

Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral

Effect of coumestrol on sperm production and smell exploratory behavior in dogs stimulated with vaginal mucus

Juan José Pérez-Rivero*** José Juan Martínez-Maya** Mario Pérez-Martínez***
Álvaro Aguilar-Setián† Héctor Serrano‡

Abstract

Dog overpopulation is a major health problem in developing countries due to the existence of some zoonotic diseases in which dogs act as reservoirs, besides the aggressive events to humans. Distribution, behavior patterns and combined methodologies are needed aspects in the design of successful dog population control programs. Coumestrol is a phytoestrogen which induces alterations in the reproductive male system, when bind to alpha and beta estrogen receptors acting as an agonist or antagonist fashion. Both receptor types also exist in central nerve regions governing sexual behavior of those animals such as the preoptic area, ventro medial nucleus, the amygdala and the olfactory bulb. In this study, 300 µg/kg coumestrol was orally administered to male dogs, once a week for a 4 week period. Dogs were freed for 5 min in a 9 m² area having a recipient containing vaginal discharges from estrous dog females and other similar vessel containing sterile saline solution. Smelling latency time for each recipient, smelling frequency and territory marking in response to stimulus, was recorded. At the end of the test, semen was collected and evaluated. A significant difference ($P < 0.005$) in smelling latency time and smelling frequency to the vaginal discharge was found; sperm count decreased from $518.4 \pm 215.4 \times 10^6$ to $57.6 \pm 50.4 \times 10^6$ at week 4 and the abnormal sperm morphology increased from $14.7 \pm 3.3\%$ at 0 week to $60.0 \pm 20\%$. In conclusion, 300 µg/kg coumestrol given orally to male dogs for 4 weeks induces alterations in the olfactory behavior along with an oligo and teratospermic effect.

Key words: OLFATORY EXPLORATION, COUMESTROL, DOGS, SPERM PRODUCTION, VAGINAL MUCUS.

Resumen

La sobrepoblación canina es un problema importante de salud pública debido a la transmisión de enfermedades zoonóticas y las agresiones hacia el humano. En el diseño de programas para controlar la población canina se requiere del conocimiento de su distribución, comportamiento y metodologías combinadas para tener éxito. El coumestrol es un fitoestrógeno que induce alteraciones en el aparato reproductor de los machos al unirse a los receptores estrogénicos alfa y beta, en donde actúa de manera dosis-dependiente como agonista o antagonista. Estos receptores también existen en las estructuras del sistema nervioso que regulan el comportamiento sexual, como la región preóptica, núcleo ventromedial, la amígdala y el bulbo olfatorio. En este estudio se administró coumestrol (300 µg/kg) por vía oral a perros machos, una vez por semana durante cuatro semanas; los perros se colocaron durante cinco minutos en un área aislada de 9 m² en donde se colocó un frasco conteniendo secreciones vaginales obtenidas de perras en estro y otro con solución salina estéril. Se registró el tiempo de latencia de los perros para olfatear cada frasco, su frecuencia de respuesta y la frecuencia con que se presentó conducta de marcaje en respuesta al estímulo. Una vez concluido el experimento, se obtuvo semen y se evaluó. Se encontró diferencia significativa ($P < 0.005$) en el periodo de latencia y frecuencia con la que el macho se acercó a oler las secreciones vaginales y el conteo espermático disminuyó de $518.4 \pm 215.4 \times 10^6$ al inicio del estudio a $57.6 \pm 50.4 \times 10^6$ en la semana cuatro y el porcentaje de anomalías espermáticas aumentó de 14.7 ± 3.3 puntos en la semana 0 a $60.0 \pm 20.0\%$ en la semana cuatro. Se concluye que el tratamiento de perros con coumestrol durante cuatro semanas ocasiona alteraciones en la conducta de exploración olfatoria y tiene un efecto oligospermico y teratospermico.

Palabras clave: EXPLORACIÓN OLFATORIA, COUMESTROL, PERROS, PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA, MOCO VAGINAL.

Recibido el 8 de enero de 2008 y aceptado el 13 de octubre de 2008.

*Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

**Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Departamento de Morfología, Laboratorio "Rosa Emilia Lavielle" de Biología Tisular de la Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

†Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Pediatría, Avenida Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720, México, D. F.

‡Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. La Purísima, 09340, México, D. F., Tel.: 5804-4733, Fax: 5804-4727, correo electrónico: hser@xanum.uam.mx

Nota: Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor

Introduction

Dogs are a prolific species with particular reproductive traits. It has been estimated that in six years a bitch and its offspring have the potential to produce 67 thousand new dogs;^{1,2} in this context, the overpopulation of free-roaming dogs on the streets of Mexico City constitutes a public health problem.³

Canine overpopulation has the risk of zoonotic diseases such as: rabies,⁴ leptospirosis,⁵ and different parasitosis.⁶ In occasions, dogs can transmit these diseases to humans, this combined with cases of physical aggression occasionally inflicted, in which children are often affected.^{7,8}

The elaboration of dog population control programs requires knowledge of its distribution, behavior patterns, as well as the use of combined methodologies to achieve this objective with success.

