



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**

TESIS

**EFFECTO DEL CLORURO DE CALCIO EN LA CASTRACIÓN QUÍMICA DE
CANINOS**

**Para optar el título profesional de
MEDICO VETERINARIO**

**PUCHURI CORILLA LUISA MERCEDES
Bachiller en Medicina Veterinaria**

LIMA- PERU

2017

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi hermana mayor Liliana Puchuri Corilla, quien gracias a su ejemplo aprendí la importancia de la preparación en la vida y sobre todo me enseñó que no existe el éxito sin esfuerzo. A mi esposo Iván Pardo por su apoyo incondicional y constante en todas las áreas de mi vida y a mis dos hijos Fabrizzio e Ian, que son la inspiración de mi vida.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar doy gracias a Dios por que todo lo que soy y lo que tengo es gracias a él.

A mi madre Martha Corilla. Gracias a ella tengo la vocación de ser médico veterinario. A mis hermanas por su apoyo constante.

A mi esposo, suegros por que siempre me dieron su apoyo.

Al Dr. Joe Zulty VMD del hospital veterinario “Essex Middle River Veterinary Center” en Meryland EEUU. Mi más sincera gratitud por confiar en mí para la realización de este estudio, por el suministro de Cloruro de Calcio (CaCl_2) utilizado en la tesis y por la ayuda en el estudio histopatológico de las muestras biológicas.

A mi amiga Carmen Cáceres MVZ por acompañarme en el trabajo de campo.

Al Dr Peter Denooij VMD encargado de la difusión y distribución del CaCl_2 en Republica Dominicana, quien estuvo pendiente de todo el proceso de mi tesis.

A la Mg.MV Lyana Quispe, MSc MV Rose Mary Barreto y Mg.MV Wilmer Jara Galarreta miembros de mi jurado por facilitarme y ayudarme en todo el proceso de mi tesis; sobre todo a mi Directora MV Juana Zavaleta por todo su apoyo en todo el proceso de mi tesis.

Al Dr Samame Beltran Hugo por ayudarme en la estadística de mi tesis.

A todos mis familiares y amigos que participaron de alguna forma en la realización de ésta tesis.

Finalmente, a todos los docentes que me brindaron sus conocimientos durante los 5 años que estuve preparándome para ser profesional.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo evaluar el efecto de la castración química mediante la aplicación de la inyección intratesticular de Cloruro de Calcio (CaCl_2), utilizando como indicadores el tamaño testicular, los niveles séricos de testosterona y la histopatología del testículo en 7 caninos aparentemente sanos. El tiempo promedio de duración fue de 6 meses, entre septiembre 2016 y febrero de 2017, en el distrito de Wanchaq-Cusco. Se realizaron mediciones macroscópicas de los testículos haciendo uso de un Vernier (0, 30, 90 y 180 días). Además, se tomaron muestras de sangre para la medición de los niveles séricos de testosterona (día 0 y día 180) y por último para la histopatología se recolectaron los testículos mediante castración quirúrgica. El procedimiento se inició con un examen clínico, seguido del proceso anestésico superficial y la inoculación de CaCl_2 en cada testículo, utilizando volúmenes establecidos en investigaciones previas. El muestreo será no probabilístico por conveniencia. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba t para los niveles séricos de testosterona y regresión lineal para las mediciones testiculares. Para determinar la atrofia testicular se hizo la descripción histopatológica. Obteniéndose como resultados para el indicador tamaño testicular, en los tiempos 0, 30, 90 y 180 días post inoculación de CaCl_2 hubo una disminución significativa; el promedio de tamaño testicular derecho de los 7 caninos fue 18,9 mm a 11,1 mm y en el testículo izquierdo de 18,7 mm a 11 mm al empezar y terminar el estudio respectivamente. Obteniendo un promedio total de 18,8 mm en el día 0 y 11,1 mm en el día 180. Se pudo observar que también se produjo una disminución significativa ($P < 0.005$) en los niveles séricos de testosterona. Mostrando a los 0 días una media de 3,9 ng/ml (IC 95% 2,5 – 7,6), y a los 180 días posteriores a la inoculación 1,3 ng/ml (IC 95% 0,16–4,0). A la histopatología presentaron en general grandes áreas necróticas, fibróticas y mineralizadas con severa inflamación linfocitaria y con túbulo seminíferos degenerados sin presencia de espermatozoides. Con esto se puede concluir que el CaCl_2 es capaz de alterar la estructura testicular, generando infertilidad con una reducción en el tamaño testicular y disminución de los niveles séricos de testosterona eliminando comportamientos sexuales indeseados.

Palabras clave: Castración química, atrofia y degeneración testicular, Caninos.

ABSTRACT

The objective of this research is evaluate the effect of chemical castration by the intratesticular injection of calcium chloride (CaCl_2), using testicular size, serum testosterone levels and testis histopathology as indicators in 7 apparently healthy canines – discard the dogs with dermatological lesions in the scrotum, unilateral or acquired deformities or anomalies in the testicular area – aged between 1 and 10 years. The average duration will be 6 months, running between September 2016 to February 2017, Wanchaq district – Cusco. Macroscopic measurements of the testicles (day 0, 30, 90 and 180) will be performed using a Vernier, blood samples will be collected for the measurement of serum testosterone level (day 0 and day 180) and testicular histopathology will be collected by surgical castration. The procedure will begin with a clinical examination, followed by the anesthetic process and the application of CaCl_2 injection in each testicle with an average volume according to the pre-established testicular size. Sampling will be non-probabilistic for convenience and for statistical analysis it was performed the t-test for seric levels of testosterone and linear regression for testicular measurements. A histopathology description was performed to determine testicular atrophy. It was observed that there was a significant decrease in testicular size at 30, 90 and 180 days after inoculation of CaCl_2 ; In the right testicle from 18.9 mm to 11.1 mm and in the left testicle from 18.7 mm to 11 mm. Obtaining a total average of 18.8 mm at day 0 and 11.1 mm at 180 days. It was observed that there was also a significant decrease ($P < 0.005$) in serum testosterone levels at mean 3.9 ng / ml (95% CI 2.5 - 7.6), and 180 days post inoculation 1.3 ng / ml (95% CI 0.16-4.0). Histopathology showed large necrotic, fibrotic and mineralized areas with severe degenerated lymphohistiocytic inflammation and seminiferous tubules with no sperm presence. With this, it can be concluded that CaCl_2 is capable of altering the testicular structure, generating infertility with a reduction in testicular size and a decrease in serum testosterone levels, eliminating unwanted sexual behaviors.

Key Words: Chemical castration, atrophy and testicular degeneration, Canines.

