



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2022; 12:1-18. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.15>

Artículo Original. Recibido: 27/02/2022. Aceptado:23/05/2022. Publicado: 10/08/2022. Clave: e2022-17.

<https://www.youtube.com/watch?v=6d4WqxZqAqo>



Efecto del coumestrol sobre el epidídimo de perros adultos

Effect of coumestrol on the epididymis of adult dogs

James-Romero Artemisa^{1,2} ID, Pérez-Rivero Juan ^{2*} ID, Herrera-Barragán José ² ID,
Aguilár-Setián Alvaro³ ID, Pérez-Martínez Mario⁴ ID

¹Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México.

²Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

³Unidad de Investigación en Inmunología, Instituto Mexicano del Seguro Social. ⁴Departamento de Morfología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

*Autor para correspondencia: 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, jherrera@correo.xoc.uam.mx, balantiopterix@gmail.com, drmvzmariomt@gmail.com

RESUMEN

La preocupación de la sobrepoblación canina se relaciona con zoonosis como la rabia, la cual es responsable del 99% de los casos de rabia humana, causante de la muerte de aproximadamente 59,000 personas al año. La esterilización quirúrgica es un método de control eficaz, costoso e invasivo siendo su impacto limitado. Los efectos de los fitoestrógenos en la actividad reproductiva se han estudiado comúnmente en hembras, y un número limitado en machos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue conocer el efecto de la administración subcutánea de coumestrol en la actividad gonadal de perros adultos como alternativa para su control reproductivo. Se determinaron los parámetros de evaluación seminal básica, la estructura del epidídimo mediante ecografía, características histológicas, así como la presencia del coumestrol mediante fluorescencia y los niveles séricos de testosterona y estrógenos. La administración de coumestrol durante cinco semanas redujo la producción espermática, y evidenció cambios en la eco densidad y celularidad del epidídimo, asociados a las concentraciones séricas de estradiol y testosterona. Por lo que, se concluye que el coumestrol administrado vía subcutánea tiene un efecto estrogénico que puede utilizarse como un método no invasivo para ayudar a controlar la fertilidad de perros adultos.

Palabras clave: epidídimo, espermatozoides, estrógenos, fitoestrógenos, testículo, perro, control reproductivo.

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.



INTRODUCCIÓN

La sobrepoblación canina es un problema a nivel mundial el cual impacta en la salud pública y animal ([Rubel & Carbajo, 2019](#)), debido a que son una fuente de problemas de salud, políticos, socioeconómicos y de bienestar, particularmente en los países en desarrollo. Estos problemas incluyen vagar por las calles causando accidentes de tráfico, ladrar, agresión y morder. La creciente población de perros callejeros en los países de América Latina es alarmante, varios factores contribuyen al aumento de su población, el más común es el abandono por parte de los responsables, el cual es la causa principal del número de perros que recorren las calles o viven en refugios caninos ([Mota-Rojas et al., 2021](#)).

La principal preocupación de la sobrepoblación canina está relacionada con las enfermedades zoonóticas, especialmente rabia canina, enfermedad subreportada y desatendida en los países en desarrollo, la cual es responsable del 99% de los casos de rabia humana transmitida por perros a nivel mundial, produciendo anualmente la muerte de aproximadamente 59,000 [Intervalo de confianza al 95%: 25,000–159,200] personas en todo el mundo. Se están realizando esfuerzos para reducir a cero las muertes humanas debido a la rabia mediada por perros para el año 2030 ([Hampson et al., 2015](#); [Hampson et al., 2019](#)).

La esterilización quirúrgica es el mejor método para prevenir la reproducción y, en consecuencia, la sobrepoblación canina. Sin embargo, el impacto de los programas de esterilización ha sido limitado, principalmente debido a los altos costos operativos que dificultan llegar a la mayor cantidad de perros posible ([Evans et al., 2022](#); [Belsare & Vanak, 2020](#)). Debido a esto, el sacrificio masivo sigue siendo utilizado como el principal método de control poblacional en gran parte del mundo, siendo poco aceptado por la sociedad, por lo que la Organización Mundial de la Salud publicó directrices en 1990 que desalientan el uso del sacrificio y recomiendan métodos alternativos como los métodos contraceptivos ([Smith et al., 2019](#)).

Debido a esto, diferentes investigaciones se han enfocado en encontrar y proponer alternativas de control de la fertilidad canina, entre las cuales se incluye el uso de hormonas sintéticas (por ejemplo, andrógenos sintéticos), esterilización química (por ejemplo, gluconato de zinc neutralizado con arginina, cloruro de calcio), inmunoconcepción (por ejemplo, vacuna inhibidora de la hormona gonadotropina) ([Sandam et al., 2021](#); [Root Kustritz, 2018](#); [Asa, 2018](#); [Massei et al., 2013](#)), así como, el uso del ultrasonido terapéutico a diferentes frecuencias ([Leoci et al., 2015](#)), entre otras. Sin embargo, algunas metodologías pueden presentar diferentes efectos adversos y no han mostrado ser totalmente efectivas ([Sandam et al., 2021](#); [Asa, 2018](#); [Root Kustritz, 2018](#)). Por tal motivo, como método complementario se contempla el uso de fitoestrógenos.