Besides surgical sterilization of both genders and intra-testicular injection of different chemical agents, the strategies for reproductive function control of this species includes the use of different proteic preparations from porcine zona pellucida,⁹ gonadotropin releasing hormone or even from the gonadotropin itself.¹⁰ Nowadays, the use of some phytoestrogens is being studied for the reproductive control of wild species.¹¹ In this sense, within the list of known phytoestrogens, coumestrol seems to have promising results.

Coumestrol (COU) is a phytoestrogen belonging to the coumestans family, it is found in plants such as alfalfa (*Medicago sativa*) and soy germ.¹² COU (68.8 mg/kg of dry alfalfa) alters the reproductive system of bovines and ovines;¹³ females present hemorrhagic follicles, turgid uterus, placenta retention and libido decrease in males.¹⁴

Besides, it has been reported that coumestrol administered in doses of 100 µg/g in the diet, affects the neuroendocrine development of lactating rats in both sexes. In lactating adult females, it is possible to induce an anovulatory syndrome with several oral expositions. COU additive effects have been observed only when they are administrated by oral via, this last as consequence of the prolonged half-life of elimination. Yamada *et al.*¹⁵ suggest that COU is structurally modified by the action of bacteria present in the digestive tract, for its subsequent absorption and transport in the vascular system, hepatic metabolism and finally discharge in urine. It has been reported that it causes an important weight and libido decrease in males.^{16,17}

COU binds to beta estrogen receptors (βER) with greater affinity than 17 estradiol as well as alpha estrogen receptors (αER) with lesser affinity and has agonist and antagonist effects on both receptors, depending on the administered dose.¹⁸

Introducción

Los perros son una especie prolífica con características reproductivas particulares. Se estima que en seis años una perra y sus crías tienen el potencial para procrear 67 mil nuevos perros;^{1,2} en este contexto, la sobrepoblación de perros callejeros constituye un problema de salud pública en la Ciudad de México.³

Los riesgos que implica la sobrepoblación canina estriban en que esta especie es susceptible de padecer varias enfermedades de tipo zoonótico, como rabia,⁴ leptospirosis,⁵ y distintas parasitosis.⁶ En ocasiones, los perros pueden transmitir este tipo de enfermedades al humano, ello aunado a los casos de agresiones físicas que en ocasiones infligen, en las que los niños resultan afectados con mayor frecuencia.^{7,8}

La elaboración de programas de control de la población de perros callejeros requiere del conocimiento de su distribución, patrones de comportamiento, así como del empleo de metodologías combinadas para lograr dicho objetivo con éxito.

Además de la esterilización quirúrgica en ambos géneros y la inyección intratesticular con diferentes agentes químicos, las estrategias para controlar la función reproductiva de esta especie incluyen el uso de diferentes preparaciones proteínicas de la zona pelúcida porcina,⁹ de la hormona liberadora de gonadotropinas o incluso de las propias gonadotropinas.¹⁰ Actualmente se estudia el uso de algunos fitoestrógenos para el control reproductivo en especies silvestres.¹¹ En este sentido, dentro de la lista de fitoestrógenos conocidos, el coumestrol parece tener efectos prometedores.

El coumestrol (COU) es un fitoestrógeno de la familia de los coumestanos, se encuentra en plantas como la alfalfa (*Medicago sativa*) y en el germen de soya.¹² El coumestrol (68.8 mg/kg de alfalfa seca) altera el aparato reproductor de bovinos y ovinos;¹³ en hembras se presentan folículos hemorrágicos, útero turgente, retención placentaria y disminución de la libido en los machos.¹⁴

Además, se ha notificado que el coumestrol administrado en dosis de 100 µg/g en la dieta, afecta el desarrollo neuroendocrino de ratas lactantes en ambos géneros. En hembras adultas en lactancia, es posible inducir con varias exposiciones orales un síndrome anovulatorio. Los efectos aditivos del coumestrol se han observado cuando ingresan por vía oral y no por la vía parenteral, esto último como consecuencia de la prolongada vida media de eliminación. Yamada *et al.*¹⁵ proponen que es modificado en su estructura por la acción de bacterias presentes en el tracto digestivo, para su posterior adsorción y transporte en el sistema vascular, metabolismo hepático y

Also, β ER express themselves in different regions of the testicles, associated with spermatogenesis, like efferent ducts, epididymis, vas deferens and prostate.¹⁹ Likewise, its expression and accumulation has been shown in places related with behavior, such as preoptic region, involved in the sexual behavior of the male, besides the ventromedial nucleus, the amygdala and olfactory bulb (OB), which take part in sexual excitation modulation.^{20,21}

The olfactory system of mammals has the capacity to detect different molecules²² by means of chemosensory systems, like pheromones. These substances are secreted to the exterior of an individual and captured by a second individual of the same species, in which it induces a specific conduct,²³ for instance, the Flehmen reflex in many ruminant species.²⁴ This same signal is received by diverse chemosensory systems, like the main olfactory epithelium, which is mainly formed by ciliated sensorial olfactory neurons, which projections reach to the OB and the vomeronasal organ.^{25,26}