ÍNDICE

| CONTENIDO | Pág. |
|--|------|
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimiento | iii |
| Resumen | iv |
| Abstract | v |
| Indice | vi |
| I. Introducción | 07 |
| II. Marco teórico | 09 |
| 2.1. Antecedentes | 09 |
| 2.2. Cloruro de Calcio | 11 |
| 2.3. Castración Química | 16 |
| 2.4. Técnica de esterilización en machos | 19 |
| 2.5. Niveles séricos de testosterona | 23 |
| III. Materiales y métodos | 28 |
| 3.1. Espacio y tiempo | 28 |
| 3.2. Población y muestra | 28 |
| 3.3. Diseño experimental | 28 |
| 3.4. Equipos y materiales | 29 |
| 3.5. Procedimiento | 30 |
| 3.6. Diseño estadístico | 32 |
| IV. Resultados | 33 |
| 4.1. Evaluación de la variable tamaño testicular derecho | 34 |
| 4.2. Evaluación de la variable tamaño testicular izquierdo | 34 |
| 4.3. Evaluación de la variable niveles séricos de testosterona | 35 |
| 4.4. Evaluación de la variable histopatología testiculares | 36 |
| V. Discusión | 38 |
| VI. Conclusiones | 40 |
| VII. Recomendaciones | 41 |
| VIII. Referencias bibliográficas | 42 |
| Anexos | |

I. INTRODUCCIÓN

Cusco es uno de los departamentos menos explorados en el área de medicina veterinaria; debido a que hasta la actualidad no existe una facultad de esta carrera. Hoy en día la demanda en la atención y tenencia responsable de mascotas se incrementa paulatinamente, siendo uno de los principales puntos: el control de la sobrepoblación canina, el cual es un vasto problema en salud pública, esto se debe a las características de la especie, la cual tiene alta prolificidad y además son entes vectores, portadores de aproximadamente 65 enfermedades zoonóticas. Dentro de ellas las más común la rabia, transmitida a través de las mordeduras, en su mayoría por perros callejeros los cuales representan 75% en promedio de la población total de canes, lo cual lo convierte en una problemática actual en el sur de nuestro país; es por ello que el control de la sobrepoblación canina es de vital importancia.

Actualmente la esterilización quirúrgica es reconocida como el medio más eficaz para el control de las poblaciones de animales de compañía, sin embargo se debe considerar el impacto causado por un proceso invasivo, los cuales son significativos tales como el proceso de recuperación, costo, necesidad de tener un equipo médico capacitado, material quirúrgico estéril, riesgos inherentes a cualquier procedimiento quirúrgico además, muchas personas no están dispuestos a someter a sus mascotas a lo que perciben como un procedimiento doloroso e invasivo, lo que puede limitar estos programas. Por ello en estos últimos tiempos se ha puesto en boga el estudio de procedimientos no invasivos buscando un método no quirúrgico que cumpla con las características ideales como eficacia, permanente o definitivo, dosis única de inoculación, seguro, que no perjudique la salud ni comportamiento del paciente y rentable lo cual permita estar al alcance de todos, permitiendo poner en práctica esta técnica en las organizaciones de bienestar animal, programas de salud pública y gobiernos.

Por lo tanto con lo obtenido mediante los resultados de la presente investigación, se espera poder colaborar con magnificar el control de la sobrepoblación canina; evitando de manera indirecta el sacrificio inescrupuloso masivo de canes y en el factor económico, reducción de costos en comparación con las castraciones y postoperatorio convencionales.

II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

La información científica sobre el uso de cloruro de calcio (CaCl_2) en la castración se publicó por primera vez en 1977 (1).

Billy Clay et al., en un estudio de castración química canina en 14 perros a los 30 días post inyección. Se encontraron que los testículos mostraron respuesta inflamatoria con la mineralización, fibrosis y degeneración tubular. Epidídimos mostraron inflamación, mineralización y fibroplasia. Las fugas de CaCl_2 en el escroto producen necrosis y se cierran en 30 días (1).

Kuladip J. y Prabhat K S. publicaron el 21 de Julio del 2011, un estudio denominado Evaluación clínica de esterilización no quirúrgica de los gatos machos con una sola inyección intra - testicular bilateral de Cloruro de calcio. Este trabajo se realizó en felinos, 6 gatos por grupo, utilizando CaCl_2 (Dihidrato de cloruro de calcio en solución salina con hidrocloreuro de lidocaína como anestesia local) al 5%, 10% y 20%. El trabajo duró 60 días, encontrándose necrosis y tejido fibrótico con muy bajo conteo de espermatozoides y disminución de testosterona en suero. Una única inyección intratesticular de CaCl_2 a dosis de 5, 10 o 20% condujo a una disminución significativa graduada ($p < 0,01$) en el índice de gonado-somática en comparación con los animales tratados sólo con solución salina normal (control vehículo). Este parámetro exhibió un mayor nivel de disminución del tamaño testicular en la dosis de 10 y 20%, un remanente testicular se retiró quirúrgicamente de los animales tratados de cloruro de calcio al 20% en comparación con los otros tratamientos (5 y 10%). La inyección intratesticular de solución de CaCl_2 al 20% dio como resultado la necrosis testicular completa del epitelio germinal junto con la única presencia de tejido fibroso y tejido hialino. Se concluyó que

una sola inyección intratesticular bilateral de cloruro de calcio en gatos produce una permanente esterilización siendo económica, rápida y eficaz, siendo una simple alternativa a la castración quirúrgica (2).

El primer caso reportado por el Dr Koger el 14 de Enero de 1977, en canino Golden de 3 años de 40 kg se inyectó 2 ml CaCl_2 (30 gr cloruro de calcio en 100 ml de etanol al 90%) intratesticular con aguja N°22, presentó inflamación post inyección durante 1 semana, a los 60 días se observó atrofia y palpo un pequeño remanente fibrótico (3).

En otro caso de un canino mestizo de 3 años de edad con un peso 7 kg, se utilizó CaCl_2 al 10% en 70% alcohol isopropílico, con una cantidad de 0.75 ml en el testículo derecho y 0.6 ml en el izquierdo debido por la asimetría de las circunferencias testiculares, 3 meses post-inyección disminuyeron de 2 cm de circunferencia testicular a 0.5 cm disminuyendo también el comportamiento de marcado (3).

Otro reporte clínico realizado por Koger, se inyectó CaCl_2 intratesticular a más de 300 cabezas de ganado y un menor número de otras especies con resultados satisfactorios en la castración (3).

Dos casos más fueron reportados por Koger; el primer caso de un toro Holstein al cual se inyectó CaCl_2 en cada testículo recuperándose en 2 hs, obteniendo resultados satisfactorios, 60 días después de las cuales solo se palpó un remanente testicular y cordón espermático, teniendo un comportamiento asexual y un buen comportamiento al manejo del animal, a los 17 meses de edad se llevó al camal pesando 1050 lbs, el 18 de enero de 1977 el testículo derecho fue observado a un tercio y el izquierdo a la mitad del tamaño inicial, inyectando de nuevo 5ml de CaCl_2 al 30% en 90% de etanol intratesticular derecho y 6ml en el testículo izquierdo sin anestesia local observándose un poco de incomodidad, 2 meses después se observó el escroto a la mitad de tamaño

inicial flácidos y vacíos a la palpación con un poco de grasa y remanente testicular con 3 cm en la parte dorsal del escroto, mandándolo al camal el 11 de octubre de 1977 con un peso de 1105 lbs con peso de carcasa de 314 kg denominándolo muy bueno. En la histopatología de los testículos mostraron atrofia y fibrosis con un pequeño porcentaje de células intersticiales viables y túbulos seminíferos con muy pocas células espermáticas, es decir esperma no viable. La conclusión en ganado fue que los resultados con buena efectividad son con dosis de 1-2.5 ml/45 kg de CaCl_2 dependiendo de la variación individual (3).

