, associada a um aumento dos níveis de estradiol, foi evidente a partir da quarta semana até à quinta semana.



**Figura 4.- Valores de testosterona sérica e estrogênio.** A. Em cães tratados com coumestrol, era evidente uma diminuição da testosterona associada a um aumento do estradiol, B. Em cães do grupo de controle, não era evidente qualquer relação entre hormonas devido ao efeito do coumestrol



## DISCUSSÃO

Os ejaculados caninos normais devem ter pelo menos 80% de espermatozóides morfológicamente normais e viáveis (Chłopik & Wysokińska, 2020). Neste estudo, verificou-se que a morfologia normal dos espermatozóides era 60% ou inferior a partir da terceira semana de tratamento, o que é semelhante ao relatado em cães considerados inférteis ((Barbosa de Souza *et al.*, 2015). A diminuição da concentração de esperma e o aumento de espermatozóides com gotas citoplasmáticas são provas do efeito inibidor do coumestrol na actividade gonadal.

A motilidade do esperma reportada em cães férteis deve ser superior a 70% (Johnston, 1991), no presente estudo nos cães do grupo TCOU a partir da semana 3 foi de 60% ou inferior, um valor semelhante ao reportado em cães inférteis (Barbosa de Souza *et al.*, 2015). No presente estudo, foram encontradas alterações secundárias da morfologia do esperma, que estão associadas à sua maturação no epidídimo ou durante a preparação das amostras de sémen. Entre as principais alterações, destacam-se uma cauda enrolada apertada a partir da semana 3 e uma gotícula citoplasmática distal a partir da semana 4 após o tratamento. Um ponto a considerar na interpretação destes resultados é que o tempo médio de passagem através do epidídimo de espermatozóides em cães domésticos é de 15 dias (3 semanas) (Chłopik & Wysokińska, 2020), o mesmo intervalo de tempo em que as alterações começaram a ser detectadas no espermiograma.

Como a estrutura dos fitoestrogénios é semelhante à dos estrogénios endógenos e estes têm a capacidade de se ligarem às RE, é possível observar efeitos fisiológicos nos tecidos que expressam o receptor (Rietjens *et al.*, 2017; Beszterda & Frański, 2018). Quando a molécula COU se liga a qualquer um dos receptores de estrogénio (RE $\alpha$  e RE $\beta$ ) pode emitir um sinal fluorescente (Serrano *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). No presente estudo, tal sinal foi detectado com maior intensidade no tecido conjuntivo do epidídimo de cães do grupo TCOU, confirmando que o COU é absorvido e provavelmente liga-se aos receptores de estrogénio presentes neste tecido, o que foi anteriormente relatado por Pérez-Rivero *et al.* (2014) em morcegos hematófagos adultos (*Desmodus rotundus*) testes e por Serrano *et al.*, (2008) em cães machos, em ambos os casos quando o COU foi administrado oralmente.

Em relação à ecogenicidade do parênquima testicular, esta é homogénea em toda a periferia, observa-se uma área com diminuição da ecogenicidade na região mediastinal, que corresponde à localização do vaso deferente e da rede testicular, que é consistente com as alterações encontradas a nível histológico relacionadas com a dilatação dos túbulos do epidídimo, a perda de microvilli e a diminuição do conteúdo de esperma no seu lúmen (Mantziaras, 2020; Lubinus *et al.*, 2006).

O processo de biossíntese dos estrogénios depende da actividade da enzima aromatase, membro da superfamília do citocromo P450 (Hess & Cooke, 2018). Aromatase é responsável pela conversão de testosterona e androstenediona em estrogénios aromáticos, 17 $\beta$ -estradiol e estrone, respectivamente (Hess & Cooke, 2018). Foi relatado



que o COU pode ligar-se à enzima aromatase, resultando na inibição da biossíntese de estrogénios, pelo que é possível que o aumento da concentração sérica de testosterona se deva a este efeito (Wyse *et al.*, 2021; Lephart, 2015).