The capacity of dogs to detect and associate specific odors is well documented,^{27,29} even from birth they can associate odors from food to which its mother was exposed during gestation.³⁰ The detection of pheromones is no exception, these contain volatile elements of low molecular weight, capable of exerting an appealing action from females in heat to males, from considerable distances, stimulating mount behavior.²³

From vaginal mucus secretions of females in estrus, it has been possible to isolate a pheromone chemically identified as methyl-p-hydroxybenzoate, which is capable of sexually attract male dogs.^{31,32}

The aim of this study was to evaluate the effect of COU administered oral via on the spermatoc production and the olfactory exploration behavior of dogs stimulated with vaginal mucus of bitches in estrus.

Material and methods

Vaginal secretions were obtained from five mixed-breed bitches in estrus, previous diagnosis of their physiological status by exfoliative vaginal cytology.^{31,32} For this purpose, secretions contained in the vaginal vestibule of the bitches were collected during three days with sterile swabs, the impregnated cotton points were placed in sterile vials that were kept closed at -20°C , until used for the experiment.

The evaluation of the vaginal secretion effect was done according to the criteria described by Goodwin *et al.*³³ The experiment was carried out using five mixed-breed dogs, clinically and reproductively healthy from 1.5 to 3 years old and with an average weight of 10.1 ± 3.3 kg. In these males the absence of antibodies against *Brucella canis* was verified by means of the plate agglutination test. During the experiment, males were

finalmente su desecho en la orina. En machos se ha informado que ocasiona disminuci3n importante de peso y de la libido.^{16,17}

El COU se une a los receptores estrog3nicos beta (ER β) con mayor afinidad que el 17 β estradiol, as3 como a los receptores estrog3nicos alfa (ER α) con menor afinidad y tiene efectos agonistas o antagon3nicos sobre ambos receptores, seg3n la dosis administrada.¹⁸

Asimismo, los ER β se expresan en diferentes regiones en el test3culo, asociadas con la espermatog3nesis, como los conductos eferentes, epid3dimo y conductos deferentes, adem3s de la pr3stata.¹⁹ Igualmente, se ha demostrado su expresi3n y acumulaci3n en sitios relacionados con el comportamiento, como la regi3n pre3ptica, implicada en la conducta sexual del macho, adem3s del n3cleo ventromedial, la am3gdala y el bulbo olfatorio (BO), que intervienen en la modulaci3n de la excitaci3n sexual.^{20,21}

El sistema olfatorio de los mam3feros tiene la capacidad de detectar diferentes mol3culas²² por medio de los sistemas quimiosensoriales, como las feromonas. Estas sustancias son secretadas hacia el exterior de un individuo y son captadas por otro individuo de la misma especie, en el que inducen una conducta especifica;²³ por ejemplo, el reflejo de Flehmen en muchas especies de rumiantes.²⁴ Esa misma se3al es captada por diversos sistemas quimiosensoriales, como el epitelio olfativo principal, el cual est3 formado principalmente por neuronas sensoriales olfatorias ciliadas, cuyas proyecciones llegan al BO y al 3rgano vomeronasal.^{25,26}

La capacidad de los perros para detectar y asociar olores espec3ficos est3 bien documentada,²⁷⁻²⁹ incluso desde el nacimiento pueden asociar olores de los alimentos a los que su madre fue expuesta durante la gestaci3n.³⁰ La detecci3n de feromonas no es la excepci3n, 3stas contienen elementos vol3tiles de bajo peso molecular, capaces de ejercer una acci3n atrayente de las hembras en celo hacia los machos, desde distancias considerables, estimulando la conducta de monta.²³

A partir de las secreciones de moco vaginal de las hembras en estro, se ha aislado una feromona identificada qu3micamente como metil p-hidroxibenzoato, que atrae sexualmente a perros machos.^{31,32}

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del COU administrado v3a oral sobre la producci3n esperm3tica y la conducta de exploraci3n olfatoria de perros estimulados con moco vaginal de perras en estro.

Material y m3todos

Las secreciones vaginales se obtuvieron a partir de cinco perras mestizas en estro, previo diagn3stico de su

individually housed in facilities with enough space to exercise, with water and *ad libitum* commercial type feed. All dogs received a chewing toy with the objective to enrich their environment.³⁴

Before receiving COU treatment, the parameters to be evaluated in this study were determined in the dogs: this period was considered as week “zero”, so that each dog would be its own control and thus compare it with the treatment effect during the experiment. In this way, the reported values during week “zero” correspond to dogs without treatment. All animals received one weekly dose of 300 µg/kg of COU by oral via, during four weeks.