Otro trabajo de investigación fue publicado en el 2011 por Leoci R, Aiudi G, Silvestre F, et al. Acta Veterinaria Scandinavica.. Como título, Búsqueda de la dosis a largo tiempo en el uso de CaCl_2 en solución salina como método de esterilización no quirúrgica en perros: Evaluación de la dosis más efectiva (dosis-concentración). Se evaluó al 0,10, 20, 30 y 60% a 10 perros por grupo, se midió el conteo de esperma, testosterona en suero y efectos locales a los 0, 2, 6 y 12 meses post inyección y a los 0 y 12 meses post inyección se midió el tamaño testicular y volumen seminal. Después de 6 meses disminuyó la testosterona en 35-70% y se concluyó que la dosis recomendada fue al 20% sin complicaciones. Se concluyó que la castración con cloruro de calcio es un experimento rápido conveniente, económico sin realizar una cirugía y por lo tanto las complicaciones de la misma (4) (Anexo1).

2.2. Cloruro de Calcio

2.2.1. Generalidades

Es un mineral que se puede encontrar como anhídrido, dihidrato o hexahidrato, se muestra como cristales cúbicos, gránulos, hojuelas o polvo (5).

2.2.2. Fórmula química

El Cloruro de Calcio cuya fórmula química es CaCl_2 y es el compuesto iónico de calcio y cloro. Es una sal que se comporta como un típico iónico haluro, siendo sólido a

temperatura ambiente y altamente soluble en agua. Las aplicaciones más comunes son para la salmuera de las plantas de refrigeración, el hielo y el control de polvo en las carreteras, y la desecación. Debido a su higroscópica naturaleza, la atracción y retención de agua, anhídrido de cloruro de calcio debe mantenerse en recipientes herméticos (5).

2.2.3. Usos

Se utiliza como desecador, también como anticongelante, estabilizador, en control de polvo, como conservador de madera, en mezclas para concreto, en neumáticos, etc (5).

2.2.3.1. Desecante

Tubos desecantes se embalan con frecuencia con CaCl_2 . Kelp se seca con cloruro de calcio para su uso en la producción de carbonato de sodio. Cloruro de calcio anhídrido ha sido aprobado por la FDA como una ayuda de envasado para asegurar la sequedad (5).

También se utiliza en químicos a base de sal deshumidificadora en entornos domésticos y de otro tipo para absorber la humedad / humedad del aire (6).

2.2.3.2. Revestimientos de carretera

Estas higroscópicas propiedades del CaCl_2 se aplican también para mantener una capa líquida en la superficie de los caminos de tierra, que tiene el polvo hacia abajo. Esto evita las partículas de polvo más finas en la carretera, proporcionando una capa de acolchado. Si éstos están autorizados a volar lejos, el agregado más grande comienza a cambiar alrededor y el camino se rompe. El uso de CaCl_2 reduce la necesidad de nivelación hasta en un 50% y la necesidad de materiales de relleno en hasta un 80% (6).

2.2.3.3. Deshielo y punto de congelación

A granel el CaCl_2 se usa para el deshielo en Japón. Por deprimir el punto de congelación del agua, se utiliza para prevenir la formación de hielo y para descongelar. Esto es particularmente útil en superficies de carretera. El CaCl_2 en disolución es exotérmico, y el compuesto es relativamente inofensivo para las plantas y del suelo; sin embargo, observaciones recientes en el estado de Washington sugieren que puede ser particularmente duro en los árboles de hoja perenne al borde de la carretera. También a temperaturas más bajas es más eficaz el cloruro de sodio, cuando es distribuido para este uso y por lo general toma la forma de pequeñas bolas blancas de unos pocos milímetros de diámetro, llamadas pepitas. Las soluciones de CaCl_2 pueden prevenir la congelación a temperaturas tan bajas como -52°C (-62°F), por lo que es ideal para rellenar e implementar neumáticos agrícolas como lastre líquido, ayudando a la tracción en climas fríos (6).

2.2.3.4. Piscinas y acuarios

El CaCl_2 se utiliza para aumentar la dureza del agua en las piscinas. Esto reduce la erosión del hormigón en la piscina. Por el principio de Le Chatelier y el efecto de ion común, el aumento de la concentración de calcio en el agua reducirá la disolución de compuestos de calcio esencial para la estructura de hormigón (2).

En los acuarios marinos, se añade CaCl_2 para introducir biodisponibilidad de calcio para los animales de carbonato de cáscara de calcio tales como moluscos y algunos cnidarios. El hidróxido de calcio (mezcla kalkwasser) o un reactor de calcio también se puede utilizar para introducir de calcio; Sin embargo, la adición de CaCl_2 es el método más rápido y tiene un impacto mínimo en pH (6).

2.2.3.5. Alimentación

Como ingrediente, que está catalogado como un aditivo de alimentos permitidos en la Unión Europea para su uso como un secuestrante y agente reafirmante con el número

E E509. Se considera como generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos. Su uso en la producción de cultivos orgánicos es generalmente prohibido bajo US National Organic Program 's Lista nacional de sustancias autorizadas y prohibidas. La ingesta media de cloruro de calcio como aditivos alimentarios ha sido estimada en 160 a 345 mg / día para los individuos (6).

Como agente reafirmante, CaCl_2 se utiliza en conservas vegetales, en reafirmante soja cuajada en queso de soja y en la producción de un caviar sustituto de jugos de verduras o frutas. Es de uso general como un electrolito en las bebidas deportivas y otras bebidas, incluyendo embotellada agua. El sabor extremadamente salado de CaCl_2 se utiliza para dar sabor a los encurtidos sin aumentar de la comida de sodio contenido. Propiedades descenso crioscópico de CaCl_2 se utilizan para disminuir la congelación del caramelo en barras de chocolate de caramelo llena (6).

En cervecera, el CaCl_2 se utiliza a veces para corregir las deficiencias de minerales en el agua de elaboración. Afecta a las reacciones de sabor y químicos durante el proceso de elaboración de la cerveza, y también puede afectar a la función de la levadura durante la fermentación (6).

En la fabricación de queso, CaCl_2 a veces se añade al proceso de pasteurización y homogeneización de la leche para restaurar el equilibrio natural entre el calcio y proteína en la caseína para los fines de la toma de quesos, como el brie, Pélardon y Stilton. Mediante la adición de CaCl_2 a la leche antes de la adición del coagulante, los niveles de calcio se restauran. Además, se añade con frecuencia a las manzanas en rodajas para mantener la textura (6).

2.2.3.6. Medicina

Se inyecta para tratar las quemaduras internas de ácido fluorhídrico. Se puede utilizar para tratar la intoxicación por magnesio. Inyección de CaCl_2 puede antagonizar la toxicidad cardíaca medida por electrocardiograma. Puede ayudar a proteger el miocardio de niveles peligrosamente altos de suero de potasio en la hiperpotasemia. El CaCl_2 se puede utilizar para tratar rápidamente la toxicidad como bloqueador de canal de calcio, de los efectos secundarios en los medicamentos tales como diltiazem (Cardizem). Ayudar a evitar posibles ataques cardíacos (7).

2.2.3.7. La esterilización de animales

Dihidrato de cloruro de calcio (20% en peso) disuelto en etanol (95% ABV) se ha utilizado como un esterilizante para animales machos. El procedimiento no quirúrgico consiste en la inyección de la solución en los testículos del animal. Dentro de 1 mes, necrosis de los resultados de tejido testicular en la esterilización. (8)

2.2.4. Propiedades

Es soluble en agua y etanol, es higroscópico.(5)

2.2.5. Peligrosidad

- a. Ingestión: Causa irritación de boca y estómago.
- b. Inhalación: Causa irritación de nariz y garganta.
- c. Piel: Causa irritaciones leves, las soluciones muy concentradas pueden causar irritaciones más marcadas, incluso quemaduras superficiales.
- d. Ojos: Causa irritación y posible daño transitorio en la córnea, particularmente en contacto con el polvo (5).

