



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad de Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Medicina Veterinaria

Efecto de la aplicación de corticosteroides sobre la calidad seminal en cobayos (*Cavia porcellus*)

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del título de Médico Veterinario.

AUTOR:

Juan Pablo Castillo Gálvez.

DIRECTORA:

Dra. Elena Carolina Serrano Recalde, PhD.

Loja – Ecuador

2023

Certificación

Loja, 11 de agosto de 2022

Dra. Elena Carolina Serrano Recalde PhD.

DIRECTORA DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo proceso de la elaboración del trabajo de integración curricular denominado: **Efecto de la aplicación de corticosteroides sobre la calidad seminal en cobayos (*Cavia porcellus*)**, previo a la obtención del título de **Médico Veterinario**, de autoría del estudiante **Juan Pablo Castillo Gálvez**, con cédula de identidad Nro. **1105200529**, vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



Dra. Elena Carolina Serrano Recalde PhD

DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Juan Pablo Castillo Gálvez**, declaro ser autor del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido de la misma. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi trabajo de integración curricular en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma:



Cédula de Identidad: 1105200529

Fecha: 14 de marzo del 2023

Correo electrónico: juan.p.castillo@unl.edu.ec

Teléfono o Celular: 0979975844

Carta de autorización del trabajo de integración curricular por parte del autor para la consulta de producción parcial o total, y publicación electrónica de texto completo.

Yo Juan Pablo Castillo Gálvez declaro ser autor del trabajo de integración curricular titulado “Efecto de la aplicación de corticosteroides sobre la calidad seminal en cobayos (*Cavia porcellus*)”, como requisito para optar el título de Médico Veterinario autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del trabajo de integración curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los catorce días del mes de marzo del dos mil veintitrés.

Firma:



Autor: Juan Pablo Castillo Gálvez

Cédula: 1105200529

Dirección: Loja, Ecuador

Correo electrónico: juan.p.castillo@unl.edu.ec

Teléfono: 0979975844

DATOS COPLEMENTARIOS

Directora del trabajo de integración curricular: Dra. Elena Carolina Serrano Recalde PhD.

Dedicatoria

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes que me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. Así mismo, un agradecimiento especial a mi madre Charito, pues sin ella no lo había logrado. Tu bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien. Por eso te doy mi trabajo en ofrenda por tu paciencia y amor madre mía, te amo.

A mis hermanos Luis Alfredo, Andrea Elizabeth y Luis Eduardo, que en el día a día con su presencia, respaldo y cariño me impulsan a salir adelante, además de saber que mis logros también son los suyos. Les agradezco no solo por estar presentes aportando buenas cosas en mi vida, sino por los grandes lotes de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado.

A mi novia Ana María que con su llegada me brindó su cariño, tolerancia, respeto y apoyo incondicional. Gracias a ella por tornar de felicidad mi vida.

A mis amigos y colegas, por los buenos momentos que hemos compartidos tanto profesional como personalmente, este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes.

Juan Pablo Castillo Gálvez

Agradecimientos

Un agradecimiento muy especial a mi tutora Dra. Elena Carolina Serrano Recalde quien, con sus acertados consejos, permitió desarrollar, progresar y llevar de mejor manera el presente trabajo de investigación.

Mi agradecimiento inmenso a la Universidad Nacional de Loja, a toda la planta docente que sus palabras fueron sabias, sus conocimientos rigurosos y precisos, a ustedes mis profesores, les debo mis conocimientos. Donde quiera que vaya, los llevaré conmigo en mí transitar profesional. Gracias por su paciencia, por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable, por su dedicación perseverancia y tolerancia.

Juan Pablo Castillo Gálvez

Índice de Contenido

Portada...	i
Certificación	ii
Autoría.....	iii
Carta de Autorización.....	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos.....	vi
Índice de Contenido	vii
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
Índice de Anexos.....	xi
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
2.1. Abstract	3
3. Introducción	4
4. Marco Teórico	6
4.1. Anatomía Reproductiva del Cobayo	6
4.2. Espermatogénesis.....	8
4.3. Espermiogénesis	9
4.4. Espermiación	10
4.5. Corticosteroides.....	10
4.6. Clasificación de los Corticosteroides.....	11
4.7. Mecanismo de Acción de los Corticosteroides	12
4.8. Farmacocinética del Corticosteroide	12

4.9. Contraindicaciones del Corticosteroide.....	13
4.10. Efecto del Estrés en Machos	13
4.11. Degeneración Testicular	13
4.12. Alteraciones Morfológicas del Espermatozoide.....	14
5. Metodología	16
5.1. Área de Estudio	16
5.2. Procedimiento	16
5.2.1. Descripción de Unidades Experimentales.....	16
5.2.2. Diseño experimental	17
5.2.3. Toma de la Muestra Post-mortem.....	18
5.2.4. Evaluaciones Microscópicas	18
5.3. Variables de Estudio.....	20
5.4. Procesamiento de Datos.....	20
5.5. Consideraciones éticas	20
6. Resultados	21
7. Discusión.....	25
8. Conclusiones	27
9. Recomendaciones	28
10. Bibliografía	29
11. Anexos.....	32

Índice de Tablas

Tabla 1. Perfil farmacológico de los principales corticosteroides	11
Tabla 2. Medias \pm error estándar de motilidad total (MT), vigor (V) y concentración (CE) de muestras espermáticas recolectadas a través de lavado retrógrado de la cola del epidídimo en cobayos sometidos a diferentes tratamientos (TTO) de corticosteroides.....	21
Tabla 3. Medias \pm error estándar de viabilidad (VB) y morfología (M) de muestras espermáticas recolectadas a través de lavado retrógrado de la cola del epidídimo en cobayos sometidos a diferentes tratamientos (TTO) de corticosteroides	22
Tabla 4. Medias de los resultados histomorfométricos del área, perímetro, luz, epitelio, diámetro y altura epitelial de túbulos seminíferos (TS) en testículos de cobayos sometidos a diferentes tratamientos (TTO) de corticosteroides obtenidas a través del estudio histológico	23

Índice de Figuras

Figura 1. Espermiogénesis	10
Figura 3. Defectos mayores y menores de espermatozoides	15
Figura 2. Ubicación geográfica donde se realizó el trabajo de investigación (Bioterio de la UNL).....	16
Figura 4. Detalle del proceso de los tratamientos enfocados al trabajo de investigación	17

Índice de Anexos

Anexo 1. Adaptación de cobayos al nuevo sistema de alimentación y de alojamiento.....	32
Anexo 2. Aplicación de los tratamientos (T 0/Testigo: Solución Fisiológico, T1: Flumetasona y T2: Dexametasona) y registro de las dosificaciones.....	32
Anexo 3. Toma de muestras seminales de la cola del epidídimo a través de lavado retrógrado con el diluyente Botusemen® Gold sobre los tubos Eppendorf	33
Anexo 4. Observación de muestras seminales a través del microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con aumento de 40 X para la obtención de resultados de Motilidad Total y Vigor	33
Anexo 5. Observación de muestras seminales a través del microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con aumento de 40 X de la cámara de recuento celular Neubauer para la obtención de resultados de Concentración espermática. (a) Espermatozoide señalado en el campo	34
Anexo 6. Observación de muestras seminales a través del microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con aumento de 40 X para la obtención de resultados de Viabilidad espermática. (a) Espermatozoides vivos (b) Espermatozoides muertos	34
Anexo 7. Observación de muestras seminales a través del microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con aumento de 100 X para la obtención de resultados de Morfología Espermática enfocado al tratamiento 2 a base de dexametasona. (a) Cola doblada, (b) Alteración cuello, (c) Gota citoplasmática distal, (d) Cabeza subdesarrollada, (e) Medusa, (f) Acrosoma, (g) Cabeza periforme, (h) Cabeza delgada, (i) Cola fuertemente enrollada	35
Anexo 8. Caracterización de las histomorfomedidas de los túbulos seminíferos (TS) de testículos de cobayos sometidos a los tratamientos de la investigación a través de la aplicación de Motic images Plus 2.0. P1_Área: área total del TS, P1_Perímetro: perímetro total del TS, P2_Área: área total de la luz del TS, P2_Perímetro: perímetro	

de la luz del TS, L1: diámetro vertical, L2: diámetro horizontal, L3-L4-L5-L6: altura epitelial	36
Anexo 9. Túbulo seminífero normal	37
Anexo 10. Túbulo seminífero con degeneración testicular, donde se ve incrementada la luz y se observa poca cantidad de espermatozoides.....	37
Anexo 11. Certificación del resumen en inglés	38

1. Título

Efecto de la aplicación de corticosteroides sobre la calidad seminal en cobayos (*Cavia porcellus*).

2. Resumen

Los corticosteroides (GC) son antiinflamatorios e inhibidores a reacciones de hipersensibilidad, su uso prolongado reduce la producción de andrógenos y afecta la calidad espermática. El objetivo de esta investigación fue estudiar los efectos de los corticosteroides sobre la calidad seminal en cobayos. Treinta cuyes machos entre 4 y 6 meses de edad aptos para reproducción fueron separados y aleatorizados en 3 tratamientos (TTO): Suero fisiológico (SF) - 0.25mg/animal/SC; Flumetasona (Flu) - 0.125mg/animal/SC y Dexametasona (Dex) - 0.3mg/animal/SC, se aplicaron 3 dosis con un intervalo de 1 día. A los 50 días se recolectaron muestras espermáticas de la cola del epidídimo para espermiograma y testículos para evaluación histológica. Aunque la motilidad y la concentración espermática no tuvieron efecto del TTO ($p > 0.05$). Por otro lado, el vigor representó una interacción del TTO por la edad ($p = 0,031$) siendo la Dex la que afectó a los cuyes de 4 meses (1,6) al contrario del SF (2) y Flu (1,8). En cuanto a la morfología, la Dex (88,2 %) tuvo la mayor ($p = 0,001$) cantidad de anormalidades espermáticas totales por delante de la Flu (85,8 %) y del SF (84,2%), encontrando mayor cantidad de espermatozoides con defectos de acrosoma. Por lo tanto, hubo mayor recuento de espermatozoides normales en SF (15,8 %) y Flu (14,2 %) diferente a Dex (11,8 %). En cuyes tratados con Dex la histología mostró un incremento ($p < 0.05$) de la luz del túbulo seminífero (TS), por consecuencia, una disminución ($p < 0.05$) del área total del TS, epitelio tubular y del diámetro horizontal del TS, lo que se relaciona con procesos degenerativos y cambios tisulares que comprometen la integridad de testículos de cobayos. Se demostró que dentro de los GC la Flu con mayor potencia antiinflamatoria obtuvo menor cantidad de alteraciones en parámetros seminales, a diferencia de Dex que induce una menor tasa de vigor, disminuye la concentración de espermatozoides vivos, afecta la conformación del tejido tisular de los testículos y principalmente aumenta la cantidad de anormalidades espermáticas, lo que resulta en fallas de la función reproductiva.

Palabras clave: Dexametasona, Flumetasona, Espermatozoides, Degeneración Testicular.

2.1. Abstract

Corticosteroids (CS) are anti-inflammatory and inhibitors of hypersensitivity reactions, but their prolonged use reduces androgen production and affects sperm quality. The objective of this research was to study the effects of corticosteroids on seminal quality in guinea pigs. Thirty male guinea pigs between 4 and 6 months of age suitable for reproduction were separated and randomized into 3 treatments (TTO): Physiological serum (SF) - 0.25mg/animal/SC; Flumethasone (Flu) - 0.125mg/animal/SC and Dexamethasone (Dex) - 0.3mg/animal/SC, 3 doses were applied at an interval of 1 day. After 50 days, sperm samples were collected from the tail of the epididymis for spermography and testicles for histological evaluation. Although motility and sperm concentration had no effect of TTO ($p>0.05$). On the other hand, the vigor represented an interaction of the TTO by age ($p=0.031$) being the Dex the one that affected the 4-month-old guinea pigs (1.6) contrary to the SF (2) and Flu (1.8). Regarding morphology, Dex (88.2%) had the highest ($p=0.001$) number of total sperm abnormalities ahead of Flu (85.8%) and SF (84.2%), finding greater number of spermatozoa with acrosome defects. Therefore, there was a higher normal sperm count in SF (15.8%) and Flu (14.2%) different from Dex (11.8%). In guinea pigs treated with Dex, histology showed an increase ($p<0.05$) in the lumen of the seminiferous tubule (TS), consequently, a decrease ($p<0.05$) in the total area of the TS, tubular epithelium and the horizontal diameter of the TS, which is related to degenerative processes and tissue changes that compromise the integrity of guinea pig testicles. It was demonstrated that within the CS, the Flu with the greatest anti-inflammatory potency obtained fewer alterations in seminal parameters, different from Dex, which induces a lower rate of vigor, decreases the concentration of live spermatozoa, affects the conformation of the tissue of the testicles. and mainly increases the number of sperm abnormalities, resulting in reproductive function failures.