The experiments were carried out in an empty and clean room of 9 m². Here, two glass vials with perforated caps at a distance of three meters between them, were fixed to the floor with adhesive tape equidistant to the only access,

Once a week, each dog was put in the evaluation room during five minutes, time in which latency response was observed and recorded with chronometer, which was defined as the time that each animal spent in manifesting olfactory interest for the flask content and the number of times it approached each vial for more than five seconds. Besides, the number of times the dogs urinated, raising their hind leg after smelling the content of any of the vials was recorded. The individual evaluations were followed by room clean up with sodium hypochlorite and ventilation for at least two hours before evaluating the next dog.

Once the experiment concluded, semen was collected by hand stimulation from each dog in a nylon collector cone.³⁵ In each ejaculate, using a phase contrast microscope* and a hemocytometer, the total number of normal spermatozooids and spermatozooids with morphological alterations were determined by manual means.^{36,37}

In order to obtain the result statistical analysis, repeated measurement variance of analysis was used, comparing the total number of spermatozooids of each dog during the experimental weeks; likewise, latency period, frequency of olfactory exploration behavior response and urine territorial marking by means of repeated measurements of Friedman’s test were compared. Every thing with the facility of SAS statistical program.^{38,39}

Results

The smelling frequency of the container with vaginal secretions significantly decreased from the first to the fourth week. These values varied from 2.6 ± 1.95 times on week “zero” to 0.6 ± 0.55 in the fourth week (P < 0.01). Likewise, the minor frequency of urine territorial marking of the dogs was observed in the fourth

estado fisiológico por citología vaginal exfoliativa.^{31,32} Para este fin, se recolectaron durante tres días con hisopos estériles, las secreciones contenidas en el vestíbulo vaginal de las perras, las puntas de algodón impregnadas se depositaron en viales estériles que se mantuvieron cerrados a -20°C, hasta que fueron usados para el experimento.

La evaluación del efecto de las secreciones vaginales se realizó de acuerdo con el criterio de Goodwin *et al.*³³ El experimento se realizó utilizando cinco perros mestizos clínica y reproductivamente sanos de 1.5 a tres años de edad y con peso promedio de 10.1 ± 3.3 kg. En estos machos se verificó ausencia de anticuerpos contra *Brucella canis* mediante la prueba de aglutinación en placa. Durante el experimento, los machos fueron alojados de manera individual en instalaciones con suficiente espacio para hacer ejercicio, con agua y alimento de tipo comercial *ad libitum*. A todos los perros se les proporcionó un juguete para morder con el fin de enriquecer su medio ambiente.³⁴

Antes de recibir el tratamiento con COU, se determinaron en los perros los parámetros a evaluar en el estudio: a este periodo se le consideró la semana cero, de tal manera que cada animal fuera su propio testigo y así compararlo con el efecto del tratamiento durante el tiempo del experimento. De esta manera, los valores notificados durante la semana cero corresponden a los perros sin tratamiento. A todos los animales se les administró vía oral una dosis semanal de 300 µg/kg de COU, durante cuatro semanas.

Los experimentos se efectuaron en una habitación vacía y limpia de 9 m². En ésta se colocaron en el suelo y equidistantes al único acceso, dos frascos de cristal con tapas perforadas a tres metros de distancia entre ellos, fijados al piso con cinta adhesiva; uno de los frascos contenía las secreciones vaginales y el otro sólo puntas de algodón humedecidas con solución salina estéril (SSE).

Una vez por semana cada perro fue colocado en el cuarto de evaluación durante cinco minutos, en ese tiempo se observó y se registró con un cronómetro la latencia de respuesta, la cual se definió como el tiempo que tardó cada animal en manifestar interés por explorar olfatoriamente el contenido de los recipientes y el número de veces que se aproximó a cada uno de los dos frascos durante más de cinco segundos. Además, se registró el número de veces en que los perros orinaron, levantando la pata en el cuarto después de oler el contenido de alguno de los recipientes. Las evaluaciones individuales eran seguidas de limpieza de la habitación, con hipoclorito de sodio y ventilación por al menos dos horas antes de hacer la evaluación del siguiente perro.

Una vez concluido el experimento, mediante estimulación manual se recolectó semen de cada perro

week, initiating in 2 ± 0.63 and culminating in 0.4 ± 0.49 ($P < 0.005$) (Figure 1). There were no significant differences ($P > 0.05$) in the SSE during the evaluation period.

The latency response time to the vaginal secretions significantly increased from the first to the third week and was constant during the fourth week (Figure 2). Likewise, latency of urine marking increased; initially it was 0.54 ± 0.35 seconds, and in the fourth week, 2.45 ± 2.35 minutes ($P < 0.005$).

The total number of ejaculated spermatozooids significantly decreased ($P < 0.005$) going from $518.4 \pm 215.4 \times 10^6$ on week zero to $57.6 \pm 50.4 \times 10^6$ on week four. The percentage of spermatozooids that presented spermatid morphology alterations went from $14.7 \pm 3.3\%$ on week zero to $60.0 \pm 20.0\%$ on week four ($P < 0.005$) (Figures 3, 4).