2.3. Castración química:

Investigaciones para buscar agentes anticonceptivos en caninos machos se iniciaron sólo en las últimas décadas (9). La esterilización química se presenta como una solución para la sobrepoblación canina y para los métodos no quirúrgicos de anticonceptivos en machos (10). Una variedad de compuestos han sido probados, alguno de los cuales fueron seguros pero no efectivos y viceversa (11).

El producto ideal debe cumplir los parámetros siguientes:

- a. Inducir una infertilidad permanente.
- b. Ofrecer resultados rápidos.
- c. Eliminar el comportamiento sexual.
- d. Tener los mismos beneficios para la salud de los pacientes de los que se obtienen con los procedimientos quirúrgicos.
- e. Obtener lo anterior con una sola dosis.
- f. Preferiblemente servir para ambos sexos.

2.3.1. Sustancias químicas probadas:

2.3.1.1. Progestágenos

Los progestágenos como el megestrol (acetato) y la medroxiprogesterona reducen la calidad seminal (disminución de número total de espermatozoides, motilidad espermática y número de espermatozoides morfológicamente normales), garantizando una función anticonceptiva. Los efectos secundarios observados incluyen el desarrollo de la diabetes mellitus y tumores mamarios lo que limita su uso en perros (12).

2.3.1.2. Análogos de GnRh

Los análogos de la GnRh actúan sobre la supresión del eje pituitario-gonadal y conducen a una disminución de la testosterona y LH y azoospermia (12). Ambos progestágenos como análogos de GnRH son anticonceptivos temporales y el animal tiene su actividad reproductiva una vez discontinuado el producto.

Análogos de la GnRH como deslorelina (Suprelorin, Peptech Animal Health, Australia) se han utilizado experimentalmente en perros en forma de implantes, la región escapular aplicado en una dosis de 0,39mg / kg de ingrediente activo (13,14)

El uso de Deslorelin en gatos, es más reciente (Romagnoli et al., 2010). El efecto del análogo, cuya eficacia anticonceptiva llega a ser del 98% (13) contribuye a reducir la producción de testosterona, que cae por debajo de las tasas de 1 ng / ml. Hasta la fecha no hay un efecto adverso resultante de la aplicación de los implantes, que tienen un periodo de acción estimado entre 8 y 12 meses (14).

El Azaglinafarelina es una droga similar a la nafarelina. También se utiliza como un implante subcutáneo, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, es un medicamento seguro que se puede aplicar prepúberes hembras y machos adultos. La anticoncepción se extiende por un período de hasta un año después de la administración del implante y no parece interferir con el desarrollo corporal de los animales sometidos a tratamiento (14). Aunque se observan diferencias en la intensidad del efecto de retroalimentación negativa entre las especies análogos de la GnRH han demostrado ser eficaces como anticonceptivos en caninos y felinos salvajes (15).

2.3.1.3. Agentes esclerosantes

Hay informes en la literatura sobre el uso de agentes esclerosantes en los testículos, el epidídimo y los conductos deferentes (17).

Si los agentes son inyectados en el conducto deferente o el epidídimo se induce una fibrosis que bloquea el transporte de los espermatozoides, resultando en una

azoospermia, sin embargo los trastornos andrógenos dependientes no deben ser ignorados (17). Contrariamente, cuando dichos agentes son inyectados intratesticularmente estos causan atrofia testicular y una disminución de la espermatogénesis con una reducción notable en la concentración de andrógenos, esto podría disminuir los desórdenes andrógenos dependientes incluidos las enfermedades prostáticas, comportamiento indeseable (marcaje por orina, monta y agresión) y enfermedades gonadales (17).

Hasta el momento ningún producto satisface todas estas exigencias. Los primeros esfuerzos para encontrar químicos que causarían fibrosis en el testículo iniciaron con los criadores de cerdos cuyo objetivo principal era reducir el mal sabor en la carne de verracos adultos debido a la acción de hormonas andrógenas (18).

Para ello fueron probados nitrato de plata, formalina, etanol al 95% y quinacrina (11). En el caso de caninos existen una variedad de compuestos para dicho propósito que han sido probados, siendo los más relevantes el digluconato de clorhexidina al 3%, etanol, la formalina, cadmio, metilcianoacrilato, cloruro de calcio y gluconato de zinc (19).

Así tenemos que el metilcianocrilato fue probado en 15 perros mediante la inyección en la cola del epidídimo, observando azoospermia en 9 (60%) a los 15 días de aplicado el producto y en 13 (86,7%) a los 30 días. Un solo animal presento espermatozoides en el eyaculado a los 180 días con una alta proporción de muertos (40%) y anormales (60%). Al examen histológico se pudo observar fibrosis intersticial difusa con infiltración de células mononucleares y necrosis delimitada a la zona de aplicación (20).

El CaCl_2 fue probado en 21 caninos machos que recibieron una inyección intratesticular mostrando una disminución del tamaño testicular, azoospermia hasta 12 meses post

inyección, disminución en niveles de testosterona y desaparición del libido. Cabe mencionar que los niveles de testosterona regresaron a la normalidad al año de estudio (4). Otro estudio realizado en 30 animales evaluó la inyección intratesticular de cloruro de calcio a diferentes dosis por kilogramo mostrando una mayor reducción de tamaño testicular cuanto mayor fue la dosis aplicada. Bajo la histopatología se observaron cambios degenerativos en el parénquima testicular, pérdida de células germinales, atrofia de túbulos seminíferos. Hubo también una marcada disminución de la concentración espermática y disminución en los niveles séricos de testosterona siendo esta mayor en los perros que recibieron una mayor dosificación (1,4).

Por otro lado el Gluconato de zinc también a sido utilizado, la inyección intratesticular e intraepididimal del mismo con arginina ha demostrado mayor promesa que otros esterilizantes químicos. Esta conduce a la atrofia testicular, con una alta incidencia de esterilidad, las inyecciones intraepididimales también conducen a la esterilidad causando solamente reacciones inflamatorias leves. Aunque la eficacia puede ser más alta que otros métodos, esta técnica todavía no se ha logrado usar en forma rutinaria (21,22).

2.4. Técnicas de esterilización en machos

Los perros presentan características reproductivas muy particulares, siendo a su vez muy prolíficos. Se estima que existen más de 400 millones de perros en el mundo. Los problemas que ello conllevan sobre la salud humana son el riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas, un aumento de casos de mordeduras por parte de perros callejeros, así como la contaminación de las calles con heces de estos animales (23). Para la solución de esta problemática existen medios como la creación de sociedades protectoras, la adopción, la esterilización por medios quirúrgicos, los que requieren personal capacitado y son de mayor costo y poco prácticos con un sin número de posibles complicaciones, y la esterilización química; métodos de los cuales hablaremos a continuación (23,24).

La castración se realiza con frecuencia para anular sexualmente o para modificar o eliminar patrones de conducta característicos de machos, el vagabundeo y el comportamiento miccional indeseable (24). La neoplasia, traumatismos graves y la orquitis/epididimitis refractarias son indicaciones médicas primarias para realizar la orquiectomía. Este procedimiento elimina las fuentes endógenas de hormonas androgénicas que pueden ser las mediadoras de una hipertrofia prostática benigna, adenoma perianal y hernia perianal (25).