Key words: Dexamethasone, Flumethasone, Spermatozoa, Testicular Degeneration.

3. Introducción

El análisis del efecto de la aplicación de corticosteroides en cobayos constituye una investigación pertinente en la temática de los estudios de producción de cuyes. Pues, en las zonas minifundistas del Ecuador, la explotación, consumo, crianza y venta de cuyes al mercado es una excelente alternativa para la producción de proteína animal de notable valor biológico debido a que su producción es relativamente económica comparada a las demás pecuarias de este país (Lozano H., 2009).

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) (2021), mediante la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC), determina que en el periodo 2021, el número de Unidad Productivas Agropecuarias (UPA's) a nivel nacional es de 337,423 UPA's de cuyes. Lo cual quiere decir que a nivel nacional existe una producción de 5,067,049 cuyes. Sin embargo, dado su nivel de producción en el Ecuador, los productores utilizan el medicamento corticosteroide como una opción favorable para tratar diferentes enfermedades relacionadas a procesos inflamatorios (Naranjo D., 2014).

Ante este contexto, esta tesis propone estudiar los efectos de los corticosteroides sobre la calidad seminal de cuyes con la intención de aportar conocimiento ante el vacío de información sobre este tema, esta investigación brindará información a profesionales y productores que se dediquen a la crianza y producción de cuyes; puesto que sus resultados permitirán encontrar alternativas de solución acorde con las necesidades de su fin productivo y ajustarlas a su objetivo.

Según Lozano H. (2009) los factores que pueden afectar la calidad seminal son tanto infecciosos (virales), no infecciosos (factores medioambientales, edad, raza, nutrición y estrés), criopreservación y medicamentos; por este último, el uso de corticosteroides tiene un efecto negativo, porque desde el punto de vista hormonal, el cortisol es la hormona más importante en las respuestas ante situaciones de estrés. Entonces, para estudiar el posible efecto de la aplicación de los corticosteroides sobre la calidad seminal de cobayos que causa degeneración testicular en machos disminuyendo en los índices de fertilidad, es de gran orientación saber la afección para entender qué ocurre y que consecuencias se tendrá en los estatus reproductivos de la producción (Castaño F. et al, 2013). Por tal motivo se han planteado los siguientes objetivos:

- Evaluar la motilidad individual, vigor, concentración y morfología espermática de cuyes (*Cavia porcellus*) reproductores sometidos a la aplicación de diferentes corticosteroides.
- Estimar la degeneración testicular de cuyes (*Cavia porcellus*) sometidos a la aplicación de diferentes corticosteroides por medio de estudios histopatológicos.

4. Marco Teórico

4.1. Anatomía Reproductiva del Cobayo

Dentro de las estructuras anatómicas del sistema reproductor masculino del cobayo existen: testículos, conductos genitales (conductos deferentes, epidídimo, pene, uretra masculina) y glándulas accesorias (próstata, glándulas bulbo-uretrales, vesículas seminales).

4.4.1. Testículos

Los testículos se encuentran en la cavidad abdominal a ambos lados de la vejiga, presentan una forma ovoide; cuando el macho presenta libido se descienden a la región inguinal hacia el escroto donde se encuentra una porción del músculo cremáster que es aquel que permite que los testículos se alejen del abdomen. El tamaño de los testículos varía entre una longitud de 20-30 mm y una sección transversal de 12-18 mm (Stan F., 2015).

4.4.2. Conductos Genitales

Son aquellos que transportan los espermatozoides hasta el órgano copulador, estos conductos son: epidídimo, conductos deferentes, uretra y pene (Pinduisaca K., 2018).

4.4.2.1. Epidídimo. Según Vilca, C. (2007) el epidídimo es un conducto sinusoidal, situado a derecha e izquierda en el interior de la cavidad abdominal, cubierto de tejido graso, retenido por la túnica vaginal del testículo, unido al margen de inserción del testículo y al músculo cremáster externo de la cola. El epidídimo tiene una consistencia blanda de color cremoso y consta de las siguientes partes:

4.4.2.1.1 Cabeza. situada en el extremo anterior del testículo, muy pequeña y en forma de U invertida, es relativamente ancha.

4.4.2.1.2. Cuerpo. surge del epidídimo y se inserta en el borde de inserción del testículo.

4.4.2.1.3. Cola. cónica, ápice curvado hacia el borde de inserción, continua con el conducto deferente, con nódulos (circo evoluciones).

4.4.2.2. Conductos Deferentes. Los conductos deferentes continúan el canal del epidídimo como un tubo sumamente enrollado paralelo al cuerpo del epidídimo que

desemboca en la uretra, en un gran arco situado caudalmente con respecto al esfínter vesicular (Lavara et al., 2001).

4.4.2.3. Uretra. Es un tubo largo que va desde la vejiga hasta el glande. La abertura entre la uretra y la vejiga se denomina orificio uretral interno, siendo el último orificio uretral externo (Trujillo, 1994).

4.4.2.4. Pene. Este es el órgano sexual masculino y tiene una doble función: expulsar la orina y enviar espermatozoides eyaculados al interior del aparato reproductor femenino. Anatómicamente, se divide en tres partes: el glande o extremo libre del pene, el cuerpo medial y la base, situada en el arco pélvico. (Almeda et al., 2001).

4.4.3. Glándulas Accesorias

En los mamíferos las glándulas accesorias del aparato reproductor, la próstata y glándulas vesiculares, están bajo estímulos androgénicos y factores ambientales que son los responsables de regular la actividad. Las glándulas accesorias en el cobayo están compuestas por dos glándulas bulbouretrales, una próstata, una glándula coaguladora y dos vesículas seminales (Vásquez & Del Sol, 2010).

4.4.3.1. Glándulas Bulbo Uretrales. Estas glándulas son dos pequeñas, ovaladas y lobuladas, de color marrón amarillento, están ubicadas a ambos lados de la uretra, en el arco isquémico de la uretra, la abertura con el recto y el lado dorsal de la uretra, ventral al recto y dorsal a la sínfisis púbica. Cada una de las dos glándulas tiene un conducto único, que sale de la uretra en la transición de la fosa ilíaca al cuerpo esponjoso, el cual se encarga de secretar una mucosidad espesa cuya función principal es lubricar la uretra durante la eyaculación (Bitzinger, 2008 & Stan F., 2015).

4.4.3.2. Próstata. Se ubicada dorsal a la uretra, conformada por una masa de tejido glandular cubierta por una delgada cápsula de tejido fibroso y células musculares lisas. Mide aproximadamente 20,25 mm de largo y 15,10 mm de ancho, su principal función junto a las demás glándulas es de aumentar el volumen del eyaculado (Vásquez, B. & Del Sol, M., 2010).

4.4.3.3. Glándulas Coaguladoras. Son dos glándulas con una forma piramidal lobulada de color marrón rosado; existe un contacto con las vesículas seminales, existe contacto con las vesículas seminales, el lóbulo dorsal contacta con la próstata y la cola con la uretra. Cada lóbulo tiene cuatro conductos excretorios que desembocan en la

uretra. Su función principal es secretar los ingredientes que forman el tapón de moco vaginal después del coito. (Bitzinger, 2008).

4.4.3.4. Vesículas Seminales. Las vesículas vesiculares tienen dos estructuras tubulares de unos 102,60 mm de largo y de 2,19 a 5,57 mm de diámetro. Se encuentran en la superficie dorsal de la uretra, la abertura de los conductos deferentes y en la superficie dorsal de la vejiga. Estos conductos se abren medialmente a los conductos de la próstata y las glándulas de coagulación, y ligeramente posterior a los conductos deferentes intra-uretrales. Las vesículas seminales fabrican el líquido seminal que ayuda a aumentar el eyaculado (Vásquez & Del Sol., 2010).

4.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso que se lleva a cabo en los testículos (gónadas), que son las glándulas sexuales masculinas, constituye un complejo proceso de divisiones celulares y transformaciones, que comienza con elementos celulares primordiales conocidos como espermatogonias, dando como resultado unas células denominadas espermatozoides (Gómez P., 2020). El periodo de la pubertad de los machos, se caracteriza por la producción hipotalámica del factor liberador de gonadotropina (GnRH) y la secreción hipofisiaria de FSH (hormona estimulante de células de Sertoli) y LH (hormona estimulante de las células de Leydig), así como los esteroides sexuales producidos en las células de Leydig ya que tienen receptores para LH, los cuales sintetizan y secretan testosterona. El proceso de espermatogénesis posee fases las cuales son:

- a) **Fase proliferativa:** a partir de las células madre germinales, se generan células llamadas espermatogonias tipo A. Estas células se reproducen por mitosis y producen tanto espermatogonias tipo A como tipo B. Mientras que las espermatogonias tipo A continúan replicándose y generando ambos tipos de células, el tipo B se dividen en dos espermatocitos primarios que a su vez se dividen en cuatro espermatozoides maduros.
- b) **Fase meiótica:** durante esta etapa, se desarrollan procesos de divisiones celulares que dan lugar a la formación de células haploides conocidas como espermátidas, mediante un proceso de meiosis. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas.
 - **Meiosis I:** cada espermatocito primario (diploide) se divide en dos espermatocitos secundarios (haploides).

- **Meiosis II:** los espermatocitos secundarios se dividen en dos espermatidas haploides, produciendo un total de cuatro células a partir de la célula original. Durante este proceso, las espermatidas comienzan a adquirir la forma del espermatozoide maduro y desarrollan un flagelo.
- c) **Espermiogénesis:** durante este proceso, el flagelo crece hasta su tamaño óptimo, la célula adopta una forma puntiaguda característica, el citoplasma se reduce y el núcleo celular se alarga y se desarrolla el acrosoma. Una vez que los espermatozoides han alcanzado la madurez, son liberados en el centro del túbulo seminífero y están listos para ser eyaculados.

La duración de la espermatogénesis varía entre las especies animales, el que tiene un promedio de 50 días, varía entre individuos y factores externos. Los espermatozoides, formados en los túbulos seminíferos, maduran y adquieren la capacidad para fecundar en su recorrido por el testículo y el epidídimo (Tapia & Tello, 2016).

4.3. Espermiogénesis.

Durante la fase de espermiogénesis, la célula sufre un proceso de transformación de espermatidas hasta obtener espermatozoides completos, reduciendo su citoplasma. La espermiogénesis consta de fases como:

4.3.1. Fase de Golgi

En esta fase se destaca los cambios en la formación de la espermatida que tienen que ver con la incorporación del acrosoma que es una organela subcelular. Además, los centriolos migran del citoplasma a la base del núcleo. El centriolo proximal formará la base que permitirá la unión de la cabeza con la cola, mientras que el centriolo distal permite el desarrollo del axonema, que será la porción central del flagelo o lo que va a ser la cola del espermatozoide (Lunstra D., et al., 1982)

4.3.2. Fase de Encasquetamiento

Durante esta fase, la vesícula acrosómica aumenta de proporción y su membrana rodea parcialmente al núcleo; el aparato de Golgi se aleja del núcleo hacia la parte caudal de la espermatida. Los componentes del axonema en desarrollo de la cola se alargan de la periferia del citoplasma celular, proyectándose de la espermatida hacia el lumen del túbulo seminífero (Senger P., 1999).