Los fitoestrógenos (FE) son compuestos polifenólicos derivados de las plantas, los cuales se dividen en varios grupos, incluyendo isoflavonas (genisteína), lignanos (enterolactona), flavonas (luteolin), estilbenos (resveratrol) y coumestanos (coumestrol) (Adler *et al.*, 2015; Pérez-Rivero *et al.*, 2009). Tienen estructuras similares a los estrógenos endógenos y pueden inducir o inhibir la respuesta en receptores hormonales debido a que tienen la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos (RE) alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$) localizados en los tejidos en diferentes órganos incluyendo el reproductivo. Esta unión se realiza con mayor afinidad a los $RE\beta$ (Rietjens *et al.*, 2017).

Algunas investigaciones indican que los FE actúan como disruptores endocrinos compitiendo con los estrógenos endógenos por la unión a sus receptores y pueden producir efectos biológicos positivos o negativos en la salud animal (Beszterda & Frański, 2018). Similar a lo que ocurre con cualquier fármaco, depende de la dosis o la vía de administración de los FE la intensidad del efecto en el tejido blanco, debido a que son sometidos a diferentes procesos de absorción, biotransformación, distribución y excreción. Asimismo, sus efectos pueden variar dependiendo del fitoestrógeno, las especies expuestas, el sexo, la vía de administración, la dosis y la duración de la exposición, además del momento de la exposición durante el desarrollo reproductivo o la vida adulta. Por lo tanto, los FE tienen la capacidad de actuar como agonistas estrogénicos produciendo los efectos estrogénicos clásicos o como antagonistas estrogénicos (inhibiendo el efecto de los estrógenos) (Domínguez-López *et al.*, 2020; Mostrom & Evans, 2018).

De manera adicional, los FE pueden modular el eje hipotálamo-hipófisis, también tienen la capacidad de inhibir la expresión del ARNm de la aromatasas (citocromo P450), produciendo la disminución de la biosíntesis local de estrógenos, dando como resultado la inhibición celular, incluyendo la espermatogénesis, participando como reguladores intracelulares del ciclo celular y la apoptosis (Domínguez-López *et al.*, 2020; Lephart, 2015; Cerendolo *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2004).

El coumestrol (COU) se encuentra presente en alfalfa (*Medicago sativa*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinacas (*Spinacia oleracea*) y brotes de soja (*Glycine max*) (Cerendolo *et al.*, 2009; Domínguez-López *et al.*, 2020). Tiene la capacidad de actuar como disruptor endocrino de $ER\alpha$ y $Er\beta$, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el tracto reproductivo del macho durante su desarrollo y la edad adulta (Cooke *et al.*, 2021). En el perro se ha detectado la presencia de RE en las células intersticiales de Leydig, espermátidas redondas, espermatogonias, y en el tejido conectivo del epidídimo (Serrano *et al.*, 2008).

Una peculiaridad del COU es que puede ser detectado de manera natural mediante fluorescencia cuando se une a los RE, este se excita a una longitud de onda de 390-400 nanómetros (azul) y emite fluorescencia con una longitud de onda de 532-559 nanómetros (color verde) (Wang *et al.*, 2014).



El COU ha sido estudiado como un posible método de control reproductivo en perros. En hembras cuando es administrado por vía oral induce la disminución de los niveles de progesterona e incremento de los valores de estrógenos séricos, sin afectar la celularidad del epitelio vaginal (Peña-Corona *et al.*, 2020). En machos, cuando se administra por vía oral afecta la histoarquitectura del epitelio germinal de los tubos seminíferos (Pérez-Rivero *et al.*, 2009). También se ha reportado el mismo efecto en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) machos (Pérez-Rivero *et al.*, 2014).

Los espermatozoides que pasan de los testículos al epidídimo son gametos no funcionales, es durante su tránsito a través de este último, donde mediante su interacción con proteínas, maduran, adquieren motilidad progresiva y la capacidad de fertilizar a los óvulos (Ali Hassan *et al.*, 2021; Cornwall, 2009), por lo que el epidídimo puede ser un blanco para el control reproductivo de especies consideradas transmisoras de enfermedad. Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio fue conocer el efecto de la administración subcutánea de coumestrol en el epidídimo de perros adultos como alternativa para su control reproductivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bienestar animal

El estudio fue aprobado con el número de protocolo DC-2017/2-4, por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se realizó con apego a los principios de las 3 R's de la investigación con animales (NCRRAR).