A continuación se describen las diversas técnicas de castración en caninos machos:

2.4.1. Orquiectomía

Este procedimiento se realiza bajo anestesia general. Puede emplearse el acceso preescrotal o perineal. El abordaje preescrotal es más común y con menor dificultades. Los testículos son más difíciles de exteriorizar con el acceso perineal (26).

2.4.2. Castración pre-escrotal abierta

Este método es recomendado en perros de más de 20 kg de peso (28). Colocar al paciente decúbito dorsal. Verificar la presencia de ambos testículos en el escroto. Rasurar y prepara en forma aséptica el abdomen caudal y medial de los muslos. Evitar la irritación escrotal con la rasuradora o los antisépticos. Colocar los paños de campo, aplicar presión sobre el escroto para avanzar un testículo lo más lejos posible dentro del área preescrotal (26). Se incide la piel y el tejido subcutáneo en la línea media ventral del prepucio y se continúa la incisión a través de la fascia espermática para exteriorizar el testículo. Se expone el testículo cubierto por su túnica vaginal. Colocar una hemostática a través de la túnica vaginal donde se une con el epidídimo. Separar digitalmente el ligamento de la cola del epidídimo desde la túnica mientras se aplica tracción con la hemostática sobre la túnica. Exteriorizar adicionalmente el testículo mediante la aplicación de tracción caudal y hacia afuera. Identificar las estructuras del cordón espermiático. Ligar en forma individual los cordones vasculares y conducto

deferente, luego incluirlos en una ligadura que los encierre con material de absorción lenta y se seccionan (26). Las ventajas del método abierto son las ligaduras vasculares que se hacen en forma directa y son más seguras. Las desventajas son el abordaje a una parte extensa de la cavidad peritoneal y un mayor tiempo quirúrgico. Inspeccionar el cordón espermático por hemorragia y recolocar dentro de la túnica. (Anexo 2).

2.4.3. Castración pre-escrotal cerrada

Esta técnica se utiliza en pacientes de menos de 20 kg. Cerrada significa que el contenido del cordón espermático será pinzado en tres puntos, ligado y seccionado con el proceso vaginal intacto a su alrededor. Exteriorizar al máximo el cordón espermático reflejando la grasa y fascia desde la túnica parietal con una torunda. Aplicar tracción sobre el testículo mientras se desgarran las inserciones fibrosas entre la túnica del cordón espermático y escroto. Colocar ligaduras en masa alrededor del cordón espermático y tunicas. Pasar la aguja a través del músculo cremaster si se desea una ligadura de transfixión. Al colocar esta ligadura se debe tener cuidado de no atravesar el paquete vascular del cordón. Después de seccionar el cordón espermático, ya sea mediante la técnica abierta o cerrada, la porción remanente se reintroduce dentro del tejido subcutáneo bajo control directo de la pinza. Es importante controlar el cordón durante este paso porque los vasos se acortan y dilatan a medida que se libera la tensión y puede además zafarse alguna de las ligaduras. Si se presenta un foco hemorrágico, el cordón o los vasos pueden ser inmediatamente expuestos para un control más adecuado si se los sujeta con la pinza. Después de inspeccionar toda el área se realiza la síntesis subcutánea profunda y superficial y la subdermis cutánea, utilizando material absorbible y puntos simples con los nudos escondidos o con un patrón continuo. Afrontar el tegumento con patrón de sutura intradérmica, subcuticular o interrumpida simple (26).

2.4.4. Castración perineal

La castración perineal se realiza utilizando las mismas técnicas que para la castración preescrotal abierta. Es más difícil desplazar los testículos hacia una incisión caudal que

a otra preescrotal. Debe usarse una técnica abierta., para ello se realiza una incisión en la piel y el tejido subcutáneo de la línea media en dorsal del escroto a nivel perineal por debajo del ano. Luego de eso avanzar el testículo hacia la incisión y seccionar la fascia y túnica espermatóicas. Exteriorizar el testículo y ligar el cordón espermatóico como se describiera para la castración preescrotal abierta (26).

2.4.5. Vasectomía

La vasectomía inhibe la fertilidad masculina mientras mantiene los patrones conductuales del macho. Los andrógenos continúan elaborándose porque las células de Leydig no se alteran de modo significativo. La técnica rara vez se recomienda porque el vagabundeo, agresividad y marcación urinaria persisten mientras que no ocurre una reducción de las enfermedades con mediación hormonal. Los espermatozoides persisten en el eyaculado canino durante tres semanas (16,26).

Para esta intervención quirúrgica se requiere de un rasurado meticuloso del escroto y región adyacente, así como la aplicación de productos antisépticos para preparar adecuadamente el campo quirúrgico. Es necesaria la anestesia general del paciente. Aunque están descritas varias formas de abordar los conductos deferentes quizás la más cómoda sea hacer una incisión independiente para cada uno de los dos, en la parte craneolateral del escroto.

Efectuar una incisión de 1 a 2cm sobre el cordón espermatóico entre el escroto y el anillo inguinal. Localizar el cordón espermatóico, incidir la túnica vaginal y aislar el conducto deferente mediante disección roma. Hacer doble ligadura del conducto deferente y reseca una sección de 0,5cm del mismo entre las ligaduras. Repetir el procedimiento sobre el cordón espermatóico contralateral. Afrontar los tejidos subcutáneos y el tegumento (Anexo 3).

Dado que en esta técnica no se extirpa una porción del conducto deferente, sino que sólo se secciona, existe la posibilidad remota de que se produzca una recanalización del mismo, volviendo a ser fértil el paciente. Por otra parte, puesto que en la parte final del conducto deferente quedan espermatozoides, existe un periodo de tiempo después de la vasectomía en que el paciente sigue siendo fértil, hasta que estos espermatozoides envejecen. Por ello, deberá evitarse el apareamiento durante este período (27).

2.5. Niveles séricos de testosterona

2.5.1. Testosterona biosíntesis transporte y metabolismo

La testosterona es una hormona esteroidea formada del colesterol captado de la sangre en forma de lipoproteínas de baja densidad (27,28) por endocitosis y liberado al citosol por degradación lisosómica (28). La principal fuente de testosterona desde la pubertad hasta la adultez es el testículo (95%) y el 5% restante corresponde a la secreción adrenal (29).

El colesterol luego de ser captado es transferido dentro de la mitocondria, facilitado por la proteína esteroideogénica reguladora aguda (StAR) (30), donde es convertido a pregnenolona por el sistema enzimático fragmentador de la cadena lateral. Luego la pregnenolona es transportada al retículo endoplásmico liso, en donde puede seguir dos vías enzimáticas de síntesis: por una vía la pregnenolona es convertida a progesterona por la 3-hidroxi-esteroide deshidrogenasa/isómera, ésta a 17- hidroxiprogesterona por la 17-hidroxilasa, ésta a androstenediona por la C17-C20 liasa y por último a testosterona por la hidroesteroide deshidrogenasa; en la segunda vía la pregnenolona es convertida en 17-hidroxipregnenolona por la 17-hidroxilasa, ésta a dehidroepiandosterona por una liasa, ésta a androstenediona y por la 3-hidroxiesteroide isomerasa y ésta a testosterona por la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Dependiendo de la especie, existe una mayor o menor preferencia por una u otra vía de síntesis, y pueden existir cruces o intersecciones en ambas vías a distintos niveles (28).