4.3.3. Fase Acrosómica

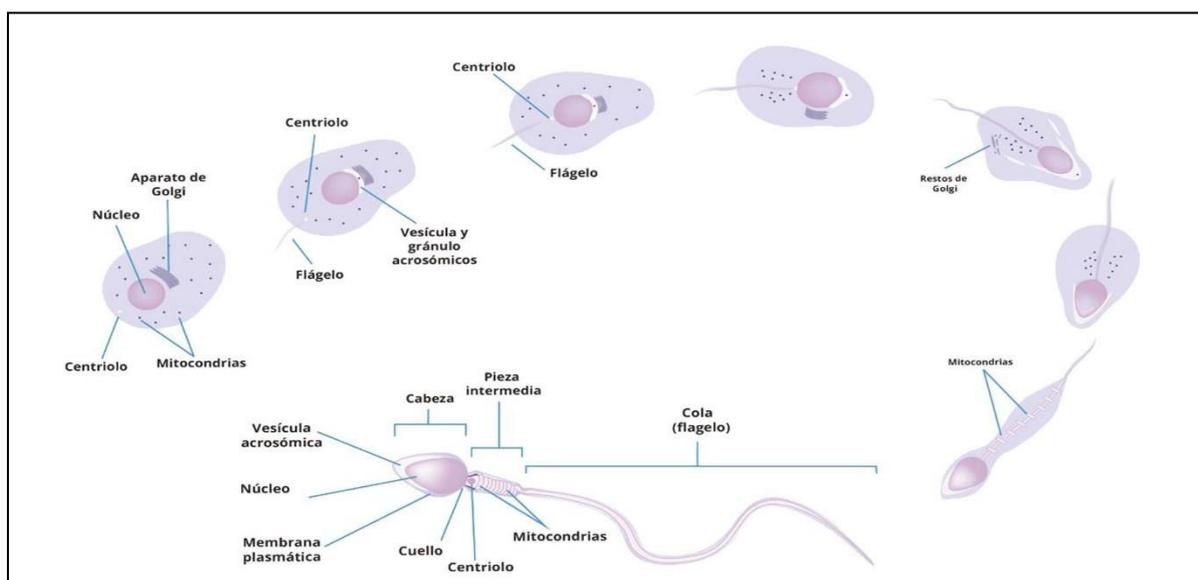
Esta fase se destaca por varias modificaciones en la morfología de la célula. El núcleo se llega a condensar, la célula se alarga y las mitocondrias cambian su ubicación. El núcleo se aplana y adquiere la forma característica. A nivel nuclear se condensa la cromatina. Esta serie de modificaciones son moldeadas por las células de Sertoli, donde las espermátidas se encuentran en este momento profundamente incrustadas (Senger P., 1999).

4.3.4. Fase de Maduración

Se caracteriza por la pérdida de citoplasma por parte de la espermátida. Conforme se libera el exceso de citoplasma, se forman los espermatozoides individuales que pasan hacia la luz del túbulo seminífero, que serán liberados desde las células de Sertoli; mientras que también fagocitan los residuos citoplasmáticos (Senger P., 1999).

Figura 1.

Espermiogénesis.



Nota. Adaptado de Espermiogénesis, por Portal Académico CCH, 2018, <https://n9.cl/wttap>

4.4. Espermiación

La espermiación da paso a la liberación de las espermátidas por cuenta de las células de Sertoli dentro del lumen del túbulo seminífero. Las espermátidas alargadas se orientan perpendicularmente a la pared tubular sobresaliendo gradualmente hacia la luz del túbulo seminífero. Se considera que una vez separada la espermátida del cuerpo residual, esa célula ya es un espermatozoide (Hafez E., 1993).

4.5. Corticosteroides

Los corticosteroides o glucocorticoides incluyen, por una parte, una serie de hormonas esteroideas producidas de forma natural que es el cortisol (hidrocortisona natural) originado en la corteza de las glándulas suprarrenales y, por otra, los derivados sintéticos (prednisona, dexametasona, betametasona, flumetasona, etc.) que se consiguen modificando su estructura química básica. La importancia de los corticoides, desde el punto de vista farmacológico, deriva tanto de los potentes efectos antiinflamatorios e inhibidores ante reacciones de hipersensibilidad (Sumano, H. S., & Ocampos, L., 2006).

Tabla 1. Perfil farmacológico de los principales corticosteroides (considerando la hidrocortisona como estándar)

Corticosteroide	Potencia antiinflamatoria (P.A)	Retención de sodio (R.S)	Duración de acción (D)	Equivalencia en mg
<i>Hidrocortisona (cortisol)</i>	1	1	B	20
<i>Cortisona</i>	0.8	0.8	B	25
<i>Corticosterona</i>	0.3	15	B	--
<i>Prednisona</i>	4	0.8	I	5
<i>Prednisolona</i>	4	0.8	I	5
<i>Parametasona</i>	10	0	P	2
<i>Dexametasona</i>	30	0	P	0.5
<i>Betametasona</i>	25-40	0	P	0.6
<i>Flumetasona</i>	40	0	P	--
<i>Aldosterona</i>	0	300	--	--
<i>Fludrocortisona</i>	15	250	B	2

Leyenda. Duración de la acción expresada como semivida: B: 8-12h; I: 12-36h; P: 36-72h.

Nota. (Botana, L. 2000, p. 398).|

4.6. Clasificación de los Corticosteroides

Según Sumano, H. S., & Ocampos, L., (2006) vienen de la clasificación de los DAIE (antiinflamatorios esteroides) tienen su origen en la corteza suprarrenal y se subdividen en dos grupos generales, los mineralocorticoides y los glucocorticoides.

4.6.1. Mineralocorticoides

No tienen actividad farmacológica definida como antiinflamatoria más bien sus acciones se orientan a mantener el equilibrio de líquidos y electrolitos en el organismo, por ejemplo, la aldosterona.

4.6.2. Glucocorticoides

Son en cambio agentes antiinflamatorios potentes, entre estos tenemos la hormona Cortisol (hidrocortisona natural) y la Cortisona (Sumano, H. S., & Ocampos, L. 2006).

4.7. Mecanismo de Acción de los Corticosteroides

Los mecanismos de acción a nivel celular conducen a una amplia gama de efectos sobre la respuesta del sistema inmunitario, inhibiendo y estimulando la actividad de los mediadores antiinflamatorios (Sumano, H. & Ocampo, L. 1997). El mecanismo de acción de los esteroides tiene la siguiente secuencia:

- a) Movimiento del esteroide a través de la membrana y unión a receptores.
- b) Durante la unión se libera una proteína conocida como "proteína de choque térmico".
- c) El complejo esteroide-receptor se transporta al núcleo, en donde se une a los elementos de respuesta a los glucocorticoides en diferentes genes, alterando su expresión. El esteroide facilita que el receptor se una al DNA. La mayoría de las acciones se regulan en el núcleo.

En resumen, los corticosteroides interactúan con proteínas receptoras específicas en los tejidos diana para regular la expresión de los genes que responden a los corticosteroides, alterando así el número y la disposición de las proteínas sintetizadas por diferentes tejidos diana (Botana, L., 2000).

4.8. Farmacocinética del Corticosteroide

El proceso en la que el corticosteroide es sometido a través de su paso por el organismo, se desarrolla en administración, metabolismo y excreción.

- a) **Administración:** las DAIE pueden ser administradas por vía oral, parenteral y tópica. El tratamiento por vía parenteral proporciona niveles sanguíneos más previsibles y una acción más rápida para tratamiento a corto y mediano plazo.

- b) **Metabolismo:** luego de la absorción, bajo circunstancias normales, 90% o más del cortisol en plasma se une de manera reversible a proteínas. Únicamente la fracción de corticosteroide no unida puede entrar en las células para mediar efectos del corticosteroide.
- c) **Excreción:** a nivel de hígado son conjugados y luego son eliminados por la orina (Sumano, H. S., & Ocampos, L., 2006).

4.9. Efecto del Estrés en Machos

Las hormonas relacionadas con el estrés (cortisol) pueden influir en la función sexual en tres niveles del eje HHG: en el hipotálamo, a través de la CRH, donde se inhibe la secreción de GnRH; en la glándula pituitaria, al disminuir la liberación de LH y FSH en respuesta a la supresión de GnRH, y en las gónadas, al alterar los efectos estimulantes de las gonadotropinas. En endocrinología, el principal mecanismo por el cual el cortisol puede inducir una calidad seminal insuficiente se basa en la hormona CRH, que estimula el flujo de cortisol con acciones de tipo inhibitorio tanto a nivel testicular como a niveles intermedios con inhibición de ICSH (hormona estimulante de células intersticiales), así mismo, también desencadena una retroalimentación negativa actuando en los receptores de membrana como un potente regulador negativo para la ICSH, dando lugar a un bloqueo como respuesta al estrés. De esta manera, se impide la producción de andrógenos por dichas células, recordando el papel fundamental que la testosterona ejerce a nivel de la espermatogénesis (Pereira CC., 2005).

4.10. Degeneración Testicular

En los machos el estrés altera la calidad, la motilidad y el desarrollo espermático, conllevando a fenómenos de subfertilidad. Ese efecto negativo es resultante de la degeneración testicular, una patología ocasionada por procesos como la elevación de la temperatura testicular, por una excesiva administración de corticosteroides exógenos (hiperadrenocortisismo iatrogénico). Clínicamente, la degeneración testicular lleva inicialmente a la flacidez y discreta disminución del tamaño de los testículos, siendo que en etapas más avanzadas estos pueden tornarse atrofiados, con tamaño reducido, fibróticos y con consistencia firme a la palpación (Nascimento E et al., 2003). Histológicamente, se nota en los túbulos seminíferos disminución de la espermatogénesis debido a la muerte de las células del linaje germinativo. Las espermatogonias presentan citoplasmas vacuolizados y núcleo picnótico (condensación irreversible de la cromatina), las espermátidas se

degeneran y aparecen de células gigantes multinucleadas resultantes de la fusión de varias espermátidas (Santos R., et al, 1989).

4.11. Alteraciones Morfológicas del Espermatozoide

Las patologías espermáticas también pueden ser caracterizadas según su origen en primarias, cuando se produce durante la espermatogénesis; secundarias producidas después que los espermatozoides abandonan el testículo y terciarias provocados por el método de obtención de evaluación o de conservación del semen. (Torretta, y otros, 2010). La mayoría de los defectos de la cola del espermatozoide también son consideradas anomalías primarias, entre ellas están los defectos de la pieza intermedia, presencia de gota citoplasmática proximal, cola enrollada y colas accesorias (Barrios, 2002).

4.11.1. Cabeza

a. Alteraciones numéricas:

- **Espermatozoides sin cabeza, anucleados, en cabeza de alfiler o decapitados:** se trata de espermatozoides acéfalos por tanto si material genético.
- **Espermatozoides bicéfalos:** espermatozoides con dos cabezas y un solo flagelo, normalmente la pieza intermedia aparece engrosada.

b. Alteraciones en la forma:

- **Espermatozoides con cabezas alargadas o tapering:** en este caso la cabeza de los espermatozoides posee la forma de una elipse en la que existe un marcado predominio del eje longitudinal (5 a 6 μm) sobre el eje transversal (2 a 3 μm).
- **Espermatozoides con cabezas redondas:** a diferencia del caso anterior, aquí ambos ejes.

4.11.2. Pieza de Conexión

a. Alteraciones en la forma:

- **Espermatozoides con implantación axial anómala del flagelo:** en estos casos observamos una estrangulación a nivel de la pieza intermedia, que se une a la fosa de implantación formando un ángulo de 45-90° con respecto al eje longitudinal de la cabeza. (Gómez, 2005).

4.11.3. Flagelo o Cola

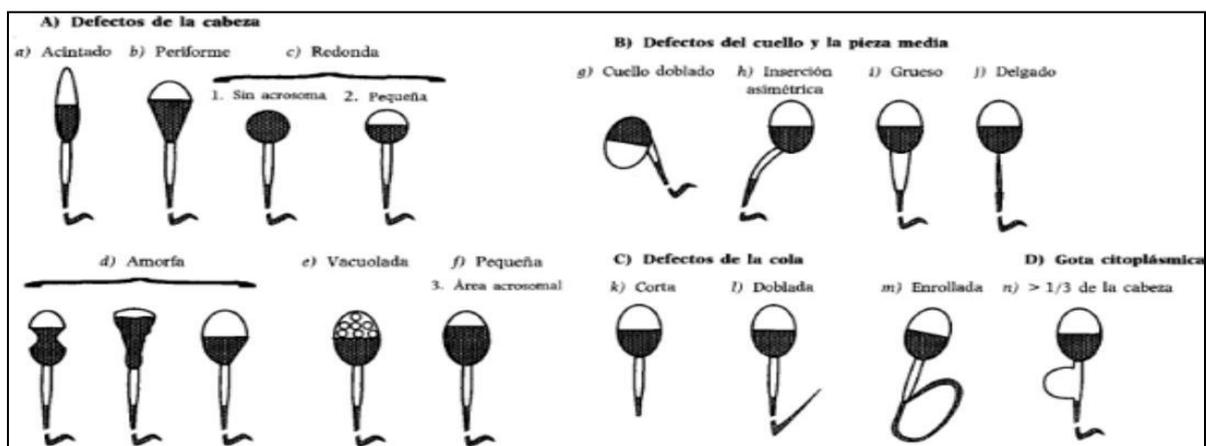
a. Alteraciones numéricas:

- **Espermatozoides sin flagelo:** se observan solamente cabezas de espermatozoides aisladas con ausencia total de cola.