Animales

Se incluyeron 10 perros machos de entre 2 y 3 años, de diferente raza, sexualmente maduros, con peso promedio de 14 ± 2.9 kg. Clínicamente sanos con ambos testículos escrotados.

Experimento

Se dividieron aleatoriamente en dos grupos con cinco perros cada uno: Control (C) y tratamiento con coumestrol (TCOU), y se les dio seguimiento por 5 semanas continuas. En la primera semana, el grupo TCOU recibió una dosis única de 1.2 mg/kg por vía subcutánea de coumestrol (COU, Sigma Aldrich® Lot# BCBH0742V Pcode: 101171142 y Lot# BCBN3969V Pcode: 101652427), disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co®) para tener una concentración de COU: 100 µg/µl, el cual fue mezclado con un vehículo de quitosan 300 µl. El grupo C solo recibió el vehículo de DMSO y quitosan en la misma cantidad y vía de administración (Miranda-Castro & Lizarraga-Paulin, 2012).



Estudios clínicos

A cada perro de ambos grupos: C y TCOU, previo a la administración del tratamiento, a la primera semana de la administración del tratamiento y posteriormente cada semana por 4 ocasiones, le fueron realizadas cuatro evaluaciones: evaluación de la producción y calidad seminal, ecografía para evaluar testículos y epidídimo y obtención de sangre para determinación de indicadores hormonales.

Concentración, morfología y motilidad espermática

Después de obtener el eyaculado, se evaluó la motilidad progresiva a 4X y a 10X, la concentración espermática y la morfología se determinaron según la metodología propuesta por [Zuvela & Matson \(2020\)](#) y [Johnston \(1991\)](#).

Ecografía

Los perros fueron colocados en decúbito lateral izquierdo sin sedación, para realizar la evaluación ecográfica de ambos testículos y el epidídimo de manera transescrotal. Se utilizó un equipo de ultrasonido K10-Vet (KontroLab®) y transductor microconvexo de 7.5 MHz, para determinar de manera cuantitativa la ecogenicidad de los testículos, mediastino y en la cabeza del epidídimo. De cada región anatómica, se obtuvieron y evaluaron imágenes digitales en el plano sagital, se seleccionaron al azar veinte áreas sobre cada imagen para determinar los píxeles en escala de grises de cada una. Se consideró un valor de “0” totalmente negro y “255” totalmente blanco. Se utilizó el software ImageJ (NIH; [Morales et al., 2021](#)).

Morfología gonadal

En la quinta semana, a todos los perros de ambos grupos se les realizó orquiectomía bilateral bajo anestesia inhalada (isoflurano-oxígeno) y, se llevó a cabo disección del epidídimo de ambos testículos. Secciones de cabeza y cuerpo del epidídimo se fijaron en solución de Bouin para su procesamiento por inclusión en parafina y se obtuvieron cortes de 3 micrómetros de grosor que fueron teñidos con hematoxilina y eosina ([Aziz & Zeman-Pocrnich, 2022](#); [Kurowicka et al., 2015](#)).

Secciones de la cabeza del epidídimo se evaluaron por microscopía óptica (Optisum® MIC 900T) se tomaron microfotografías a 20X y 40X. Posteriormente, se determinó el diámetro de los túbulos, área y el grosor del epitelio tubular, así como, el área ocupada por el paquete espermático en el lumen de cada túbulo con el programa computacional LSM 5® (Carl Zeiss).

Identificación de receptores estrogénicos

Dos cortes histológicos sin teñir de cada testículo de ambos grupos (C y TCOU) fueron evaluados mediante microscopía confocal Leica TCS SP2 con una longitud de onda de 400 nanómetros (luz azul) para excitación y de 550 nanómetros para detectar la emisión



de fluorescencia en verde asociada al COU ligado a los receptores estrogénicos presentes (Serrano *et al.*, 2008; Pérez-Rivero *et al.*, 2009). También se obtuvieron imágenes digitales para determinar la intensidad de la fluorescencia emitida expresada en píxeles con el programa ZEN Blue 3.5 Carl Zeiss Microscopy GmbH.

Parámetros séricos de testosterona y estradiol

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción yugular en horario diurno con al menos 8 h de ayuno, se dispensaron en tubos sin anticoagulante. Se determinó la concentración sérica de testosterona y estradiol mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando kits comerciales (DRG Testosterone ELISA EIA-1559 y DRG Estradiol Sensitive ELISA EIA-4399, DRG Instruments GmbH®, Alemania) y siguiendo los protocolos del fabricante. La sensibilidad analítica de las pruebas para testosterona y estradiol fue de 0.083 ng/ml y <1.399 pg/ml respectivamente. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo de las pruebas fueron de: 3.59%, y 7.12% para testosterona, y de 6.36%, y 7.60% para estradiol. Si la concentración sérica se encontraba por debajo del límite de cuantificación, se le asignó a esa muestra el valor del límite inferior.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software PAST 3.01® (Hammer, 2001). Se obtuvieron las medianas \pm error estándar (EE) y el rango entre cuartiles (Q1-Q3) de los parámetros de celularidad determinados en las gónadas, así como también de la intensidad de los píxeles de las ecografías y de las imágenes con fluorescencia. Las diferencias entre grupos se analizaron con la prueba de Mann-Whitney. El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$.