Os estrogénios encontram-se em concentrações elevadas nas células epiteliais que revestem as condutas eferentes, sendo a sua principal função reabsorver o líquido luminoso e, assim, aumentar a concentração de espermatozóides. A ausência do efeito biológico dos estrogénios induz a acumulação de fluido nas condutas eferentes, o que acaba por levar à dilatação das condutas e dos testículos, seguida de uma diminuição da altura epitelial, do número e da altura dos microvilli no epidídimo e, posteriormente, da atrofia do epitélio seminífero, todas estas alterações favorecem a diluição do sémen (Hess & Cooke, 2018; Pérez-Rivero *et al.*, 2009).

## CONCLUSÃO

Estudos demonstraram que a administração subcutânea de coumestrol pode ser uma alternativa não invasiva para diminuir a capacidade fertilizante dos cães, uma vez que induziu alterações na actividade gonadal e celularidade associadas à diminuição da produção de esperma e da qualidade do esperma. Contudo, são ainda necessários estudos para avaliar o seu possível efeito reversível e a capacidade de fertilização dos espermatozóides.

### Financiamento

O estudo foi apoiado pela Universitária Metropolitana Autônoma Unidade Xochimilco (UAM), projecto de investigação DCBS.445.12.

### Agradecimentos

Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CONACYT) para a Bolsa A.J.R. para Estudos de Doutorado em Ciências.

Os autores gostariam de agradecer à Fundação Qualidade de Vida A.C., pelo fornecimento das suas instalações e apoio no cuidado dos cães (acordo assinado com a UAM-X em 27 de Junho de 2016).

A Laura Karen Camarillo Rodea pela sua ajuda na manipulação dos animais durante a avaliação clínica e recolha de amostras biológicas.

A Susana Rojas Maya(†) pelo seu generoso apoio e assistência técnica durante a avaliação hormonal.

### Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm conflitos de interesses.



## Contribuição dos autores

A.J.R: Concebeu e realizou o estudo, recolheu os dados e amostras biológicas, realizou o trabalho de laboratório, analisou e interpretou os resultados, redigiu e aprovou o manuscrito final.

J.J.J.P.R: Concebeu a ideia original e concebeu o estudo, supervisionou o estudo, analisou e interpretou os dados, reviu criticamente o manuscrito e aprovou o manuscrito final.

J.A.H.B.: Realizou a revisão crítica do manuscrito e aprovou o manuscrito final.

A.A.S: Revisto criticamente o manuscrito e aprovado o manuscrito final.

M.P.M: Realizou a revisão crítica do manuscrito e aprovou o manuscrito final.

## LITERATURA CITADA

ALDER SA, Purup S, Hansen-Møller J, Thuen E, Steinshamn H. 2015. Phytoestrogens and their metabolites in bulk-tank milk: effects of farm management and season. *PLoS One*.10(5): e0127187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127187>

ALI HASSAN H, Domain G, Luvoni GC, Chaaya R, Van Soom A, Wydooghe E. 2021. Canine and Feline Epididymal Semen—A Plentiful Source of Gametes. *Animals*.11:2961. <https://doi.org/10.3390/ani11102961>

ASA CS. Contraception in Dogs and Cats. 2018. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 48(4):733-742. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.014>

AZIZ SJ, Zeman-Pocrnich CE. 2022. Tissue Processing. *Methods Mol Biol*. 2422:47-63. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3_4)

BARBOSA DE SOUZA M, England GCW, Mota Filho ACAckermann CL, Vlória Soares Sousa CV, Guedelha de Carvalho G, Rodrigues Silva HV, Pinto JN, Spíndola Linhares JC, Oba E, Machado da Silva LD. 2015. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. *Theriogenology*. 84: 805–810. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.015>

BELSARE A, Vanak AT. 2020. Modelling the challenges of managing free-ranging dog populations. *Sci Rep*. 10(1):18874. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75828-6>

BESZTERDA M, Frański R. 2018. Endocrine disruptor compounds in environment: As a danger for children health. *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism*. 24(2):88-95. <https://doi.org/10.18544/PEDM-24.02.0107>