- **Espermatozoides con flagelos múltiples:** podemos encontrar espermatozoides con dos o más flagelos. (Gómez, 2005)
- b. Alteraciones en la forma, a nivel de la pieza intermedias:**
- **Espermatozoides con pieza intermedia marcadamente engrosada:** en ocasiones se observan espermatozoides cuya pieza intermedia puede incluso superar el tamaño cefálico.
 - **Espermatozoides con persistencia de gota citoplasmática:** este es un tipo de anomalía difícil de diagnosticar debido a que se pueden confundir con piezas intermedias engrosadas.
- c. Alteraciones de la forma a nivel del resto del flagelo:**
- **Espermatozoides con enrollamiento total de la cola con o sin restos citoplasmáticos englobándola:** cuando se observan “in vitro” presentan problemas de motilidad
 - **Espermatozoides con enrollamiento parcial de la cola:** en estos casos observamos que el enrollamiento de la cola afecta solamente al extremo final de la misma.
 - **Espermatozoides con flagelos truncados:** los flagelos tienen en la parte principal angulaciones de diferentes grados. (Gómez, 2005).

Figura 2

Defectos mayores y menores de espermatozoides.



Nota. Aybar, M. (2021). <https://n9.cl/efdjb>

5. Metodología

5.1. Área de Estudio

El presente trabajo de investigación experimental se realizó en la Universidad Nacional de Loja que se encuentra ubicada en la provincia de Loja; esta se encuentra en la región natural Interandina, con respecto a la temperatura, está se desarrolla por temporadas, es decir, la temporada templada dura 5,3 meses, del 22 de noviembre al 1 de mayo, y la temperatura máxima promedio diaria es más de 20 °C, con precipitaciones anuales de 1453 mm/año, humedad relativa de 74% y una altura de 2 060 msnm (WeatherSpark. 2022).

Figura 3

Ubicación geográfica donde se realizó el trabajo de investigación (Bioterio de la UNL).



Nota. Coordenadas: -4.035943829528372, -79.20331606043393 (Google Maps).

La presente investigación tuvo una duración de 4 meses (abril – agosto 2022) en el cual se utilizó cuyes machos en etapa reproductiva, para valorar la calidad espermática, post aplicación de corticosteroides.

5.2. Procedimiento

5.2.1. Descripción de Unidades Experimentales

Las unidades experimentales fueron adquiridas del cantón Saraguro de la Provincia de Loja, estos fueron 3 grupos de 10 cuyes machos en edades comprendidas de 4 y 6 meses con peso aproximado de 1 kg – 1.8 kg, en estos animales se evaluó muestras seminales a partir de la cola del epidídimo. Cabe recalcar, que son animales que se adaptaron a las

mismas condiciones de alojamiento (jaulas de 30 cm de ancho por 2 m de largo) y similar sistema de nutrición elaborado en el Centro de Investigación, Desarrollo e Innovación en Nutrición Animal (CIDINA).

5.2.2. *Diseño experimental*

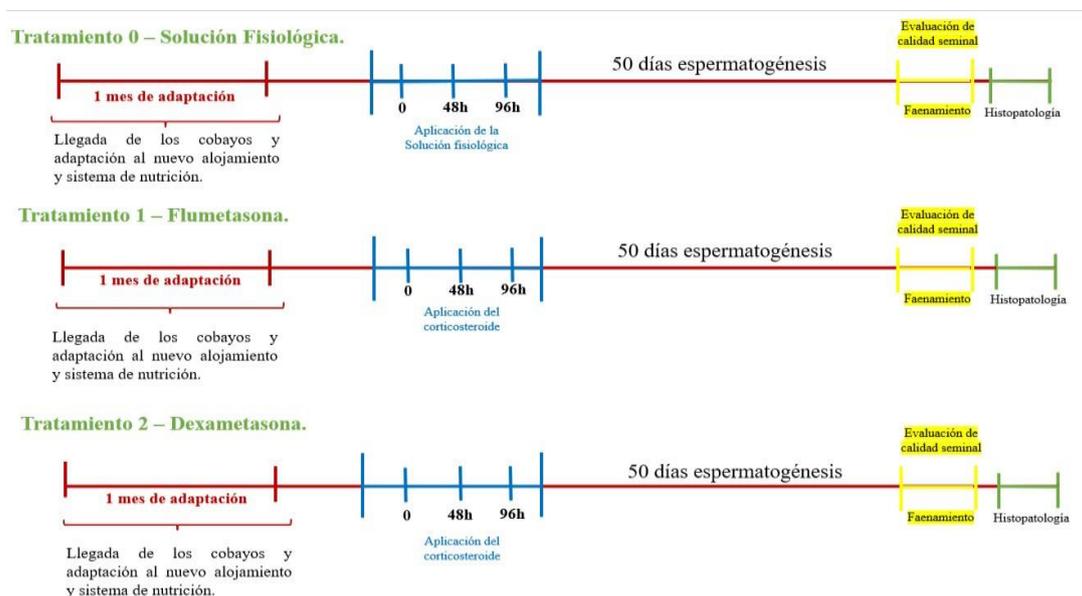
Para el presente trabajo de investigación se evaluó la calidad seminal de 3 grupos de 10 cuyes, aptos para la reproducción y clínicamente sanos. Además, este modelo fue distribuido mediante un diseño completamente aleatorizado (DCA). En base a los corticosteroides aplicados se consideró la siguiente posología en los tres tratamientos:

- **Tratamiento 0 / Testigo** se aplicó solución fisiológica a una dosis 0.125 mg/animal por vía sub cutánea (SC).
- **Tratamiento 1 / Flumetasona:** se aplicó Flumezona ®, James Brown Pharma, a una dosis 0.25 mg/animal por vía sub cutánea (SC).
- **Tratamiento 2 / Dexametasona:** se aplicó Dexametasona ®, L.A OVER, a una dosis 0.3 mg/kg por vía sub cutánea (SC).

Concurrido el tiempo de la espermatogénesis (50 días en cobayos) post aplicación de los tratamientos se procedió a la recolección de muestras donde, se utilizó el protocolo de necropsia enfocado a no perjudicar los testículos y epidídimo, después de la extracción del órgano se recolecto el semen de la cola del epidídimo con ayuda de la técnica de lavado retrógrado y los testículos fueron colocados en tubos con formol bufferado para la obtención de placas histológicas.

Figura 4

Detalle del proceso de los tratamientos enfocados al trabajo de investigación.



5.2.3. *Toma de la Muestra Post-mortem*

Antes de iniciar el procedimiento se debe identificar el animal, el tejido remitido (testículos – epidídimo) y condiciones de envío (para histopatología se utilizó frascos y formol bufferado). Para la toma de muestras se realizó los siguientes pasos:

➤ **PASOS:**

1. Se ubica el animal en posición decúbito dorsal; la primera incisión se realiza desde la sínfisis mandibular hasta la sínfisis púbica, abarcando únicamente la piel. Posteriormente se procede a separar la piel y se desarticula la articulación coxofemoral, presionando los miembros pelvianos (Arciniegas, A., & Quiroz, L. 2012)
2. Se realiza un corte desde el proceso xifoides del esternón hasta la sínfisis púbica, evitando la perforación de órganos de la cavidad abdominal; posterior a esto se realiza dos cortes por el borde de la última costilla desde el mismo proceso, luego se retiran órganos abdominales para tener mejor visión del aparato genitourinario, donde se extrae en su totalidad los riñones, uréteres, vejiga, uretra, vesículas seminales, testículos y pene (Arciniegas, A., & Quiroz, L. 2012).
3. Posteriormente, se diseccionó de los testículos los epidídimos, se colocaron en cajas Petri y con ayuda de un corte sobre la cola del epidídimo se procedió a hacer un lavado retrógrado con 750 uL de Botusemen® Gold, después se colocó la muestra espermática en los tubos eppendorf sobre la platina térmica a 37°C para mantenerlo caliente y no exista shock térmico y mueran los espermatozoides.
4. Al mismo, tiempo, se colectó muestras en los tubos eppendorf, para determinar concentración espermática (990 µL de agua destilada + 10 µL de la muestra seminal), morfología espermática en gota húmeda (500 µL de formol salino + 40 µL de la muestra seminal) y viabilidad (se realizó un frotis sobre un portaobjetos con: 5 uL de la muestra seminal + 2 uL de eosina y 2 uL de nigrosina).
5. Por último, se colocaron los testículos en formol bufferado para su posterior análisis de histopatología.

5.2.4. *Evaluaciones Microscópicas*

- **MOTILIDAD TOTAL**

Para evaluar la MT se procedió a tomar una alícuota (10µL) de la muestra seminal y se colocó en una lámina portaobjeto (25,4 x 76,2, 1'' x 3''). mantenida a 37°C mediante

una platina térmica (Minitube) y se cubre con una lámina cubreobjetos (22 x 22mm x 100 un) para ser evaluado. La valoración se realiza de manera subjetiva observando el movimiento total de los espermatozoides con el fin de determinar el porcentaje de células con movimiento rectilíneo progresivo del total de espermatozoides observados del eyaculado. La observación se realizó con un microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con un aumento de 40 X (Crespo, Edward, & Quintero-Moreno, Armando. 2014).

- **VIGOR**

El vigor de los espermatozoides, se evalúa al mismo tiempo que la motilidad total, consiste en la velocidad de movimiento de los espermatozoides y se clasifica en una escala del 0 al 5 (Sin movimiento / Movimiento progresivo).

- **CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA**

La concentración espermática se calculó utilizando una cámara de recuento celular (Neubäuer); para ello se realiza una dilución del semen de 10:990. Para realizar la dilución se toma 10 µL de semen y se diluye en 990 µL de agua destilada. Una vez realizada la dilución se esperan tres minutos para garantizar que los espermatozoides mueran, posteriormente se procede a tomar una alícuota de 10µL del semen diluido y se llena la cámara de Neubäuer para realizar el conteo celular con un microscopio óptico en aumento de 40 X. Para determinar el número de espermatozoides se procede a contar las cabezas de espermatozoides observadas en cinco de los cuadros (de forma diagonal) pertenecientes al cuadro grande central de la cámara y se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{número de sptz por ml} = \text{numero de sptz contados} * \text{dilución} * \text{altura de cámara de Neubäuer} * 5 * 1000$$

- **MORFOLOGÍA**

La evaluación morfológica se realizó con la ayuda de un tubo eppendorf previamente preparado con formol salino (9 g. de cloruro de sodio, 3mL. de formol en 1 L de agua destilada) se utilizó 500 µL de formol salino más 40 µL de la muestra seminal y se procedió a homogenizar. Después, se determinó los resultados a través de un microscopio óptico, donde se colocó un porta objetos con 7 µL de la muestra preparada y se observó con el lente de 100 X más aceite de inmersión. Es necesario determinar la cantidad y el tipo de anomalías, separándolos en defectos mayores y menores.

- **VIABILIDAD**

La evaluación de viabilidad se realizó por medio de un frotis (5 uL de la muestra seminal + 2 uL de eosina y 2 uL de nigrosina) a través de la tinción con eosina-nigrosina y por medio de observación directa, se observó espermatozoides vivos y muertos, contando un total de 200 células espermáticas.

- **HISTOLOGÍA (H).**

La evaluación histopatológica se realizó en función a cortes de ambos testículos y se midieron en el programa Motic Images Plus 2.0.