RESULTADOS

Producción espermática

La concentración espermática inicial del grupo C, fue de $1.79 \pm 0.001 \times 10^8$ espermatozoides/ml, la cual en las siguientes semanas no mostró variaciones. Por el contrario, en el grupo TCOU (Tabla 1), la concentración espermática en los eyaculados mostró una evidente disminución numérica de la semana uno a la cuatro, la concentración determinada en la quinta semana que fue de $0.420 \pm 0.002 \times 10^8$ espermatozoides/ml fue inferior ($p < 0.05$) a las concentraciones determinadas en las cuatro semanas anteriores. La motilidad espermática disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) a partir de la semana 3. En lo referente a la morfología espermática se observó un incremento en la semana 3 de alteraciones en la cola y gotas citoplásmicas proximales y distales asociadas con la maduración en el epidídimo (Tabla 1).



Indicadores ecográficos y morfología gonadal

La ecogenicidad gonadal (Tabla 2), mostró que el parénquima gonadal del grupo TCOU (69.9 ± 2.9) se incrementó ($p > 0.05$) con respecto a la ecogenicidad que se determinó en el grupo C (63.9 ± 2.6).

En la ecografía testicular (Figura 1), la intensidad de píxeles mostró una disminución de la ecogenicidad en la región del mediastino (red testicular) y en la región de la cabeza del epidídimo ($p < 0.05$).

La evaluación de la celularidad en la cabeza de epidídimo de ambos grupos C y TCOU (Tabla 3) no mostró diferencias entre ellos, sin embargo, fueron evidentes los rangos de los valores determinados en cada grupo observados en los cuartiles.

En las observaciones histológicas de la celularidad epididimal (Figura 2), se destaca que el grupo TCOU, presentó una disminución de la masa espermática y de las microvellosidades luminales.

Tabla 1. Concentración, morfología y motilidad espermática semanal de perros tratados con coumestrol (grupo TCOU)

Semana	Concentración espermática $\times 10^8$ espermatozoides/ml.					Mann-Whitney <i>P</i>
	1*	2	3	4	5	
Tratado	1.79 \pm 0.001 (1.78-1.79)	1.58 \pm 0.05 (1.48-1.68)	1.17 \pm 0.09 (1.01-1.32)	0.952 \pm 0.03 (0.41-1.49)	0.420\pm0.002^a (0.41-0.42)	<0.05
Control	1.79 \pm 0.001 (1.78-1.79)	1.68 \pm 0.03 (1.68-1.78)	1.68 \pm 0.04 (1.58-1.70)	1.60 \pm 06 (1.55-1.79)	1.78 \pm 0.02 (1.70-1.79)	>0.05
Motilidad espermática %						
Mediana (Q1-Q3)						
Tratado	>90 (89-92)	>90 (88-91)	50^a (50-50)	50^a (45-60)	60^a (50-60)	<0.05
Control	>90 (89-92)	>90 (89-92)	>90 (89-92)	>90 (89-92)	>90(89-92)	>0.05
Morfología espermática % \pm EE						
Tratado	86 \pm 1.5	88 \pm 1.1	65\pm7.0^a	56\pm5.5^a	57\pm2.9^a	<0.05
Normal						
Control	86 \pm 1.5	87 \pm 2.0	88 \pm 1.0	86 \pm 2.0	89 \pm 1.5	>0.05
Normal						



Tratado Cola enrollada	1±0.80	4±1.5	10±4.5^a	9±4.5^a	5±2.5	<0.05
Control Cola enrollada	1±0.80	1±0.5	-	-	-	>0.05
Tratado Gota proximal	-	-	-	2±2	7±4	>0.05
Control Gota proximal	-	-	-	-	-	-
Tratado Gota distal	-	1±0.5	1±0	7±1^a	-	<0.05
Control Gota Distal	-	-	-	-	-	-
Tratado Cola Doblada	4±2	2±0.25	18±10	34±13^a	32±6.9^a	<0.05
Control Cola Doblada	4±2	2±1	-	-	2±1	>0.05

* Inicio del tratamiento. ^a Indica el parámetro donde existe diferencia significativa en la prueba de Mann-Whitney

Tabla 2. Ecogenicidad gonadal en perros de Grupo control y tratados con coumestrol