La testosterona es secretada por difusión y es transportada a la sangre, linfa y lumen tubular (31). Al cuerpo es llevado principalmente a través de la sangre (27). La alta concentración intratesticular (50 a 100 veces mayor que la concentración del suero sanguíneo) (32), resulta de la transferencia de la testosterona de la sangre venosa testicular a la arteria testicular por el plexo pampiniforme (33), y directamente por la proteína ABP desde los espacios intercelulares al lumen tubular (34).

En la sangre, la testosterona es distribuida o transportada uniéndose a proteínas captadas extracelularmente, como puede ser por una alfa globina de unión para esteroides (32,35) y/o por la albúmina sérica que mediante una unión débil y reversible transporta a la testosterona por un tiempo de 15 a 30 minutos antes que se fije a los tejidos. Aproximadamente el 98% de la testosterona está unida y la restante se encuentra libre para entrar a la célula blanca, en donde puede ser convertida a dihidrotestosterona por la 5-reductasa o a 17-estradiol por aromatización (33,35).

La testosterona no es almacenada en el organismo, bien se la consume o se la degrada y excreta en formas inactivas (36). La testosterona es primariamente metabolizada en el hígado, en el cual por oxidación se transforma en androstenediona la cual se transforma en androsterona, epiandrosterona y androsterona excretándose al intestino con la bilis o eliminándose con las heces, y al conjugarse estos metabolitos con el ácido glucorónico o ácido sulfúrico, se excretan en la orina bajo la forma de sales solubles en agua (36,31). Sin embargo, el catabolismo de los andrógenos también ocurre en los riñones, corteza adrenal, testículos y otros tejidos (37,28).

2.5.2. Utilidad clínica

Las medidas de la testosterona son útiles en la evaluación de estados hipogonadales (38,39). Entre las causas comunes de descenso de testosterona en machos se

incluyen: el hipogonadismo, la orquiectomía, terapia con estrógenos, el síndrome de Klinefelter, el hipopituitarismo, la feminización testicular y cirrosis hepática.

2.5.3. Métodos actuales para determinación de testosterona

Existen numerosos métodos asequibles para la cuantificación de testosterona en suero. Las técnicas utilizadas para estimar la concentración de testosterona en suero/plasma se dividen en siete categorías principales:

- a. Cromatografía de gases/espectroscopía de masas (40).
- b. Espectrometría de masas por dilución de isótopos
- c. Cromatografía en capa
- d. Cromatografía de líquidos de alta resolución (41).
- e. Inmunoanálisis ligados a enzima
- f. Radioinmunoanálisis

El desarrollo desde los años 60 de radioinmunoanálisis extremadamente sensibles y específicos (RIA) revolucionó la cuantificación de los esteroides. Debido a su velocidad, simplicidad y relativamente bajo costo era un método bastante utilizado. Esta tendencia fue reforzada por la disponibilidad de equipo reactivos comerciales fiables y convenientes (42). En los RIA, se hace reaccionar una cantidad limitada de un anticuerpo específico con la hormona. La testosterona marcada con ^{125}I compete durante un tiempo fijo con la testosterona en una muestra del paciente. Tras la separación de la hormona libre de la unida, se cuantifica la cantidad de radiactividad de la fracción unida y se utiliza para construir una curva patrón frente a la cual se miden las muestras desconocidas (42).

El radioinmunoensayo desarrollado en 1959 por Yalow y Berson, es el precursor de los ensayos inmunoenzimáticos que fueron descritos originalmente en 1971 por Engvall y Perlmann, y Van Wemen y Schuurs, sin embargo tenían ciertas desventajas como el uso de protección radiológica, eliminar desechos radiactivos que contaminan el medio

ambiente y que los reactivos marcados usados tienen vidas medias cortas, todo esto popularizó el empleo del inmunoensayo enzimático (EIA), del que hay dos técnicas principales: el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y el ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT) (43,44).

Fueron Eva Engwall y Peter Perlmann quienes le dan el nombre de Enzyme Linked Immunosorbent assay que luego sería abreviado como Elisa (43). El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Elisa) utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo (45).

Existen diversas variaciones al método de Elisa para detectar y cuantificar el alto peso molecular (>30 000 daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Casi todas las pruebas Elisa son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido (46,43). Algunos de los protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo, pero en todas las pruebas Elisa se requiere de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Para lo cual se añade sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato. Por sus características catalíticas las enzimas son marcadores muy sensibles y versátiles. Una sola proteína enzimática puede transformar en algunos minutos gran número de moléculas de sustrato en una cantidad igualmente abundante de producto final, produciendo un cambio de color amplificado y que se detecta con facilidad (43).

La prueba Elisa: se basa en varias teorías: 1)El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica;

2) las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando; 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento; y 4) las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar (43,47).

Los anticuerpos utilizados en el método Elisa son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y por último reaccionan con determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario) según el protocolo de análisis. Por otro lado, los antígenos se purifican o se producen con tecnología recombinante, y al igual que los anticuerpos se utilizan como conjugados marcados o enzimáticos y son inmóviles o solubles, dependiendo del protocolo de análisis (43).

La prueba cuantitativa de testosterona se basa en un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el método de unión competitiva. Una muestra (suero / plasma / orina) que contiene una cantidad desconocida de testosterona (antígeno sin marcar) se añade a una cantidad estándar de un conjugado de testosterona (antígeno marcado). Los antígenos marcados y no marcados se dejan para competir por los sitios de unión de alta afinidad de los anticuerpos anti-testosterona ubicados sobre la placa. La reacción se lleva a cabo tras incubar durante 1 hora a 37° C, en este período se lleva a cabo una reacción bio-específica luego se procede a lavar el antígeno libre y agregar la solución de sustrato TMB y se incuba durante 20 minutos, para luego determinar las absorbancias utilizando un lector de placas Elisa. La cantidad de antígeno marcado en la muestra es reversiblemente proporcional a la concentración del antígeno sin marcar. A medida que la concentración aumenta en la muestra la intensidad del color disminuye proporcionalmente (44).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Espacio y tiempo

La siguiente investigación se realizó en la veterinaria Pet's House Cusco ubicado en el distrito de Wanchaq, entre los meses de Septiembre del 2016 hasta Febrero del 2017.

3.2. Población y muestra

Se utilizaron 7 caninos machos enteros, entre 1-10 años, los cuales previamente pasaron por un examen físico completo, dentro del cual estará incluida la palpación testicular. Para la selección de estos animales, no se tomó en cuenta la raza ni tamaño, solo se consideró animales que presenten tamaño testicular no menor de 10mm. Se manejó como factor de descarte la presencia de criptorquidismo unilateral o bilateral, presencia de enfermedad o malformación en los testículos (incluyendo fibrosis, inflamación de los testículos o alguna reacción adversa al componente de la fórmula, dermatitis escrotal preexistente o irritación).

El estudio se basó en la toma de medidas testiculares, muestras de suero y la histopatología de los testículos recolectados de caninos en el distrito de Wanchaq departamento del Cusco. El procesamiento del examen serológico se realizó en el departamento de Lima, con la ayuda y participación de un laboratorio veterinario; y la histopatología fue estudiada en el país de EEUU en The Johns Hopkins University School of Medicine in Baltimore por una Patóloga Veterinaria.

3.3. Diseño experimental

El muestreo utilizado fue no Probabilístico, por conveniencia.