5.3. Variables de Estudio

Las variables utilizadas en la presente investigación son:

- Motilidad Total.
- Viabilidad.
- Vigor.
- Concentración espermática.
- Morfología espermática en gota húmeda.
- Histología.

5.4. Procesamiento de Datos

Se trabajó en base a un análisis estadístico en el programa SAS Studio, o en base a modelos mixtos con factores fijos (peso como covariable, tratamiento y edad) y aleatorios (animal ligado al tratamiento). Además, se aplicó chi-cuadrado para determinar el contraste entre los tres tratamientos y dentro de éstos las diferencias que pudieran presentarse en los tres grupos estudiados.

5.5. Consideraciones éticas

El presente tema de estudio titulado: Efecto de la aplicación de corticosteroides reflejado en la calidad seminal en cobayos (*Cavia porcellus*), contempla las normas éticas y no tendrá impacto negativo sobre los animales. Dentro de las consideraciones éticas, respecto al manejo de los animales se adecuará los espacios pertinentes para que estos puedan desarrollarse. Además, se llevó a cabo todas las medidas de bioseguridad, al momento de realizar el sacrificio a los animales.

6. Resultados

Los resultados obtenidos en el estudio de los corticosteroides en relación a parámetros seminales en cobayos son los siguientes:

- **Motilidad total (MT), Vigor (V) y Concentración espermática (CE)**

Tabla 2. Medias \pm error estándar de motilidad total (MT), vigor (V) y concentración espermática (CE) de muestras espermáticas recolectadas a través de lavado retrógrado de la cola del epidídimo en cobayos sometidos a diferentes tratamientos (TTO) de corticosteroides

TTO	Suero Fisiológico		Flumetasona		Dexametasona	
	4	6	4	6	4	6
Edad, meses						
Variables						
MT, %	51,4 \pm 4,56	65,2 \pm 5,10	57,3 \pm 4,16	61 \pm 5,89	55,7 \pm 3,85	58 \pm 5,89
V, (1-5)	2 \pm 0,47 ^b	3 \pm 0,53 ^b	1,8 \pm 0,43 ^b	3 \pm 0,61 ^b	1,6 \pm 0,40 ^a	2,3 \pm 0,61 ^b
CE, spz/ml	77 000 000 \pm 19 121 073	126 250 000 \pm 21 378 009	96 785 714 \pm 16 160 256	184 166 667 \pm 24 685 199	76 785 714 \pm 16 160 256	120 000 000 \pm 24 685 199

*a, b= Letras sobrescritas minúsculas muestran diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

En la **Tabla 2** se presenta un resumen estadístico donde se ha evaluado el efecto de la interacción de los tratamientos por la edad de los cobayos, dando lugar a que dentro de la variable de motilidad no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, tiene tendencia de ser menor ($p = 0,118$) debido al tratamiento influenciado por la edad como factor. Por lo cual, comparando la motilidad media del tratamiento testigo que ofreció resultados de 4 meses de $51,4 \pm 4,56\%$ y de 6 meses de $65,2 \pm 5,10\%$ con el tratamiento en base a dexametasona que generó resultados de 4 meses de $55,7 \pm 3,85\%$ y de 6 meses de $58 \pm 5,89\%$; lo que equivale a que los cuyes sometidos a dexametasona de 6 meses de edad presentaron menor porcentaje de capacidad de movimiento. Conforme a ello, en la variable vigor existe un efecto de interacción por la edad ($p = 0,031$) siendo la media del tratamiento de suero fisiológico de 4 meses de $2/5 \pm 0,47$ y de 6 meses de $3/5 \pm 0,53$ con respecto al tratamiento de dexametasona que sus medias representan una menor tasa de vigor influenciado por el corticosteroide siendo de 4 meses de $1,6/5 \pm 0,40$ y de 6 meses de $2,3/5 \pm 0,61$, lo que conlleva a una valoración de movimiento lento de cola con algo de movimiento progresivo. Por otro lado, la variable de concentración espermática no tuvo

diferencia significativa ($p = 0,449$). No obstante, la media del tratamiento testigo tuvo menor cantidad de células espermáticas en relación al tratamiento con dexametasona, para el tratamiento control se encontró resultados de 4 meses de $770\ 00\ 000\ \text{spz/ml} \pm 19\ 121\ 073$ y de 6 meses de $126\ 250\ 000\ \text{spz/ml} \pm 21\ 378\ 009$; en base a los resultados obtenidos con la dexametasona se pudo evidenciar menor tasa de espermatozoides por ml siendo de 4 meses de $76\ 785\ 714\ \text{spz/ml} \pm 16\ 160\ 256$ y de 6 meses de $120\ 000\ 000\ \text{spz/ml} \pm 24\ 685\ 199$.

- **Viabilidad (VB) y Morfología (M).**

Tabla 3. Medias \pm error estándar de viabilidad (VB) y morfología (M) de muestras espermáticas recolectadas a través de lavado retrógrado de la cola del epidídimo en cobayos sometidos a diferentes tratamientos (TTO) de corticosteroides

Variables	TTO		
	Suero Fisiológico	Flumetasona	Dexametasona
Viabilidad (muertos), %	$98,2 \pm 0,175^b$	$97,9 \pm 0,164^b$	$99,0 \pm 0,224^a$
M. Defectos Mayores, %	$58,9 \pm 0,047$	$57,5 \pm 0,047$	$60,3 \pm 0,045$
M. Defectos Menores, %	$25,3 \pm 0,054$	$27,5 \pm 0,050$	$27,9 \pm 0,049$
M. Defectos Totales, %	$84,2 \pm 0,064^b$	$85,8 \pm 0,064^b$	$88,2 \pm 0,069^a$
M. Defectos cabeza, %	$66,1 \pm 0,049$	$65,5 \pm 0,047$	$67,6 \pm 0,047$
M. Defectos cuello, %	$1,3 \pm 0,209$	$1 \pm 0,230$	$1,3 \pm 0,193$
M. Defectos cola, %	$16,8 \pm 0,063$	$18,2 \pm 0,057$	$19,2 \pm 0,056$
M. Normales, %	$15,8 \pm 0,064^b$	$14,2 \pm 0,064^b$	$11,8 \pm 0,069^a$

*a, b= Letras sobrescritas minúsculas muestran diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

En la **Tabla 3** se observa un resumen estadístico, donde se evaluó el tratamiento corticosteroide a las presentes variables donde existió diferencia significativa con respecto a la viabilidad, resultando en un mayor ($p = 0,021$) número de células espermáticas muertas con el tratamiento a base de dexametasona ($99\% \pm 0,224$) en relación al testigo ($98,2 \pm 0,175\%$) y flumetasona ($97,9 \pm 0,164\%$). De igual forma, con respecto a la variable de morfología y sus subtemas se presentó diferencias significativas en defectos totales siendo el tratamiento a base de dexametasona la que presenta el mayor ($p = 0,001$) número de anomalías espermáticas ($88,2 \pm 0,069\%$) por delante del suero fisiológico ($84,2 \pm 0,064\%$) y de la flumetasona ($85,8 \pm 0,064\%$). Asimismo, dentro de la morfología enfocados a espermatozoides normales se encontró diferencia existiendo un incremento ($p = 0,001$) de espermatozoides morfológicamente normales en el suero fisiológico ($15,8 \pm 0,064\%$), contrario a la flumetasona ($14,2 \pm 0,064\%$) y de la dexametasona ($11,8 \pm 0,069\%$). No obstante, los subtemas de morfología restantes no se encontró diferencias relevantes.

- **Histología (H).**

Tabla 4. Medias de los resultados histomorfométricos del área, perímetro, luz, epitelio, diámetro y altura epitelial de túbulos seminíferos (TS) en testículos de cobayos sometidos a diferentes tratamientos (TTO) de corticosteroides obtenidas a través del estudio histológico

TTO	Suero Fisiológico		Flumetasona		Dexametasona		
	Edad, meses	4	6	4	6	4	6
TESTÍCULO IZQUIERDO							
Área total del TS, μm^2		135110 ^{ab}	134694 ^{ab}	139547 ^b	131719 ^c	162522 ^a	139547 ^b
Perímetro total del TS, μm		1307,79	1379,75	1447,19	1439,60	1414,31	1411,82
Área de la luz del TS, μm^2		19233	28520	18591	24989	28878	24140
Perímetro de la luz del TS, μm		636,86	754,79	680,83	723,33	724,53	722,74
Área del epitelio tubular, μm^2		115877 ^a	106175 ^{ac}	113129 ^a	152363 ^b	133644 ^a	115407 ^a
Diámetro vertical, μm		427,98	451,22	414,60	462,75	461,88	452,36
Diámetro horizontal, μm		388,78	385,20	395,49	403,86	399,51	401,76
Altura epitelial 1, μm		132,86	128,33	134,45	138,24	135,71	139,27
Altura epitelial 2, μm		130,17	122,00	129,42	130,78	136,87	133,55
Altura epitelial 3, μm		121,85	105,81	129,13	121,76	119,34	119,05
Altura epitelial 4, μm		121,62	106,65	121,27	122,92	124,33	132,57
TESTÍCULO DERECHO							
Área total del TS, μm^2		97220 ^a	201425 ^a	136802 ^a	529206 ^b	130513 ^a	195918 ^{ac}
Perímetro total del TS, μm		1318,03	1492,54	1415,54	1477,44	1353,94	1451,72
Área de la luz del TS, μm^2		29731	26067	25820	20605	24292	20976
Perímetro de la luz del TS, μm		672,55 ^c	797,85 ^{bc}	801,37 ^b	658,45 ^a	707,97 ^a	646,45 ^a
Área del epitelio tubular, μm^2		67488 ^a	175357 ^a	110982 ^b	508601 ^c	106221 ^a	174942 ^a
Diámetro vertical, μm		438,78	468,42	419,45	454,22	433,48	451,86
Diámetro horizontal, μm		380,19 ^c	426,99 ^{bc}	414,98 ^c	350,61 ^{ac}	378,05 ^c	404,73 ^c
Altura epitelial 1, μm		131,53	127,82	131,18	119,40	135,36	132,15

Altura epitelial 2, μm	120.18	144.25	128.97	130.37	149.26	144.38
Altura epitelial 3, μm	114.23	126.88	129.11	126.61	119.49	124.66
Altura epitelial 4, μm	115.01	128.70	125.70	122.22	113.15	129.92

*a, b, c, d= Letras sobrescritas minúsculas muestran diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

En la **Tabla 4** se observa un resumen estadístico donde se ha evaluado el resultado de las medidas de placas histológicas de testículos de cobayos sometidos al tratamiento de corticosteroides, en cuyos tratados con dexametasona la histología mostró un incremento significativo ($p=0.014$) de la luz del túbulo seminífero, por consecuencia, una disminución ($p=0,045$) ($p=0,031$) del área total del TS de ambos testículos, una menor ($p=0,02$) medida epitelio tubular y del diámetro horizontal del TS ($p=0,058$), lo que se relaciona con alteraciones tisulares que comprometen la integridad de testículos de cobayos en relación a su longitud y principalmente se atribuye a un proceso degenerativo.

7. Discusión

Los corticosteroides son fármacos que se utilizan comúnmente en la producción animal para tratar una variedad de afecciones de índole autoinmunitario, alérgico y trastornos inflamatorios (Cázares, J. et al. 2000). No obstante, su uso a largo plazo puede tener efectos secundarios graves, relacionándolos a la calidad seminal de machos reproductores. Por consiguiente, se atribuye un impacto directo en la fertilidad, la producción de progenie y por ende fallas en los programas reproductivos (Piffer, R.C., et al. 2009).

Los datos evaluados muestran que el uso prolongado a dosis recurrentes de corticosteroides atribuye efectos secundarios graves en el ámbito reproductivo, lo reportado en nuestra investigación arrojó datos significativos con el tratamiento dexametasona en relación a variables como la viabilidad, motilidad y principalmente con morfologías anormales en células espermáticas. Dentro de la literatura no fueron encontrados trabajos comparando la flumetasona como tratamiento corticosteroide en base a calidad espermática. Sin embargo, la flumetasona con potencia antiinflamatoria (P.A) de 40 no tuvo efectos en parámetros seminales, a diferencia de los efectos de la dexametasona (P.A: 30) sobre las características del esperma.