Grupo /Cuartil	Control Mediana±EE	Q1-Q3 Mediana	Coumestrol Mediana±EE	Q1-Q3 Mediana	Mann Whitney P
Parénquima	63.9±2.6	45.5-77.5	69.9±2.9	51.5-83.5	>0.05
Mediastino	67.3±2.0	55.5-77.0	60.0±2.4	46.5-73	<0.01
Cabeza del epidídimo	53±2.9	35.5-64	44±1.8	39-47	<0.05

Ecografía gonadal / Pixeles gris



Tabla 3. Parámetros de celularidad del epidídimo de perros tratados con coumestrol

Cabeza del Epidídimo	Control Mediana±EE	Q1-Q3 Mediana	Coumestrol Mediana±EE	Q1-Q3 Mediana	Mann Whitney P
Morfometría					
Diámetro µm	273±5.7	235-306	314±5.3	279-340	<0.01
Área µm ²	60882±2593	43665-73608	79688±2716	61362-90872	<0.01
Grosor del epitelio µm	59.7±1.0	53.4-64.4	75.9±1.0	67.0-83.6	<0.01
Longitud de las microvellosidades en µm	23.6±0.4	20.8-25.6	13.0±0.6	8.6-17.9	<0.01
Espermatozoides (Área del paquete espermático en µm ²)	12703.9±2026.7	7991.1-18201.5	8371.8±2605.5	781.0-14181.5	<0.05

Presencia de receptores estrogénicos

La presencia de receptores estrogénicos (Figura 3 y Tabla 4), se evidenció con el incremento numérico en la media de los pixeles, en el tejido conectivo en las estructuras del epidídimo del grupo TCOU de 21.5±0.9 comparado con el grupo C el cual presentó de 6±0.5 (p>0.05).

Tabla 4. Intensidad de fluorescencia asociada a la presencia de receptores estrogénicos

Grupo /Cuartil	Control Mediana±EE	Q1-Q3 Mediana	Coumestrol Mediana±EE	Q1-Q3 Mediana	Mann Whitney P
Epitelio	1.4±0.1	0-3	3.1±0.4	0-5.7	<0.01
Tejido conectivo	6.0±0.5	3-8	20.9±0.9	14.2-26	>0.05