Discussion

Estrogens are essential for spermatogenesis. In the experimental model of α ER (α ERKO) deficient mice it has been observed that they are infertile, because α ER is necessary in the deferent ducts, important for re-absorption of fluids coming from the *rete testis*.⁴⁰

COU capacity to bind α ER and β ER is already known.⁴¹ In dogs, both types of receptors are found in the testicles,⁴² therefore, this phytoestrogen can act on them depending on the administered doses, as estrogen antagonist on α ER. This interaction induces a similar state as α ERKO in regard to re-absorption of fluids at deferent duct level. This effect induces spermatozoid number reduction into the epididymis. As consequence of the fluid dynamic alteration, these accumulate in the testis, damage the germinal epithelium of the seminiferous tubules and, therefore, produce alterations in the development of spermatozooids.^{40,43} In this study, the histopathological evaluation was not performed; nevertheless, as reported by Hess *et al.*,⁴⁰ it is possible that these alterations be the cause of oligospermia and teratospermia observed in the animals of this research.

It has been demonstrated the existence of α ER in the hypothalamus ventromedial and preoptic medial nuclei. These anatomic regions are associated with the sense of smell and sexual behavior. In female mice it has been found that coumestrol antagonizes the estrogen neuroendocrine effects through the estrogen type α receptor.⁴⁴

The increase of latency response period to vaginal secretions, observed in this study, is similar to the one presented in treated rats with COU in the diet.¹⁶ The loss of sexual behavior in mice is observed in $\alpha\beta$ ERKO experimental models, which indicates that both receptors complement themselves so that sexual behavior

en un cono recolector de nailon.³⁵ En cada eyaculado se determinaron de manera manual, empleando un microscopio de contraste de fases* y un hemocitómetro, los números totales de espermatozoides sanos y de espermatozoides con alteraciones morfológicas.^{36,37}

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó un análisis de varianza de mediciones repetidas, comparando el número total de espermatozoides de cada perro durante las semanas del experimento; asimismo, se comparó el periodo de latencia, la frecuencia de respuesta de la conducta de exploración olfatoria y del marcado de territorio con orina mediante prueba de Friedman de mediciones repetidas. Todo con las facilidades del programa de estadística SAS (SAS Institute, Cary, NC).^{38,39}

Resultados

La frecuencia de olfateo del recipiente con las secreciones vaginales disminuyó significativamente de la primera a la cuarta semanas. Estos valores variaron de 2.6 ± 1.95 veces en la semana cero a 0.6 ± 0.55 en la semana cuatro ($P < 0.01$). De igual manera, la menor frecuencia de marcado de territorio con orina de los perros se observó en la cuarta semana, iniciando en 2 ± 0.63 veces y culminando en 0.4 ± 0.49 ocasiones ($P < 0.005$). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las respuestas a la SSE durante el periodo de evaluación (Figura 1).

El tiempo de latencia de respuesta de los perros hacia las secreciones vaginales aumentó de manera significativa de la semanas uno a la tres y se mantuvo en la semana cuatro (Figura 2). De la misma manera, aumentó la latencia al marcado con orina; al inicio fue de 0.54 ± 0.35 segundos, y en la cuarta semana, de 2.45 ± 2.35 minutos ($P < 0.005$).

El número total de espermatozoides eyaculados disminuyó de manera significativa ($P < 0.005$) al pasar de $518.4 \pm 215.4 \times 10^6$ la semana cero a $57.6 \pm 50.4 \times 10^6$ hacia la semana cuatro. El porcentaje de espermatozoides que presentaron alteraciones en la morfología espermática pasó de 14.7 ± 3.3 puntos porcentuales en la semana cero a $60.0 \pm 20.0\%$ en la semana cuatro ($P < 0.005$) (Figuras 3 y 4).

Discusión

Los estrógenos son esenciales para la espermatogénesis. En el modelo experimental de ratones deficientes a los ER α (ER α KO) se ha observado que son infértiles, debido a que el ER α es necesario en los conductos deferentes, importante para la reabsorción de fluidos provenientes de la red testicular.⁴⁰

La capacidad del COU para unirse a los ER α y

*Carl Zeiss, Alemania.

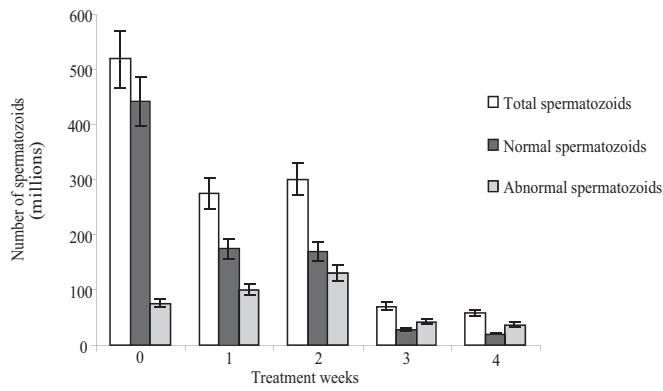


Figura 1: Frecuencia de exploración olfatoria de perros tratados con coumestrol. Cada barra representa el promedio de las mediciones de los cinco animales \pm DE.