Cuasi experimental

3.4. Equipos y materiales

Equipos de escritorio

- Laptop
- Celular (cámara/cronometro)
- Escritorio

Equipo de laboratorio

- Vernier
- Centrifuga
- Kit de Elisa

Materiales de escritorio

- Hojas bond A4
- Lapiceros.
- Regla.
- Corrector.
- Resaltador.
- Historias clínicas (copias).
- Documentos de compromiso de permitir las pruebas(copias)
- Engrapador.
- Grapas.
- Folders con fasters.
- Archivador.
- Cinta maskingtape

Materiales de laboratorio

- Tubos vacutainer

- Viales
- Ligadura para hemostasia
- Cateter

Insumos (Anexo 4)

- Dexmedetomidina
- Atipamezole (antisedan)
- Ketoprofeno
- Cefalexina
- Cloruro de Calcio al 20%
- Alcohol a 95%
- Clorhexidina
- Algodón
- Agua Oxigenada
- Gasas
- Guantes
- Jeringas
- Aguja.

Servicios

- Luz
- Internet
- Honorarios del asesor
- Honorarios del investigador

3.5. Procedimiento

Se inició con el proceso de selección de especímenes, considerando las características idóneas mencionadas anteriormente, luego se procedió a llenar la ficha de datos previa autorización firmada por los propietarios (Anexo 5) de los especímenes. Se procedió a la colocación de catéter para la extracción de sangre de la vena cefálica para medición

de testosterona en suero basal (día 0), y para la sedación superficial, con la finalidad de obtener la inmovilización del paciente facilitando el manejo adecuado; Se colocó al perro en posición dorsoventral tanto para la toma de medidas de los testículos como para la colocación de la inyección intratesticular. La dosis se calculó midiendo el ancho de cada testículo (en su porción más ancha), con un calibrador tipo vernier, según la tabla de dosificación preestablecida (48) (Anexo 6 y 7). Seguidamente se limpió la región escrotal con solución de clorhexidina diluida (Anexo 8).

Para la inyección del CaCl_2 en cada testículo, se utilizó jeringas de 1 y 3 ml con agujas de calibres 18x1 $\frac{1}{2}$ " ó 21x1". Con la finalidad de evitar cualquier tipo de residuo de CaCl_2 en el escroto, ya que el residuo en la aguja podría causar un absceso (Anexo 9). Se utilizó una aguja diferente para extraer el fármaco de su envase y se colocó una aguja nueva y estéril en la jeringa antes de inyectar en cada testículo. Se tuvo en consideración el extraer la máxima dosis correcta para cada testículo y adicionalmente 0.2 ml ya que es requerida en algunas ocasiones Según Haney W. Según la percepción del operario. además se preparó dos jeringas separadas (una para cada testículo).

Se procedió a inyectar en la cabeza del epidídimo para una mejor sujeción del testículo, en el eje longitudinal hacia el centro del mismo, inoculando la solución de CaCl_2 lentamente (60 segundos por cada testículo) para permitir que la presión se iguale y no haya fugas del producto. Una de las consideraciones importantes que se tomó en cuenta, fue sostener el testículo para sentir la expansión sin hacer presión. Se inyectó el volumen necesario (Anexo 7) de acuerdo al tamaño testicular, hasta percibir una sensación turgente y luego se mantuvo la jeringa en posición durante varios segundos antes de retirar lentamente la aguja fuera del testículo y con la otra mano se hizo presión digital para evitar fugas indeseadas. Los testículos se sintieron firmes, pero no sólidos como roca. Se inyectó perpendicularmente al testículo y no en ángulo (Anexo 10).

En perros con testículos más largos se utilizó la aguja de longitud más larga para que al inyectar el producto quede al centro del testículo y así evitar daños tisulares. Por último, para retirar la aguja se presionó suavemente el testículo por donde ingreso la aguja, durante 5 a 10 segundos para asegurar el retiro seguro de la aguja, de esta manera evitamos la liberación de cualquier cantidad de CaCl_2 en el escroto. Se retiró la aguja lentamente para asegurar que el cloruro de calcio se mantenga en el centro del testículo. Se tuvo en consideración la programación de las citas de los especímenes en investigación y se realizó las mediciones testiculares en los tiempos estipulados (día 30, día 60 y día 180). Después de 180 días se realizó la castración quirúrgica para la evaluación histopatológica, considerando la última medición testicular y toma de muestra sanguínea para la medición de testosterona final que se analizó en un laboratorio veterinario mediante el método de ELISA.

3.6. Diseño estadístico

Para el análisis de datos se utilizó, la prueba *t* student para comparación de parejas en los niveles séricos de testosterona; con los datos que se obtuvo de las mediciones de tamaño testicular se realizó la regresión lineal y la descripción histopatología para determinar la atrofia testicular.

IV. RESULTADOS

Este estudio se realizó con 7 caninos machos enteros de diferentes edades entre 1 y 10 años cuyo promedio de edad fue de 3,5 años en el distrito de Wanchaq; ubicado a 8 km de la Plaza de Armas de Cusco, perteneciente a la provincia de Cusco, departamento de Cusco. Los caninos se encontraban aparentemente sanos a la evaluación clínica y no se tomó en cuenta la raza y tamaño para dicho estudio (Anexo 11).

De los animales incluidos en este estudio solo dos de ellos (3,5%) evidenció inflamación en la región escrotal (Anexo 12), luego de la inoculación, con señales de lamido y autotraumatismo; de las cuales 1 de ellos llegó a un punto de necrosis que tuvo que ser solucionado mediante la castración quirúrgica (este fue retirado del trabajo de investigación) (Anexo 13) y el otro se solucionó colocándole un collar isabelino y la herida cerró por sí sola en 30 días.

4.1. Evaluación de la variable tamaño testicular derecho

Se obtuvo una media de 18.9 mm (IC 95% 15.0 – 24.0) al inicio del estudio, a los treinta días posteriores a la inoculación el promedio obtenido fue de 15. mm (IC 95% 12.0–23.0), a los noventa días posteriores a la inoculación fue 13.1 mm (IC 95% 10.0-22.0), a los ciento ochenta días posteriores a la inoculación fue 11.1 mm (IC 95% 8.0-20.0) existiendo una diferencia entre tiempos como se observa en la Tabla 1. (Anexo 14).

Tabla 1. Tamaño testicular derecho según tiempo pos inoculación.

| Paciente | Testículo Derecho (mm) | | | |
|----------------|------------------------|---------|---------|----------|
| | 0 días | 30 días | 90 días | 180 días |
| Gringo | 24 | 19 | 15 | 13 |
| Rex | 18 | 14 | 13 | 12 |
| Cybor | 24 | 23 | 22 | 20 |
| Nicky | 19 | 15 | 11 | 9 |
| Clavo | 16 | 14 | 10 | 8 |
| Charlie | 16 | 13 | 11 | 8 |
| Doggy | 15 | 12 | 10 | 8 |
| \bar{X} | 18,9 | 15,7 | 13,1 | 11,1 |

r= 0,95
r²=0,90

4.2. Evaluación de la variable tamaño testicular izquierdo

El efecto de la inyección de Cloruro de calcio en el tiempo sobre el tamaño testicular izquierdo se observó que el testículo izquierdo presentaba una media de 18.9 mm (IC 95% 14.0 – 25.0) al inicio del estudio, a los treinta días posteriores a la inoculación fue de 15.6 mm (IC 95% 12.0–21), a los noventa días posteriores a la inoculación fue de 13.4 mm (ICC 95% 09-20) y a los ciento ochenta días posteriores a la inoculación fue de 11 mm (IC 95% 07-14.0) existiendo una diferencia entre tiempos como se observa en la Tabla 2 (Anexo 15).