Intensidad de fluorescencia / Pixeles Verdes

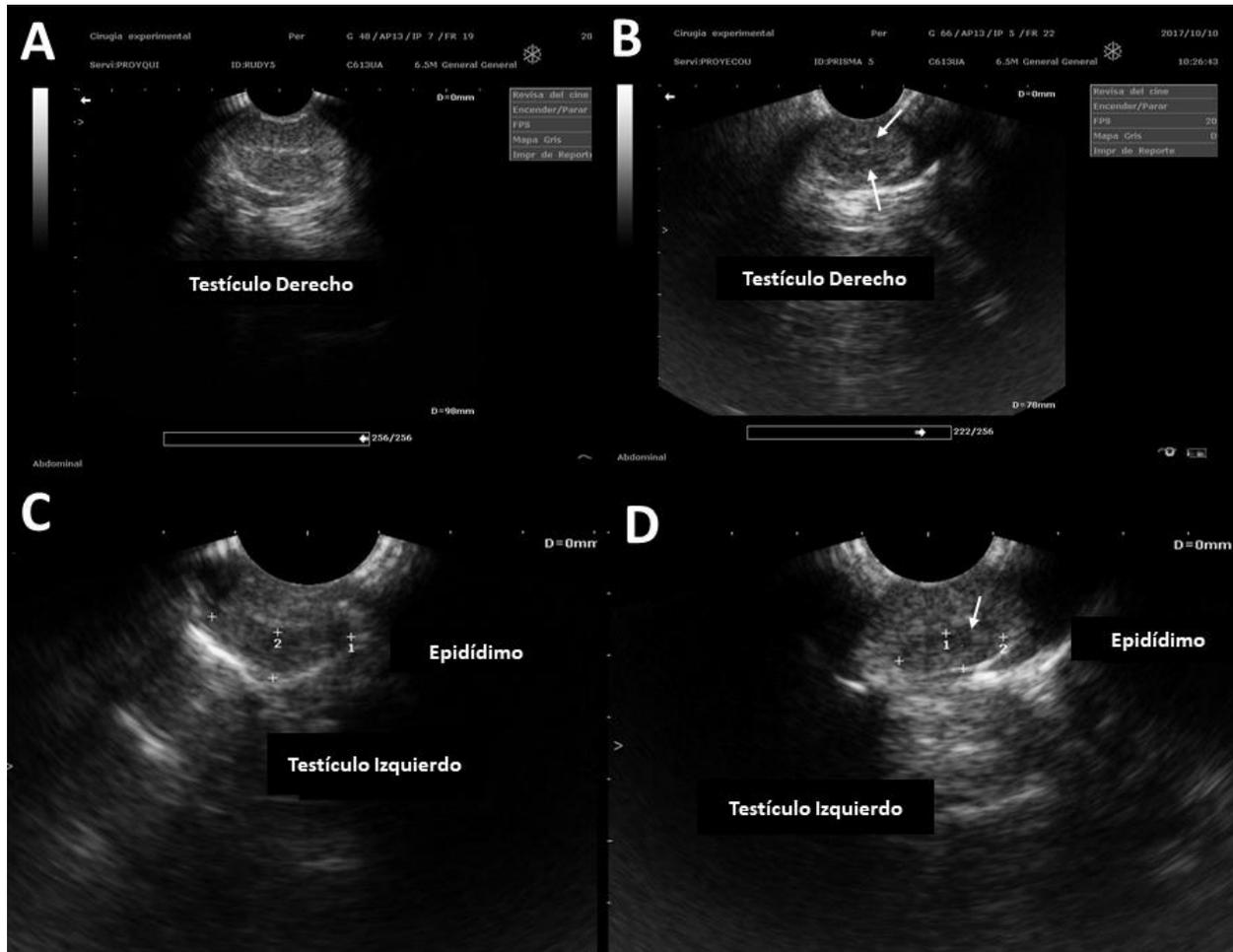


Figura 1. Ecografía de testículo y epidídimo. Se observa: **A.** Grupo control. **B.** Grupo TCOU, nótese la disminución en la ecogenicidad a la altura del hilio testicular (flechas). **C.** Ecogenicidad evidente en epidídimo de perros del grupo control. **D.** Ecogenicidad menor en epidídimo de perros del grupo TCOU.

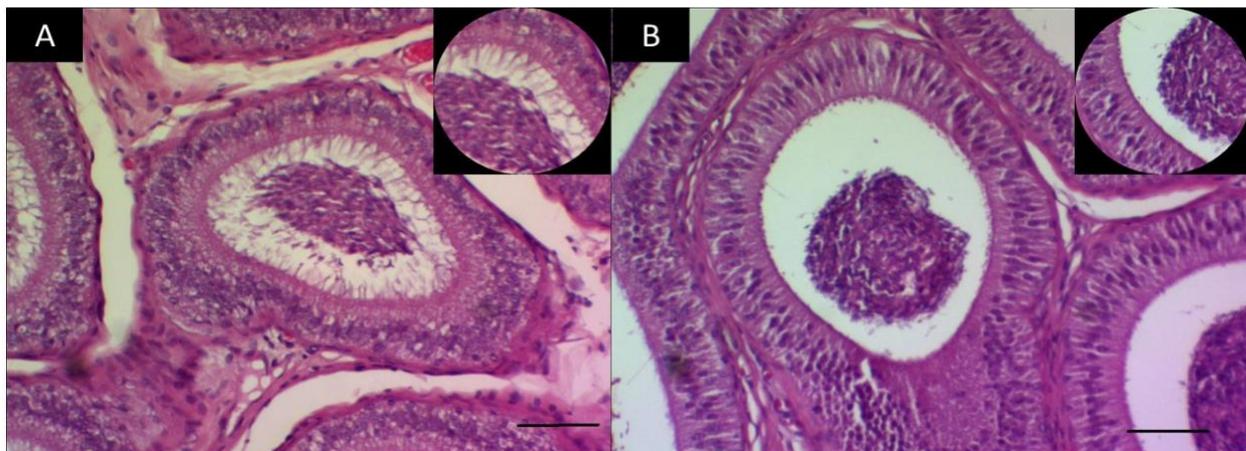


Figura 2. Corte histológico de un segmento de la cabeza del epidídimo. **A.** Cabeza del epidídimo grupo control (40X), inserto detalle de las microvellosidades **B.** Cabeza de epidídimo grupo tratado con coumestrol (40X), inserto ampliación del detalle que muestra ausencia de las microvellosidades. Barra 100µm.