Figure 1: Frequency of olfactory exploration of dogs treated with coumestrol. Each bar represents the average of the measurements of the five animals \pm SD.

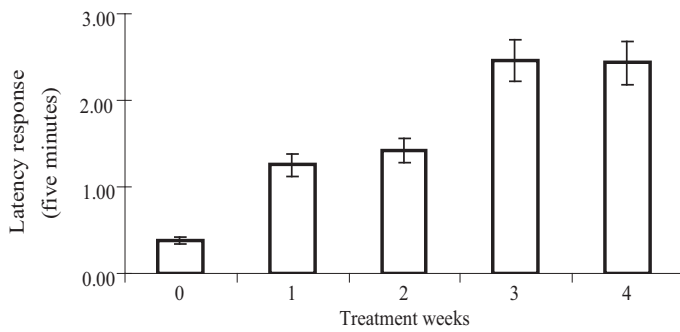


Figura 2: Latencia de respuesta olfatoria de perros tratados con coumestrol a secreciones vaginales de perras en estro. Cada barra representa el promedio de los animales utilizados \pm DE. El mayor tiempo de latencia se alcanzó en la tercera semana del experimento ($P < 0.005$).

Figure 2: Olfactory latency response of dogs treated with coumestrol for vaginal secretions of bitches in estrus. Each bar represents the average of the utilized dogs \pm SD. The greater time of latency was reached in the third week of the experiment ($P < 0.005$).

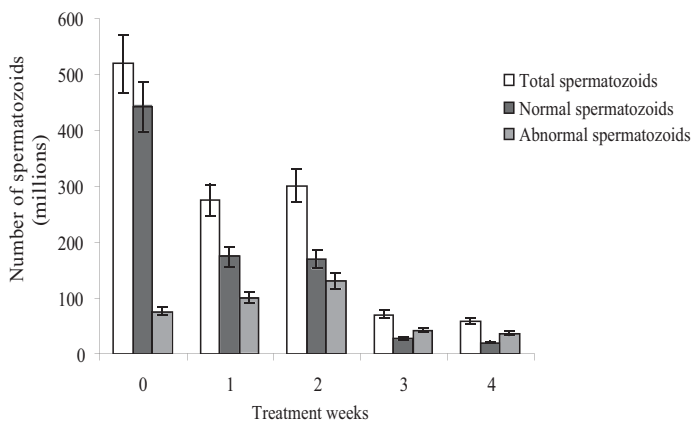


Figura 3: Número total de espermatozoides en eyaculados obtenidos de perros tratados con coumestrol. Cada barra corresponde al promedio de los cinco animales \pm DE.

Figure 3: Total number of spermatozooids in ejaculates obtained from dogs treated with coumestrol. Each bar corresponds to the average of five animals \pm SD.

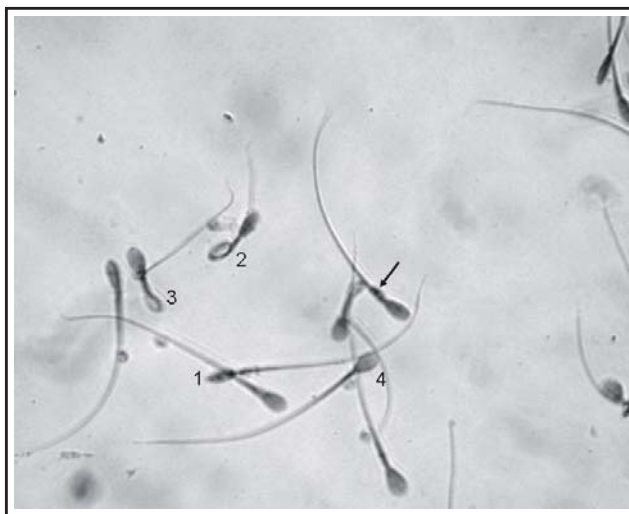


Figura 4: Morfología de los espermatozoides en eyaculados obtenidos de perros tratados con coumestrol. Cabeza de flama (1), nudo proximal (2), cola doblada (3), espermatozoide normal (4), la flecha señala una gota proximal.

Figure 4: Morphology of the spermatozooids in ejaculates obtained from dogs treated with coumestrol. Flame head (1), proximal knot (2), folded tail (3), normal spermatozoid (4), arrow shows a proximal drop.

can take place.²¹ The capacity of COU to bind to both receptors and its antagonist action towards these can be related to the alterations in olfactory exploration behavior of cervical mucus secretions of females in heat found in this study.

Besides alterations in pheromones response, it was observed that treatment to dogs with doses of 300 µg/kg of COU during four weeks have an oligospermic and teratospermic effect. As a whole, the ethological changes and morphological characteristics of the spermatozoids, observed in this study, indicate that, potentially, COU could be the first step for the development of new strategies for the control of free-roaming population dogs, as a product that is administered by oral via, it interferes with male sexual response and decreases ejaculated spermatozoid count. Nevertheless, it is necessary to evaluate COU effect on other aspects of dog physiology and endocrinology, with the aim to limit its utility for this objective and determine its possible secondary effects.