En carneros expuestos a dexametasona (0,25 mg/kg) durante 2 días, hubo una disminución de la motilidad (Control: 82%; Dexametasona: 70%) y concentración espermática (Control: 2.22×10^9 /ml; Dexametasona: 1.49×10^9 /ml) influenciados por aplicación del corticosteroide. No obstante, la morfología espermática no se vio alterada (Seyfettin Gür, et al. 2005). En ratas macho expuestas prenatalmente a 0,1 mg/kg de betametasona (P.A: 25 - 40) en los días 12, 13, 18 y 19 de embarazo resultó en reducciones significativas de la concentración espermática (Control: 77.8×10^6 ; Betametasona: 57.0×10^6), viabilidad (Control: 97%; Betametasona: 96%), motilidad (Control: 67%; Betametasona: 61%) y de espermatozoides morfológicamente normales (Control: 98%; Betametasona: 94%) obtenidos de los conductos deferentes (Piffer, R.C., et al. 2009).

En felinos el uso de 1 mg/kg de prednisolona (P.A: 4) por vía oral durante 50 días deterioró los parámetros seminales con un mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales (Control: 56,7%; Prednisolona: 35.8%) recogidos de la cola del epidídimo; se corrobora los resultados en base a nuestra investigación donde encontramos un incremento de células espermáticas con alteraciones de cabeza y cola. No obstante, muestra que la motilidad

de los espermatozoides fue similar entre los grupos de prednisolona y control (Andrews, C. J., et al. 2022).

Por otro lado, el estrés crónico (P.A: 1) es un fenómeno que puede tener efectos negativos en el organismo y, en el caso de ratas macho, altera parámetros seminales disminuyendo el recuento del número de espermatozoides (Control: 49×10^6 ml; Cortisol: 19×10^6 ml), el porcentaje de morfología anormal aumentó en el grupo de estrés crónico (Control: 19%; Cortisol: 44%), la motilidad se observó alterada en relación al grupo control (Control: 70%; Cortisol: 18%). Sin embargo, los exámenes histológicos no mostraron lesiones visibles en los testículos de los grupos (Salami, S.A., et al. 2020).

El impacto de la dexametasona en células germinales testiculares de ratón sometidos a dosis de 4, 7 y 10 mg/kg de dexametasona durante 7 días, mostró alteraciones histopatológicas como vacuolización epitelial, atrofia y reducción de espermatozoides testiculares originados por la baja cantidad de testosterona. Los datos morfométricos revelaron que la dexametasona redujo significativamente el diámetro tubular y la altura epitelial ($P < 0,05$) (Orazizadeh, M., Khorsandi, L. S., & Hashemitabar, M. 2010). En nuestro estudio no encontramos vacuolización o atrofia epitelial. Sin embargo, hubo mayor medida en el diámetro horizontal en el tratamiento a base de dexametasona dando como resultado túbulos seminíferos ligeramente estrechos, asimismo, encontramos disminución del área tubular y principalmente un incremento de la luz de túbulos seminíferos lo que hace referencia a degeneración testicular.

Por otra parte, ratones sometidos a dosis de 7 mg/kg de dexametasona durante 7 días consecutivos resultó en cambios degenerativos en las células germinales, que iban desde una menor medida en diámetros de los túbulos seminíferos (Control: 210,6 μ m; Dexametasona: 105,6 μ m) y de la altura del epitelio seminífero (Control: 163,4 μ m; Dexametasona: 88,7 μ m) (Layasadat Khorsandi et al. 2013). A su vez, Mohammad Eini, A., et al. (2020) demostró que la prednisolona a dosis de 2,5mg/kg (P.A: 4) si generó cambios en el tejido testicular disminuyendo el diámetro de los túbulos seminíferos (Control: 221,1 μ m; TTO: 157,4 μ m).

En nuestra investigación el factor de edad desencadenó resultados significativos, cobayos más jóvenes se vieron afectados en la calidad seminal, debido a la sensibilidad al cortisol que es dependiente del estado de maduración del animal. El tejido testicular posee receptores para corticosteroides, los cuales pueden disminuir la sensibilidad de las células de Leydig a gonadotropinas causando una disminución de la eficiencia de los receptores de LH y a su vez en la producción y secreción de testosterona (Consten, D., et al. 2002; Bambino, T. H., & Hsueh, A. J. 1981; Schultz, R., et al. 1993; Charpenet, G., et al. 1981; Orr & Mann. 1992).

8. Conclusiones

La investigación ha demostrado que dentro de los corticosteroides, la flumetasona con mayor potencia antiinflamatoria resultó en una menor cantidad de alteraciones en parámetros seminales, a diferencia de la dexametasona que si llegó a afectar la calidad espermática en cobayos, este corticosteroide induce una menor tasa de vigor, disminuye la concentración de espermatozoides vivos, afecta la conformación del tejido tisular de los testículos y principalmente aumenta la cantidad de anomalías espermáticas que en su mayoría fueron de defectos de acrosoma lo que conlleva a una posible disminución de los porcentajes de preñez puesto a que interfiere en la fecundación del ovocito por el daño del acrosoma. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos efectos secundarios varían dependiendo de la especie animal, la dosis, la duración del tratamiento con corticosteroides y sobre todo la edad del animal. Se concluye que los corticosteroides causan un cierto grado de afección en la calidad seminal en cobayos machos, pero es conveniente tener en cuenta que su uso es necesario en ciertas condiciones médicas. Es crucial realizar un seguimiento de la función reproductiva en animales en tratamiento con corticosteroides a largo plazo y considerar la posibilidad de interrupción del tratamiento o la reducción de las dosis si se observa una disminución significativa en la tasa de preñez de los programas reproductivos.

9. Recomendaciones

Los estudios incluidos en esta revisión sugieren que la especie animal, la dosis, duración de la administración de corticosteroides y la edad son factores importantes a considerar en el efecto sobre la calidad seminal. No obstante, se recomienda el uso de la flumetasona en lugar de dexametasona, debido a que no genera grandes alteraciones en parámetros seminales. De igual forma, es importante tener en cuenta estos efectos potenciales en la calidad seminal al considerar el uso de corticosteroides en programas de reproducción en animales.

10. Bibliografía

Stan F. (2015). Anatomical particularities of male reproductive system of guinea pigs (*Cavia Porcellus*). *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, 72(2), 288-296.

Pinduisaca, F. (2018). Colecta y evaluación de semen de cuyes (*Cavia porcellus*) extraído por la técnica de electroeyaculación en el centro Experimental Uyumbicho. Tesis, Médico Veterinario. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnica. Quito-Ecuador.

Vilca, C. (2007) Anatomía del cuy, Informe final- Oficina de Investigación UNA Puno.

Lavara, J y J.S., Vicente. 2001. Estado actual de la reproducción encunicultura. s.l.: Lagomorpha (113): 24-32, 2001.

Trujillo, Bravo Rafael A. (1994). Biología del Cuy. Riobamba: Editotial Pedagógica Freire 1994.

Almeda, Héctor Miguel. 2001. Anatomía y Fisiología del Macho. Producción Pecuaria. Colombia: Terranova Editores, Ltda, 2001.

Vásquez, B. & Del Sol, M. Estudio morfológico de la próstata y glándulas vesiculares de Cobayo (*Cavia porcellus*). *Int. J. Morphol.*, 28(4):1301-1307, 2010.

Bitzinger, N. (2008). Abdominale Sonographie beim Meerschweinchen (*Cavia aparea. Porcellus 1758*). Munich: Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gomez Proto, G. (2020). *Efecto del estrés por calor sobre la calidad espermática de toros de la raza Holstein. Respuesta fenotípica y desviación individual*. enero 12, 2022, de Universidad Politécnica de Valencia Sitio web: <https://n9.cl/r5hz7>

Aponte, P. M. (2001). *Evaluación morfológica cuantitativa de la espermatogénesis en bovinos de raza brahman durante el período prepuberal*. Disponible en: <https://n9.cl/pqau7>

Tapia, D., & Tello, D. (2016). Evaluación cuantitativa de espermatozoides de la cola del epidídimo de cuyes (*Cavia porcellus*) criollos y mejorados en dos edades reproductivas. Universidad de Cuenca.

Lunstra D, Echtenkamp E. (1982). Puberty inbeef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *J AnimSci* 1982; 55 (3): 638-48.3.

Senger P. (1999). Pathways to pregnancy and parturition. 1st revised edition. Current conceptions, Inc.

Hafez E. (1993). Reproducción e inseminación artificial en animales. México: Interamericana McGraw Hill.

Botana, L. M., Landoni, M. F., & Jiménez, T. M. (s. f.). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (1.a ed., Vol. 2). McGraw-Hill.

Sumano, H. S., & Ocampos, L. (2006). *Farmacología Veterinaria* (162.a ed., Vol. 3). McGraw-Hill Interamericana.

Pereira CC. Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal. 1nd Edición. Belo Horizonte: FEPMVZ; 2005.

Nascimento E, Santos R. Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2 edición. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 93-104.

Santos R, Silva C, Ribeiro A, Vasconcelos A, Pesquero J, Coelho S, et al. Effect of growth hormone and induced IGF-1 release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. *Theriogenology* 1989; 51(5):975-984.

Lalau, J. D., Aubert, M. L., Carmignac, D. F., Grégoire, I., & Dupouy, J. P. (1990). Reduction in testicular function in rats. II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology*, 51(3), 289–293. <https://doi.org/10.1159/000125352>

Piffer, R.C., Garcia, P.C., Gerardin, D.C., Kempinas, W.D., & Pereira, O.C. (2009). Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. *Reproduction, fertility, and development*, 21 5, 634-9.

Andrews, C. J., Yapura, J., Potter, M. A., McGlade, K., Perrott, M. R., & Thomas, D. G. (2022). Exogenous glucocorticoid treatment affects Sertoli cell load and epididymal sperm quality in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*, 189, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.026>

Schultz, R., Isola, J., Parvinen, M., Honkaniemi, J., Wikström, A. C., Gustafsson, J. A., & Pelto-Huikko, M. (1993). Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Molecular and cellular endocrinology*, 95(1-2), 115–120. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(93\)90036-j](https://doi.org/10.1016/0303-7207(93)90036-j)

Charpenet, G., Tache, Y., Forest, M. G., Haour, F., Saez, J. M., Bernier, M., Ducharme, J. R., & Collu, R. (1981). Effects of chronic intermittent immobilization stress on rat testicular androgenic function. *Endocrinology*, *109*(4), 1254–1258. <https://doi.org/10.1210/endo-109-4-1254>

Orr, T. E., & Mann, D. R. (1992). Role of glucocorticoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Hormones and behavior*, *26*(3), 350–363. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(92\)90005-g](https://doi.org/10.1016/0018-506x(92)90005-g)

Bambino, T. H., & Hsueh, A. J. (1981). Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology*, *108*(6), 2142–2148. <https://doi.org/10.1210/endo-108-6-2142>

Salami, S.A., Salahdeen, H.M., Moronkola, O.T. *et al.* Vitamin C supplementation during chronic variable stress exposure modulates contractile functions of testicular artery and sperm parameters in male Wistar rats. *Middle East Fertil Soc J* **25**, 8 (2020). <https://doi.org/10.1186/s43043-020-0017-7>

Seyfettin Gür, Tanzer Bozkurt, Gaffari Türk. (2005). Short term effects of dexamethasone on hyaluronidase activity and sperm characteristics in rams, *Animal Reproduction Science*, Volume 90, Issues 3–4, Pages 255-263, ISSN 0378-4320, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.01.021>.

Orazizadeh, M., Khorsandi, L. S., & Hashemitabar, M. (2010). Toxic effects of dexamethasone on mouse testicular germ cells. *Andrology*, *42*(4), 247–253. doi:10.1111/j.1439-0272.2009.00985.x

Layasadat Khorsandi, Mehri Mirhoseini, Masoomah Mohamadpour, Mahmoud Orazizadeh & Soheila Khaghani (2013) Effect of curcumin on dexamethasone-induced testicular toxicity in mice, *Pharmaceutical Biology*, *51*:2, 206-212, DOI: 10.3109/13880209.2012.716854

Mohammad Eini, A., & Mohammadpour, A. A. (2020). Protective effects of Vitamin A on the testicular tissue of mice treated with Prednisolone. *Applied Biology*, *10*(40), 71-82.