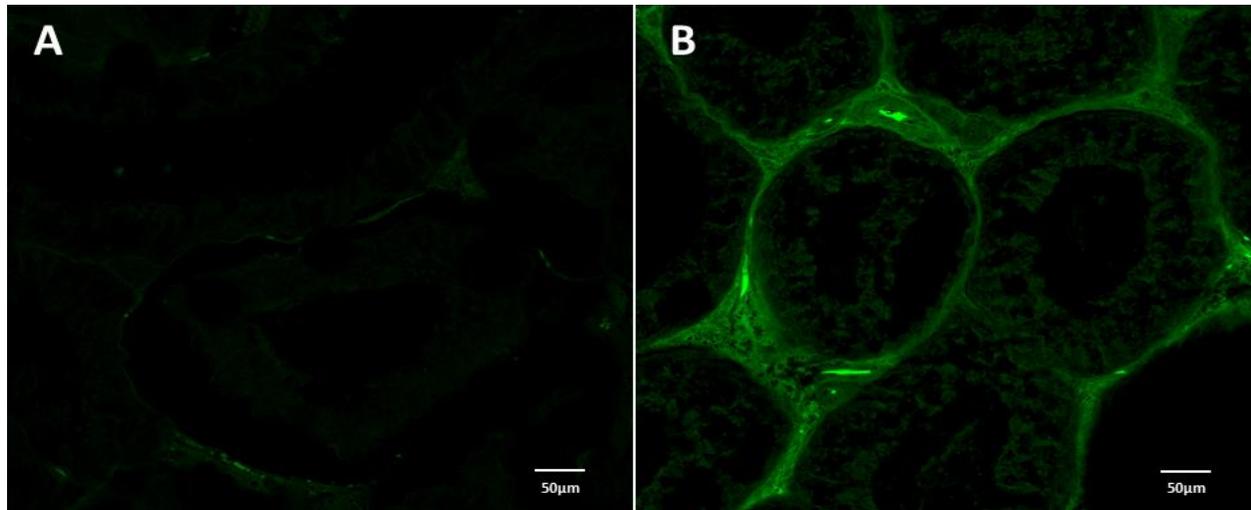


Figura 3. Fluorescencia, en epidídimo, que demuestra la presencia de receptores a estrógenos (coumestrol). A. Fluorescencia escasa en el epidídimo de perros del grupo control, en los cuales destaca la disminución de epitelio. **B.** Fluorescencia intensa en el epidídimo de perros tratados con coumestrol en los cuales se evidencia el incremento del tejido conectivo.

Parámetros hormonales

Los niveles hormonales determinados (Figura 4), mostraron diferencias entre el grupo C y el grupo TCOU. En el grupo C, los niveles de testosterona se mostraron constantes, por el contrario, se determinó una variación en los niveles de estradiol. En el grupo TCOU, a partir de la semana cuatro y de manera tendiente, hasta la semana cinco fue evidente un descenso en los niveles de testosterona, asociados a un incremento en los niveles de estradiol.

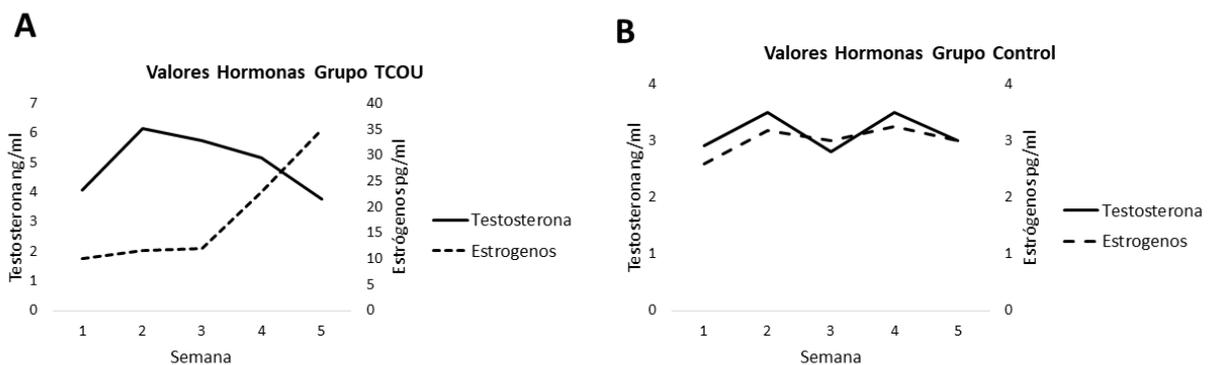


Figura 4.- Valores de testosterona y estrógenos séricos. A. En perros tratados con coumestrol, fue evidente la disminución de testosterona asociado con el incremento de estradiol, **B.** En perros de grupo control no se evidenció relación entre hormonas por efecto del coumestrol.



DISCUSIÓN

Los eyaculados caninos normales deben tener al menos un 80% de espermatozoides morfológicamente normales y viables (Chłopik & Wysokińska, 2020). En este estudio se encontró la morfología espermática normal del 60% o inferior a partir de la tercera semana del tratamiento, lo que es similar a lo reportado en perros considerados infértiles (Barbosa de Souza *et al.*, 2015). La disminución en la concentración espermática y el incremento de espermatozoides con gota citoplásmica son evidencia del efecto inhibitorio de la actividad gonadal por efecto del coumestrol.

La motilidad espermática reportada en perros fértiles debe ubicarse por encima del 70% (Johnston, 1991), en el presente estudio en los perros del grupo TCOU a partir de la semana 3 se ubicó en 60% o menor, valor similar a lo reportado en perros infértiles (Barbosa de Souza *et al.*, 2015). En el presente estudio se encontraron alteraciones secundarias de la morfología espermática, las cuales se asocian con su maduración en el epidídimo o durante la preparación de muestras de semen. Dentro de las principales alteraciones se encontraron cola fuertemente enrollada a partir de la semana 3 y la gota citoplásmica distal a partir de la semana 4 post tratamiento. Un punto para considerar al interpretar estos resultados es que el tiempo medio del paso por el epidídimo de los espermatozoides en perros domésticos es de 15 días (3 semanas) (Chłopik & Wysokińska, 2020), mismo intervalo de tiempo en que se empezaron a detectar alteraciones en el espermiograma.