Acknowledgements

Special thanks to the National Council of Science and Technology (Conacyt), for the scholarship granted to the first author, to carry out the studies of PhD in Production and Animal Health Sciences.

Referencias

1. FAULKNER LC. Dimensions of the pet population problem. *J Am Vet Med Assoc* 1975;166:477-478.
2. PAL SK. Parental care in free ranging dogs, *Canis familiaris*. *Appl Anim Behav Sci* 2005;90; 31-47.
3. SLATER MR The Role of veterinary epidemiology in the study of free-roaming dogs and cats. *Prev Vet Med* 2001, 48, 273-286.
4. ACHA PN, Szyfres B. Rabia. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol II, 3ª ed. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud. 2003: 351-383.
5. ASLANTAS O, ÖZDEMİR V, KILIÇ S, BABÜR C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol* 2005;129: 187-191.
6. MARTÍNEZ-BARBABOSA, FERNÁNDEZ PA, VÁSQUEZ TO, RUIZ HA. Frecuencia de *Toxacara canis* en perros y áreas verdes del sur de la Ciudad de México, Distrito Federal. *Vet Méx* 1998; 29:239-244.
7. OZANNE-SMITH J, ASHBY K, STATHAKIS VZ. Dog bite and injury prevention-analysis, critical review, and research agenda. *Inj Prev* 2001; 7:321-326
8. MÉNDEZ GR, GÓMEZ TM, SOMOZA AI, LIRAS MJ, PAIS PE, VELA ND. Mordeduras de perro. Análisis de 654 casos en 10 años. *An Esp Pediatr* 2002; 56:425-429.
9. SERRANO H, GARCÍA-SUÁREZ MD. Alteraciones en

ERβα es conocida.⁴¹ En los perros, ambos tipos de receptores se hallan en los testículos,⁴² por lo que este fitoestrógeno puede actuar sobre ellos dependiendo de la dosis que se administre, como antagonista estrogénico sobre el ERα. Esta interacción induce un estado similar al del ERαKO en lo que se refiere a la reabsorción de fluidos a nivel de los conductos deferentes. Este efecto induce la reducción del número de espermatozoides que ingresan al epidídimo. Como consecuencia de la alteración de la dinámica de los fluidos, éstos se acumulan en los testículos, dañan el epitelio germinal de los conductos seminíferos y, por ende, producen alteraciones en el desarrollo de los espermatozoides.^{40,43} En este estudio no se efectuó la evaluación histopatológica de los testículos; sin embargo, al igual que lo informado por Hess *et al.*,⁴⁰ es posible que estas alteraciones sean la causa de la oligospermia y teratospermia observadas en los animales del presente estudio.

Se ha demostrado la existencia de ERα en los núcleos ventromedial y preóptico medio del hipotálamo. Estas regiones anatómicas están relacionadas con el olfato y el comportamiento sexual. En ratones hembra se ha encontrado que el coumestrol antagoniza los efectos neuroendocrinos de los estrógenos a través del receptor estrogénico tipo α.⁴⁴

El aumento en el periodo de latencia de respuesta a las secreciones vaginales, observado en el presente estudio, es similar al que se presenta en ratas tratadas con COU en la dieta.¹⁶ La pérdida del comportamiento sexual en ratones se observa en los modelos experimentales ERαβKO, ello indica que ambos receptores se complementan para que el comportamiento sexual se efectúe.²¹ La capacidad de unión del COU a ambos receptores y su acción antagónica hacia éstos puede estar relacionada con las alteraciones en la conducta de exploración olfatoria de las secreciones de moco cervical de hembras en celo que se encontraron en este estudio.

Además de las alteraciones en la respuesta a feromonas, en el presente estudio se observó que el tratamiento de perros con dosis de 300 µg/kg de COU durante cuatro semanas tiene un efecto oligospermico y teratospermico. En conjunto, los cambios etológicos y las características morfológicas de los espermatozoides, observados en este estudio, indican que potencialmente el uso de COU podría servir de base para el desarrollo de nuevas estrategias para el control de poblaciones de perros no domiciliados, como un producto que se administre vía oral, interfiera con la respuesta sexual del macho y disminuya el conteo de espermatozoides eyaculados. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto del COU sobre otros aspectos de la fisiología y endocrinología del perro, a fin de deli-

ovarios de perras por inmunización activa con proteínas de ovocito de cerdo. *Vet Méx* 2001; 32:221-224.