11. Anexos

Anexo 1. Adaptación de cobayos al nuevo sistema de alimentación y de alojamiento.



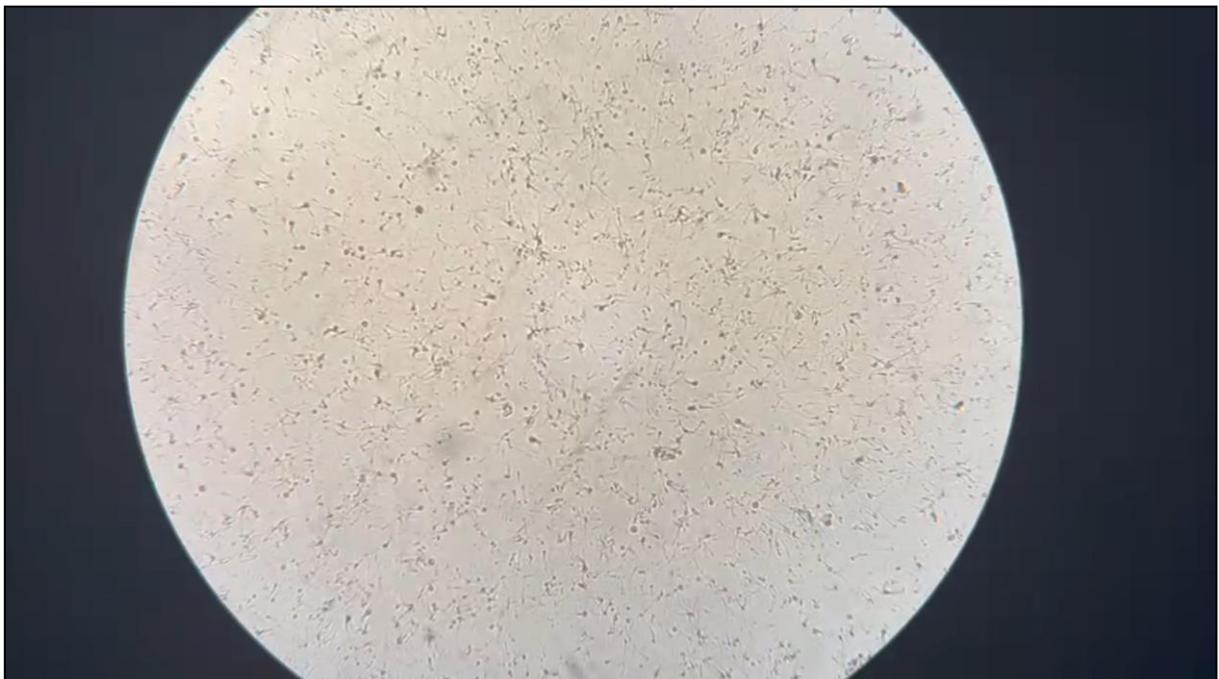
Anexo 2. Aplicación de los tratamientos (T 0/Testigo: Solución Fisiológico, T1: Flumetasona y T2: Dexametasona) y registro de las dosificaciones.



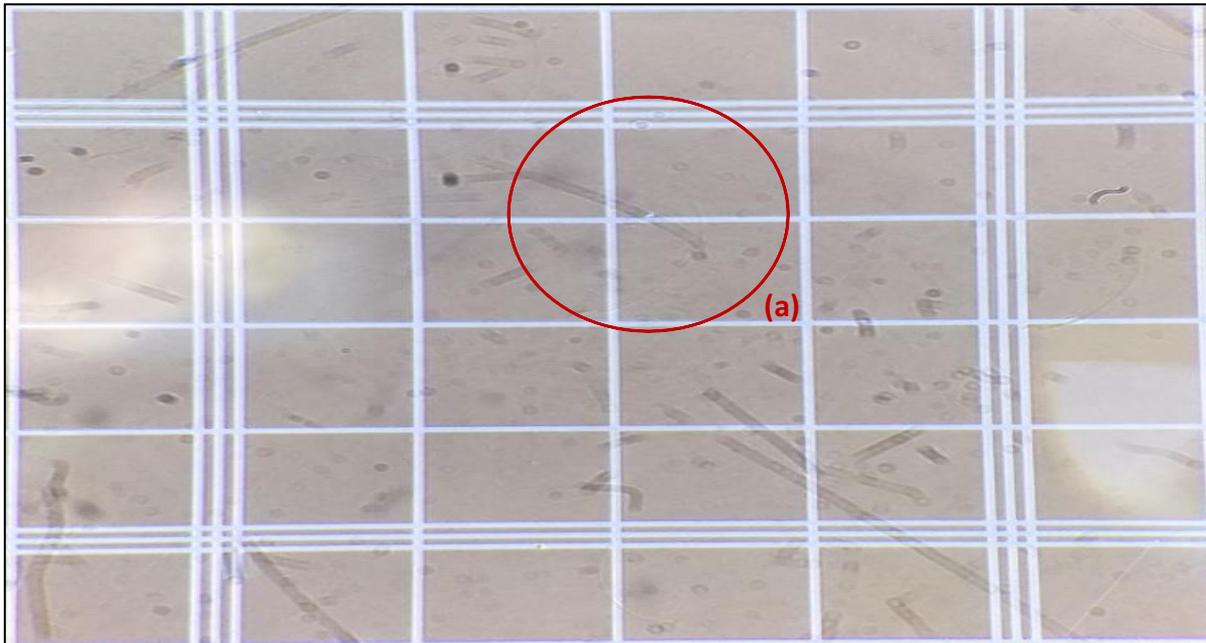
Anexo 3. Toma de muestras seminales de la cola del epidídimo a través de lavado retrógrado con el diluyente Botusemen® Gold sobre los tubos Eppendorf.



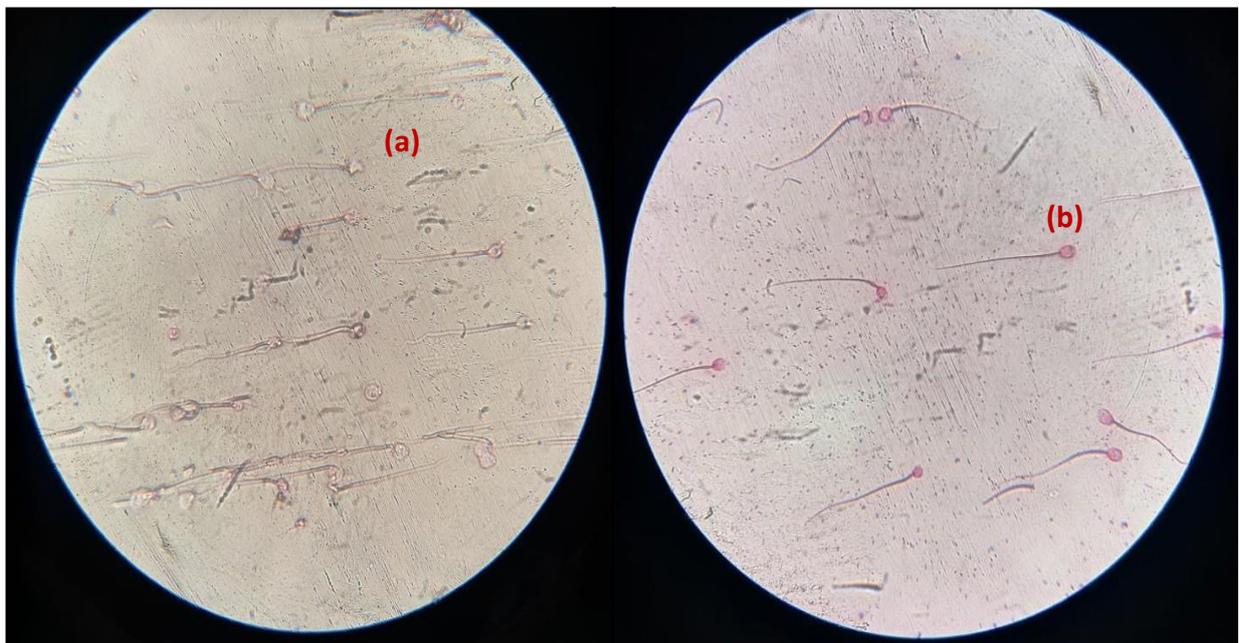
Anexo 4. Observación de muestras seminales a través del microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con aumento de 40 X para la obtención de resultados de Motilidad Total y Vigor.



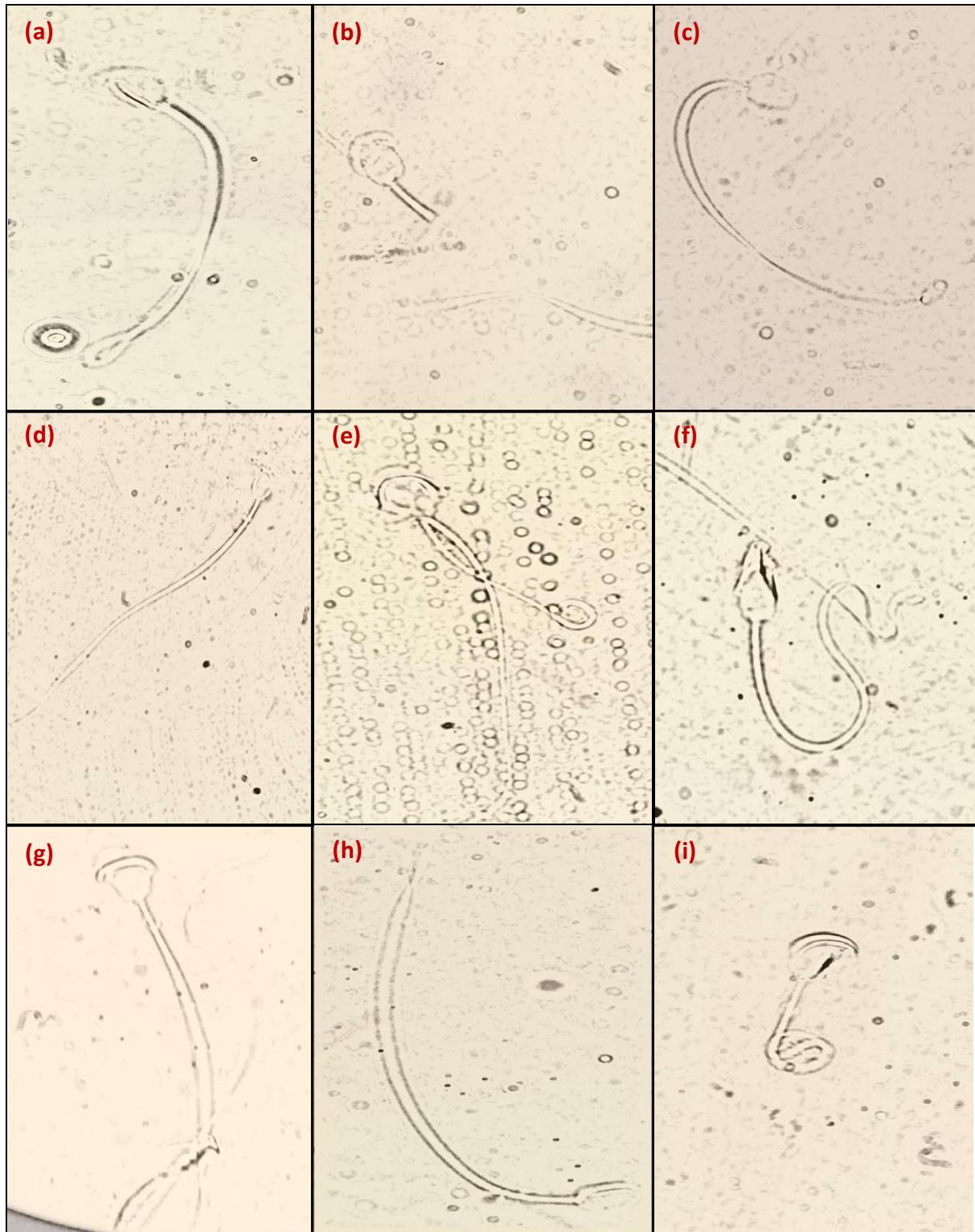
Anexo 5. Observación de muestras seminales a través del microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con aumento de 40 X de la cámara de recuento celular Neubauer para la obtención de resultados de Concentración espermática. (a) Espermatozoide señalado en el campo.