- CERUNDOLO R, Michel KE, Reisner IR, Phillips L, Goldschmidt M, Court MH, Shrestha B, Hao Q, Refsal K, Oliver JW, Biourge V, Shofer FS. 2009. Evaluation of the effects of dietary soy phytoestrogens on canine health, steroidogenesis, thyroid function, behavior and skin and coat quality in a prospective controlled randomized trial. *American Journal of Veterinary Research*. 70(3): 353–360. <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.3.353>
- CHŁOPIC A, Wysokińska A. 2020. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals*. 55:113–126. <https://doi.org/10.1111/rda.13596>
- COOKE PS, Mesa AM, Sirohi VK, Levin ER. 2021. Role of nuclear and membrane estrogen signaling pathways in the male and female reproductive tract. *Differentiation*. 118:24-33. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2020.11.002>
- CORNWAL GA. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*. 15(2):213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- DOMÍNGEZ-LÓPEZ I, Yago-Aragón M, Salas-Huetos A, Tresserra-Rimbau A, Hurtado-Barroso S. 2020. Effects of Dietary Phytoestrogens on Hormones throughout a Human Lifespan: A Review. *Nutrients*. 12: 2456. <https://doi.org/10.3390/nu12082456>
- EVANS MJ, Gibson A, Fielding H, Ohal P, Pandey P, Kumar A, Singh SK, Airikkala-Otter I, Abela-Ridder B, Gamble L, Handel I, Bronsvort BMDC, Mellanby RJ, Mazeri S. 2022. Free-roaming dog population dynamics in Ranchi, India. *Research in Veterinary Science*. 143:115-123. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.022>
- HAMMER Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electrónica*. 4:1 [https://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- HAMPSON K, Abela-Ridder B, Bharti O, Knopf L, Léchenne M, Mindekem R, Tarantola A, Zinsstag J, Trotter C. 2019. Modelling to inform prophylaxis regimens to prevent human rabies. *Vaccine*. 37(1(Suppl 1)): A166-A173. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.010>
- HAMPSON K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, Barrat J, Blanton JD, Briggs DJ, Cleaveland S, Costa P, Freuling CM, Hiby E, Knopf L, Leanes F, Meslin FX, Metlin A, Miranda ME, Müller T, Nel LH, Recuenco S, Rupprecht CE, Schumacher C, Taylor L, Vigilato MA, Zinsstag J, Dushoff J. 2015. Global Alliance for Rabies Control Partners for Rabies Prevention. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9(4): e0003709. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709>



HESS RA, Cooke PS. 2018. Estrogen in the male: a historical perspective. *Biology of Reproduction*. 99(1):27–44. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy043>

JOHNSTON SD. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. 21(3):545-51. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(91\)50060-7](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(91)50060-7)

KAWAKAMI E, Hirano T, Hori T, Tsutsui T. 2004. Improvement in spermatogenic function after subcutaneous implantation of a capsule containing an aromatase inhibitor in four oligozoospermic dogs and one azoospermic dog with high plasma estradiol-17b concentrations. *Theriogenology*. 62: 165–178. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.021>

KUROWICKA B, Dietrich GJ, Kotwica G. 2015. Effect of neonatal or adult heat acclimation on testicular and epididymal morphometry and sperm production in rats. *Reproductive Biology*. 15(1):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2015.01.001>

LEOCI R, Aiudi G, Silvestre F, Lissner EA, Marino F, Lacalandra GM. 2015. Therapeutic Ultrasound as a Potential Male Dog Contraceptive: Determination of the Most Effective Application Protocol. *Reproduction in Domestic Animals*. 50(5):712-8. <https://doi.org/10.1111/rda.12548>

LEPHART ED. 2015. Modulation of Aromatase by Phytoestrogens. *Enzyme Research*. 594656. <https://doi.org/10.1155/2015/594656>

LUBINUS BADILLO FG, Buitrago Aguilar C. 2006. Lesiones testiculares benignas: hallazgos ecográficos. *Med UNAB*. 9 (2):120-127. <https://revistas.unab.edu.co/index.php/medunab/article/view/153>

MANTZIARAS G. 2020. Imaging of the male reproductive tract: Not so easy as it looks like. *Theriogenology*. 150:490e497. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.009>

MASSEI G, Miller LA. 2013. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: a review of products and criteria for field applications. *Theriogenology*. 80(8):829-838. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.016>

MIRANDA-CASTRO SP, Lizarraga-Paulin E. 2012. Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application. In: *The Complex World of Polysaccharides*. (Karunaratne DN Ed). Intech Publisher, Croatia. Pp. 1-44. <https://doi.org/10.5772/51200>

MORALES BM, Rodrigues da Rosa Filho, JR, Agostini LD, Infantosi VC. 2021. Ageing changes testes and epididymis blood flow without altering biometry and echodensity in dogs. *Animal Reproduction Science*. 228:106745. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106745>



MOTA-ROJAS D, Calderón-Maldonado N, Lezama-García K, Sepiurka L, Maria Garcia RC. 2021. Abandonment of dogs in Latin America: Strategies and ideas. *Veterinary World*. 14(9):2371-2379. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2371-2379>.