10. SABEUR K, BALL BA, NET TM, BALL H, LIU KM. Effect of GnRH conjugated to pokeweed antiviral protein on reproductive function in adult male dogs. *Reproduction* 2003 125, 801-806.
11. SERRANO H, PEREZ-RIVERO JJ, AGUILAR-SETIEN A, DE PAZ O, VILLA-GODOY A. Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. *Reprod Fertil Develop* 2007; 19: 470-472.
12. MURKIS AL, WILCOX G, DAVIS R S. Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:297-303.
13. ADAMS NR. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci* 1995; 73:1509-1515.
14. ROMERO-R CM, Tárrago C M, Muñoz M R, Arista RR, Rosado G A. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Vet Méx* 1997; 28:25-30.
15. YAMADA T, YAMAMOTO A, FUJIOKA M, MIYAGI M, SAITO N, IMAI I *et al.* Characterization of urinary metabolites of a new benzofuroquinoline derivative 3,9-bis(N,N-dimethylcarbamoyloxy)-5H-benzofuro(3,-2C)-quinoline-6-one (KCA-098), in dogs. *Pharmazie* 1999; 54:672-677.
16. WHITEN PL, LEWIS C, RUSSELL E, NAFTOLIN F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208: 82-86.
17. WHITEN PL, RUSSELL E, NAFTOLIN F. Influence of phytoestrogen diets on estradiol action in the rat uterus. *Steroids* 1994;59: 443-449.
18. WHITTEN PL, PATISAUI B H. Cross-Species and interspecies comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect* 2001.109:5-20.
19. SAUNDERS PTK. Does estrogen receptor β play a significant role in human reproduction? *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16:222-227.
20. BODO C, RISSMAN EF. New roles for estrogen receptor β in behavior and neuroendocrinology. *Front Neuroendol* 2006; 27:217-232.
21. SIMPSON ER, DAVIS SR. Another role highlighted for estrogens in the male: Sexual Behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:14038-14040.
22. FILIARTE JC, MILLOT JL, ECKERLIN A. Behavioural variability of olfactory exploration of the pet dog in relation to human adults. *Appl Anim Behav Sci* 1991; 30:341-350.
23. MANTECA VX. *Etología clínica veterinaria del perro y del gato*. Barcelona: Ed. Multimedia, 2003.
24. PÉREZ-MARTÍNEZ M, MARTÍNEZ-MAYA JJ, OLIVERA LJI. Evaluación de diferentes fluidos corporales de la vaca, como inductores del reflejo de Flehmen en toros Holstein. *Vet Méx* 1999; 24:27-29.
25. BRENNAN PA, ZUFALL F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 2006; 444:308-315.
26. FIRESTEIN S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 2001; 413:211-218.
27. SOMMERVILLE BA, SETTLE RH, DARLING FMC, BROOM DM. The use of trained dogs to discriminate human scent. *Anim Behav* 1993; 46:189-190.

mitar su utilidad para este fin y determinar sus posibles efectos secundarios.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, la beca otorgada al primer autor para realizar los estudios de Doctorado en Ciencias de la Producción y la Salud Animal.

28. KIDDY CA, MITCHELL DS, HAWK HW. Estrus-Related Odors in Body Fluids of Dairy Cows. *J Dairy Sci* 1984; 67:388-391.
29. KIDDY CA, MITCHELL DS. Estrus-related odors in cows: Time of occurrence. *J Dairy Sci* 1981; 67:267-271.
30. WELLS DL, HEPPEL PG. Prenatal olfactory learning in the domestic dog. *Anim Behav* 2006; 72:681-686.
31. KUSTRIZ MVR. Reproductive behavior of small animals. *Theriogenology* 2005; 64:734-746.
32. SCHUTTE AP. Canine vaginal cytology-I. Technique and cytological morphology. *J Small Anim Pract* 1967;18: 301-306.
33. GOODWIN M, GOODING KM, REGNER F. Sex pheromone in the dog. *Science* 1979; 203:559-561.
34. HUBRECHT RC. A Comparison of social and environmental enrichment Methods for laboratory housed dogs. *Appl Anim Behav Sci* 1993;37:345-361.
35. KUTZLER MA. Semen collection in the dog. *Theriogenology* 2005; 64:747-754.
36. JOHNSTON SD, ROOT KUSTRITZ MV, OLSON P. Semen collection, evaluation and preservation. In: Ray Kersey, editor. *Canine and Feline Theriogenology*. W.B. Saunders Company, 2001:287-306.
37. FRESHMAN JL. Semen collection and evaluation. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002; 3:104-107.
38. SAS Institute. *SAS User's guide: Statistics*. Cary NC: SAS Institute, 1985
39. MÁRQUEZ MJ. *Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas*. México DF: McGraw-Hill, 1995
40. HESS RA, BUNICK D, BAHR, J. Oestrogens, its receptors and function in the male reproductive tract- a review. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178:29-38.
41. MURKIES AL, WILCOX G, DAVIS SR. Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:297-303.
42. NIE R, ZHOU Q, JASSMIN E, SAUNDERS PT, HESS RA. Differential expression of estrogen receptors α and β in the reproductive tracts of adults male dogs and cats. *Biol Reprod* 2002; 66:1161-1168.
43. O'DONNELL L, ROBERTSON KM, JONES ME, SIMPSON ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endoc Rev* 2001; 22:289-318.
44. JACOB DA, TEMPLE JL, PATISAUL HB, YOUNG LJ, RISSMAN EF. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor β . *Exp Biol Med* 2001; 226:301-306.