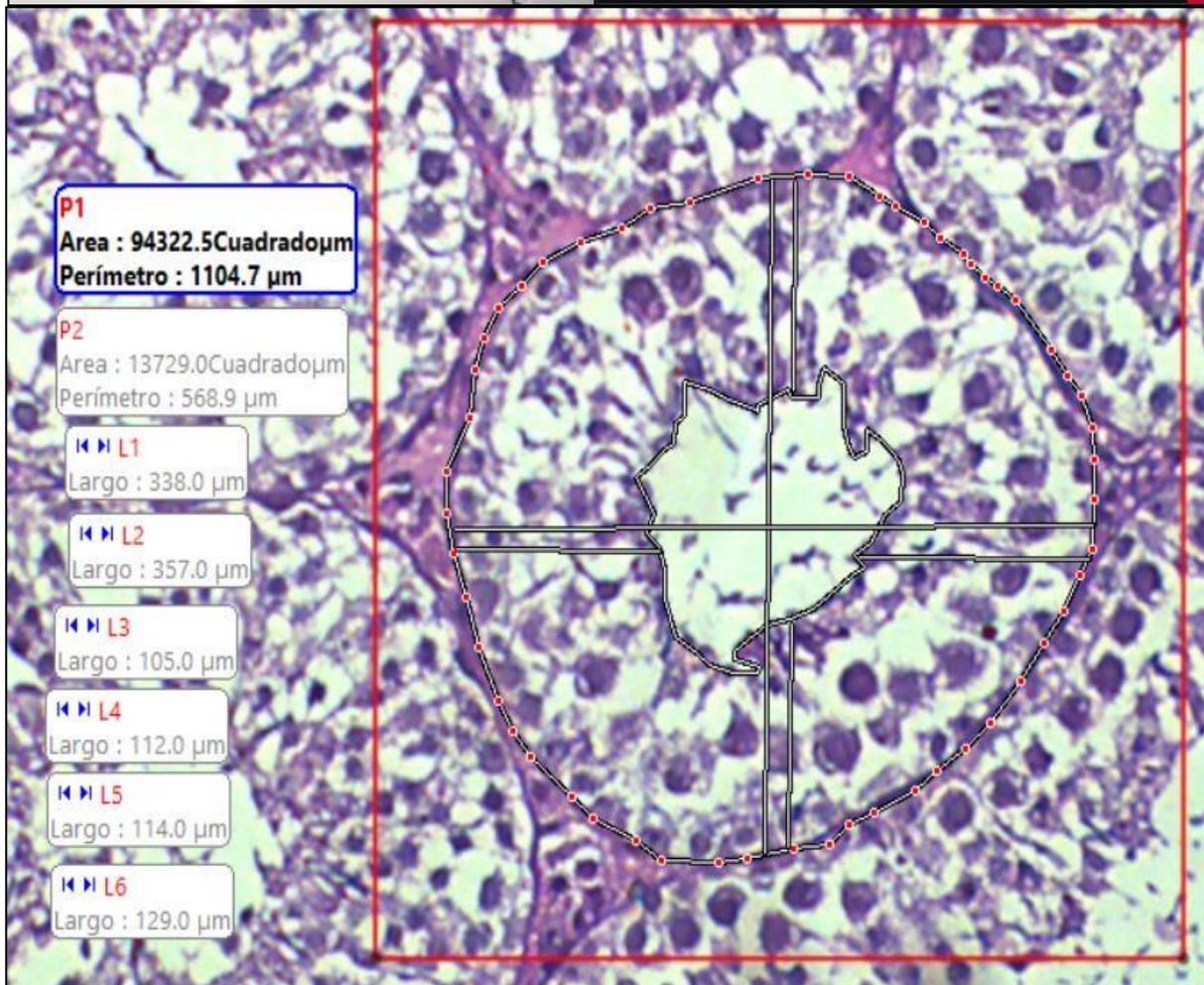
Anexo 6. Observación de muestras seminales a través del microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con aumento de 40 X para la obtención de resultados de Viabilidad espermática. (a) Espermatozoides vivos (b) Espermatozoides muertos.



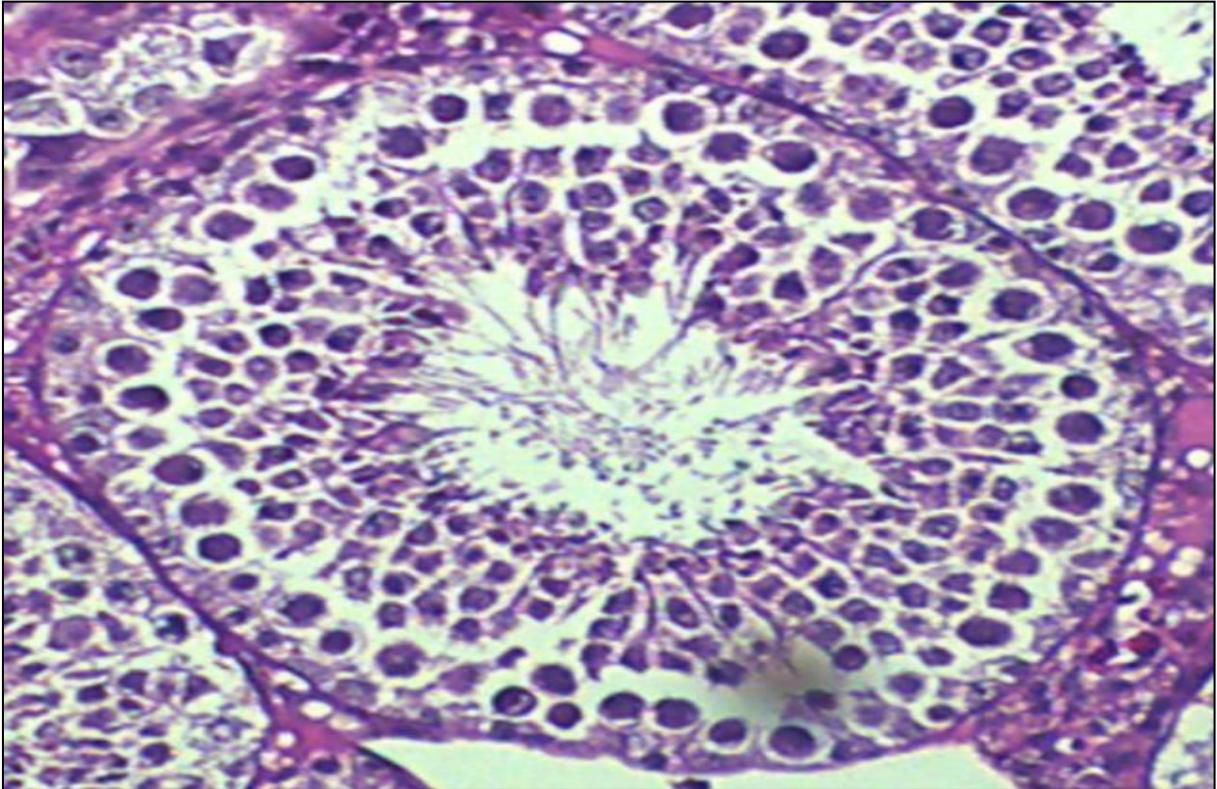
Anexo 7. Observación de muestras seminales a través del microscopio óptico (Labomed ®, labo America, inc, USA) con aumento de 100 X para la obtención de resultados de Morfología Espermática enfocado al tratamiento 2 a base de dexametasona. (a) Cola doblada, (b) Alteración cuello, (c) Gota citoplasmática distal, (d) Cabeza subdesarrollada, (e) Medusa, (f) Acrosoma, (g) Cabeza periforme, (h) Cabeza delgada, (i) Cola fuertemente enrollada.



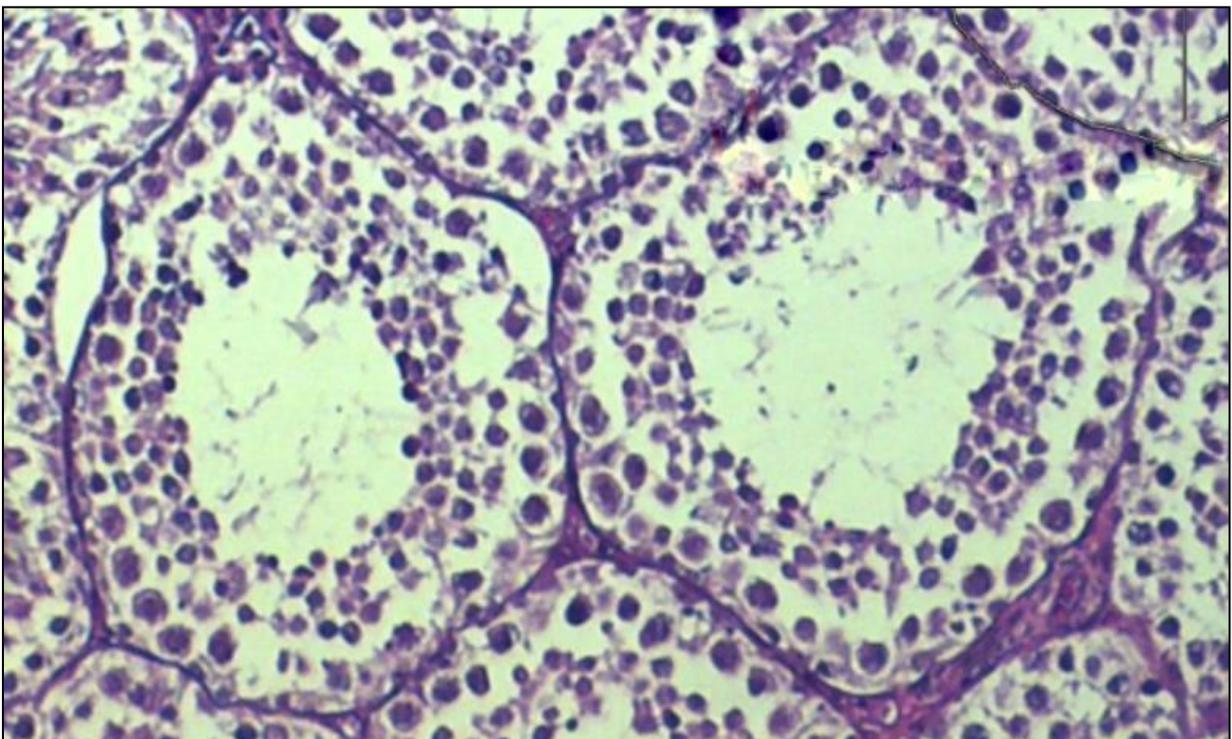
Anexo 8. Caracterización de las histomorfomedidas de los túbulos seminíferos (TS) de testículos de cobayos sometidos a los tratamientos de la investigación a través de la aplicación de Motic images Plus 2.0. P1_Área: área total del TS, P1_Perímetro: perímetro total del TS, P2_Área: área total de la luz del TS, P2_Perímetro: perímetro de la luz del TS, L1: diámetro vertical, L2: diámetro horizontal, L3-L4-L5-L6: altura epitelial.



Anexo 9. Túbulo seminífero normal.



Anexo 10. Túbulo seminífero con degeneración testicular, donde se ve incrementada la luz y se observa poca cantidad de espermatozoides.



Anexo 11. Certificado del resumen en inglés.

Lic. Jean Pierre Bustos Rodríguez
Profesional del idioma inglés

CERTIFICA:

Yo, Lic. Jean Pierre Bustos Rodríguez, portador de la cédula de ciudadanía 1105046591, profesor del idioma inglés, con registro en la Senescyt número **1031-2022-2452270** certifico: que la traducción al idioma inglés del resumen de tesis titulado **Efecto de la aplicación de corticosteroides sobre la calidad seminal en cobayos (*Cavia porcellus*)** de autoría del estudiante Juan Pablo Castillo Gálvez, con cédula de ciudadanía 1105200529 corresponde al texto original en español, siendo esta una traducción textual del documento adjunto.

Loja, 13 de marzo del 2023



Firmado electrónicamente por:
**JEAN PIERRE
BUSTOS
RODRIGUEZ**

Lic. Jean Pierre Bustos Rodríguez
Profesional del idioma inglés