Debido a que la estructura de los fitoestrógenos es similar a la de los estrógenos endógenos y tienen la capacidad de unirse a los RE, es posible observar efectos fisiológicos en los tejidos que expresan al receptor (Rietjens *et al.*, 2017; Beszterda & Frański, 2018). Una vez que la molécula del COU se une a cualquiera de los receptores estrogénicos (ER α y ER β) puede emitir una señal fluorescente (Serrano *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). En el presente estudio, se detectó dicha señal con mayor intensidad en el tejido conectivo del epidídimo de los perros del grupo TCOU, lo que confirma que el COU es absorbido y probablemente se une a los receptores estrogénicos presentes en este tejido, lo cual previamente fue reportado por Pérez-Rivero *et al.* (2014) en testículos de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) adultos y por Serrano *et al.*, (2008) en perros machos, en ambos casos cuando se administró COU por la vía oral. Con respecto a la ecogenicidad del parénquima testicular se aprecia homogénea en toda la periferia, se observa una zona con disminución de la ecogenicidad en la región del mediastino, la cual corresponde a la localización de los conductos deferentes y la red testicular, lo que concuerda con los cambios encontrados a nivel histológico relacionados con la dilatación de los túbulos del epidídimo, la pérdida de las microvellosidades y la disminución del contenido de espermatozoides en su lumen (Mantziaras, 2020; Lubinus *et al.*, 2006).

El proceso de biosíntesis de estrógenos depende de la actividad de la enzima aromatasa, un miembro de la superfamilia del citocromo P450 (Hess & Cooke, 2018). La aromatasa



es responsable de convertir la testosterona y la androstenediona en estrógenos aromáticos, 17β -estradiol y estrona, respectivamente (Hess & Cooke, 2018). Se ha descrito que el COU puede unirse a la enzima aromatasa, lo que provoca la inhibición de la biosíntesis de estrógenos, por lo que, es posible considerar que el aumento en la concentración sérica de testosterona se deba a este efecto (Wyse *et al.*, 2021; Lephart, 2015).

Los estrógenos se encuentran en concentraciones elevadas en las células epiteliales que recubren los conductos eferentes, siendo su principal función reabsorber el líquido luminal y con ello aumentar la concentración de espermatozoides. La ausencia del efecto biológico de los estrógenos induce la acumulación de líquido en los conductos eferentes, lo que finalmente genera dilatación de los mismos y de la rete testis, de manera posterior se presenta disminución de la altura epitelial, del número y altura de las microvellosidades en el epidídimo y de manera posterior la atrofia del epitelio seminífero, todos estos cambios favorecen la dilución del semen (Hess & Cooke, 2018; Pérez-Rivero *et al.*, 2009).

CONCLUSIÓN

Los estudios realizados, demostraron que la administración subcutánea de coumestrol puede ser una alternativa no invasiva para disminuir la capacidad fertilizante de los perros, ya que indujo alteraciones en la actividad y celularidad gonadales asociadas a la disminución de la producción y calidad espermática. Sin embargo, aún se requieren estudios para evaluar su posible efecto reversible y capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Financiamiento

El estudio contó con el apoyo de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM), proyecto de investigación DCBS.445.12

Agradecimientos

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca para estudios de Doctorado en Ciencias de A.J.R.

Los autores agradecen al refugio de protección animal Fundación Calidad de Vida A.C., por proporcionar sus instalaciones y el apoyo en el cuidado de los perros (convenio celebrado con la UAM-X con fecha 27 junio 2016).

A Laura Karen Camarillo Rodea por su ayuda en el manejo de animales durante la evaluación clínica y la recolección de muestras biológicas.

A Susana Rojas Maya (†) por su generoso apoyo y asistencia técnica durante la evaluación hormonal.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés



Contribución de los autores

A.J.R: Diseñó y realizó el estudio, recolectó los datos y muestras biológicas, realizó el trabajo de laboratorio, analizó e interpretó los resultados, redactó y aprobó el manuscrito final.

J.J.P.R: Concibió la idea original y diseño el estudio, supervisó el estudio, analizó e interpretó los datos, realizó revisión crítica del manuscrito y aprobó el manuscrito final.

J.A.H.B: Realizó revisión crítica del manuscrito y aprobó el manuscrito final.

A.A.S: Realizó revisión crítica del manuscrito y aprobó el manuscrito final.

M.P.M: Realizó revisión crítica del manuscrito y aprobó el 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

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
- 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, Atflan 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>