MOSTROM M, Evans TJ. 2018. Chapter 60 “Phytoestrogens”, Editor(s): Ramesh C. Gupta, *Veterinary Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, Pages 817-833, ISBN 9780128114100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00060-X>

NCRRRAR. National Centre For The Replacement, Refinement, and Reduction of Animal in Research. The 3 R. <http://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>

NIH. National Institutes of Health. Image Processing and Analysis in Java (ImageJ). <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

NIE R, Zhou Q, Jassim E, Saunders PTK, Hess RA. 2002. Differential Expression of Estrogen Receptors a and b in the Reproductive Tracts of Adult Male Dogs and Cats. *Biology of Reproduction*. 66:1161-1168. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.1161>

PEÑA-CORONA S, León P, Mendieta E, Villanueva M, Salame A, Vargas D, Mora G, Serrano H, Villa-Godoy A. 2019. Effect of a single application of coumestrol and/or dimethyl sulfoxide, on sex hormone levels and vaginal cytology of anestrus bitches. *Veterinaria México OA*, 6(1), 52-66. Epub 20 de febrero de 2020. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2019.1.656>

PEREZ-RIVERO JJ, Pérez-Martínez M, Aguilar-Setién A. 2014. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route. *Journal of Applied Animal Research*. 42:2:208-212. <https://doi.org/10.1080/09712119.2013.827578>

PEREZ-RIVERO JJ, Martinez-Maya JJ, Pérez-Martinez M, Aguilar-Setien A, García-Suarez MD, Serrano H. 2009. Phytoestrogen treatment induces testis alterations in dogs. Potential use in population control. *Veterinary Research Communications*. 33:87–95. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9077-3>

RIETJENS IMCM, Lousse J, Beekmann K. 2017. The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology*. 174(11):1263-1280. <https://doi.org/10.1111/bph.13622>

ROOT KUSTRITZ MV. 2018. Population Control in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. 48(4):721-732. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.013>



RUBEL D, Carbajo A. 2019. Dogs in public spaces of Buenos Aires, Argentina: Exploring patterns of the abundance of dogs, the canine faecal contamination, the behaviour of people with dogs, and its relationships with demographic/economic variables. *Preventive Veterinary Medicine*. 170:104713. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104713>

SANDAM NP, Prakash D, Thimmareddy P. 2021. Immunocontraceptive potential of a GnRH receptor-based fusion recombinant protein. *Journal, genetic engineering & biotechnology*. 19(1):63. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00164-9>

SERRANO H, Pérez-Rivero JJ, Martínez-Maya JJ, Aguilar-Setién A, Pérez-Martinez M, García-Suárez MD. 2008. Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptors in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. *Neuroendocrinology Letters*. 29(6):977–980. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9077-3>

SMITH LM, Hartmann S, Munteanu AM, Dalla Villa P, Quinnell RJ, Collins LM. 2019. The Effectiveness of Dog Population Management: A Systematic Review. *Animals (Basel)*. 9(12):1020. <https://doi.org/10.3390/ani9121020>

WANG D, Xie J, Zhu X, Li J, Zhao D, Zhao M. 2014. A recombinant estrogen receptor fragment-based homogenous fluorescent assay for rapid detection of estrogens. *Biosensors and Bioelectronics*. 55:391–395. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.050>

WYSE JM, Latif S, Gurusinghe S, Berntsen ED, Weston LA, Stephen CP. 2021. Characterization of Phytoestrogens in *Medicago sativa* L. and Grazing Beef Cattle. *Metabolites*. 11(8): 550. <https://doi.org/10.3390/metabo11080550s>

ZUVELA E, Matson P. 2020. Performance of four chambers to measure sperm concentration: results from an external quality assurance programme. *Reproductive biomedicine online*. 41(4):671–678. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.07.008>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>