Tabla 2. Tamaño testicular izquierdo según tiempo pos inoculación.

| Paciente | Testículo Izquierdo (mm) | | | |
|----------------|--------------------------|---------|---------|----------|
| | 0 días | 30 días | 90 días | 180 días |
| Gringo | 25 | 20 | 17 | 14 |
| Rex | 18 | 14 | 12 | 10 |
| Cybor | 22 | 21 | 20 | 18 |
| Nicky | 19 | 15 | 12 | 10 |
| Clavo | 18 | 14 | 13 | 10 |
| Charlie | 15 | 13 | 11 | 8 |
| Doggy | 14 | 12 | 9 | 7 |
| \bar{X} | 18,7 | 15,6 | 13,4 | 11,0 |

r= 0,95
r²=0,92

En resumen podemos observar que hay una disminución en el tamaño testicular en los tiempos mencionados; en el testículo derecho de 18.9 mm a 11.1 mm y en el testículo izquierdo de 18.7 mm a 11 mm. Obteniendo un promedio total de 18.8 mm en el día 0 y 11.1 mm al finalizar la investigación. (Anexo 16 y 17).

Tabla 3. Resumen de promedios obtenidos en la medición de ambos testículos pos inoculación.

| Testículo | Promedio testicular (mm) | | | |
|------------------|--------------------------|---------|---------|----------|
| | 0 días | 30 días | 90 días | 180 días |
| Derecho | 18,9 | 15,7 | 13,1 | 11,1 |
| Izquierdo | 18,7 | 15,6 | 13,4 | 11,0 |
| \bar{X} | 18,8 | 15,7 | 13,3 | 11,1 |

4.3. Evaluación de la variable niveles séricos de testosterona

Se evaluó también los niveles séricos de testosterona en dos momentos establecidos (inicio y final) y se pudo observar que también se produjo una disminución mostrando al inicio del estudio una media de 3.9 ng/ml (IC 95% 2.5 – 7.6), y a los ciento ochenta días posteriores a la inoculación fue de 1.3 ng/ml (IC 95% 0.16–4.0), existiendo una diferencia significativa entre tiempos ($P < 0.005$) (Anexo 18).

Tabla 4. Medidas de testosterona según pacientes pre y pos inoculación.

| Paciente | Testosterona (ng/ml) | |
|----------------|----------------------|-------|
| | Inicio | Final |
| Gringo | 2,5 | 0,8 |
| Rex | 3,9 | 1,7 |
| Cybor | 7,6 | 4,0 |
| Nicky | 2,8 | 0,2 |
| Clavo | 4,0 | 1,0 |
| Charlie | 3,8 | 0,9 |
| Doggy | 2,9 | 0,4 |
| \bar{X} | 3,9 | 1,3 |

($P < 0.005$)

4.4. Evaluación de la variable histopatología testiculares

A los ciento ochenta días se realizó la castración quirúrgica con el objeto de evaluar histopatológicamente cada testículo (derecho e izquierdo). (Anexo 19)

Paciente "Gringo"

Muestra 1: Epidídimo y testículos con inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal severa y con túbulos seminíferos sin esperma .

Muestra 2: Epidídimo y testículos con inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal severa y con túbulos seminíferos sin esperma .

Paciente "Rex"

Muestra 1: Testículos con inflamación linfocitaria, fibrosis, necrosis, mineralización multifocal, túbulos seminíferos sin esperma, ausencia de espermatozoides, presencia del Epidídimo sin esperma.

Muestra 2: Testículos con inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal, túbulos seminíferos sin espermatozoides, Presencia del Epidídimo sin esperma.

Paciente "Nicky"

Muestra 1: Epidídimo y testículos con inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal y túbulos seminíferos necróticos con ausencia de espermatozoides.

Muestra 2: Epidídimo y testículos con inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal severa con túbulos seminíferos necróticos y sin esperma.

Paciente "Clavo"

Muestra 1: Pequeña muestra de epidídimo, fibrosis, pequeños focos de histiocitos y severa necrosis, sin esperma presente.

Muestra 2: Pequeña muestra de epidídimo, fibrosis, pequeños focos de histiocitos y severa necrosis, sin esperma presente.

Paciente "Charlie"

Muestra 1: Epidídimo y testículos con ligera inflamación, tubulos seminíferos moderadamente degenerados, sin presencia de espermatozoides.

Muestra 2: Epidídimo y testículos con ligera inflamación, tubulos seminíferos

moderadamente degenerados, sin presencia de espermatozoides.

Paciente "Cybor"

Muestra 1: moderada fibrosis y mineralización de epidídimos, sin presencia de espermatozoides.

Muestra 2: moderada fibrosis y mineralización de epidídimos, sin presencia de espermatozoides.

Paciente "Doggy"

Muestra 1: severa necrosis en epidídimos, fibrosis y pequeños focos de histiocitos sin presencia de esperma.

Muestra 2: inflamación linfocitaria, fibrosis y mineralización multifocal severa, túbulos seminíferos sin presencia de esperma.

En resumen al examen histopatológico del tejido testicular mostró grandes áreas necróticas, fibróticas y mineralizadas con severa inflamación linfocitaria y con túbulos seminíferos degenerados sin presencia de esperma (Anexo 20 y 21).

IV. DISCUSIÓN

Según el estudio de investigación de Raffaella Leoci *et al* 2014, en el cual se trabajó con 50 perros machos, divididos en 5 grupos: uno control y cuatro experimentales, a los cuales se les inoculó soluciones intratesticulares en diferentes concentraciones de CaCl_2 utilizando la solución salina como medio dilutor, los parámetros medidos fueron recuento total de espermatozoides, volumen de semen, niveles séricos de testosterona disminuyendo 41,7% al 20% ($P < 0,006$) y circunferencia testicular disminuyendo significativamente en 50% para todos los grupos, encontrando similitud en los resultados obtenidos en la presente investigación, con referencia a los valores de niveles séricos de testosterona disminuyendo 66,6% al 20% ($P < 0,005$) y tamaño testicular disminuyendo significativamente en 41% por lo cual se concreta que el CaCl_2 al 20% diluido en alcohol si es efectivo para el uso de castración química. Pero se debe recalcar que Leoci *et al* sugiere utilizar otros dilutores como alcohol, debido a que después de 12 meses los niveles séricos de testosterona comenzaron a subir con un dilutor de solución salina.

En el presente trabajo de investigación a la histopatología se encontró una inflamación linfocitaria con túbulos seminíferos degenerados, fibróticos con focos de mineralización y sin presencia de células espermáticas dando como consecuencia una disminución significativa de testosterona del 66,6% ($P < 0,005$) lo cual podemos contrastar con una serie de estudios tales como: Billy C. 2015 donde afirma la obtención de respuesta inflamatoria con la mineralización, fibrosis y degeneración tubular y los epidídimos mostraron similares resultados como inflamación, mineralización y la fibroplasia. Estos cambios pueden deberse a las propiedades del CaCl_2 tales como: ser necrotizantes, generadores de radicales libres, que ha sido estrechamente asociados a la infiltración de leucocitos y que a la vez inhiben la espermatogénesis y androgénesis testicular conllevando a la disminución de

concentraciones séricas de testosterona según Kuladip y Prabhat, 2011 así como en otro estudio de Leoci R. *Et al*, 2014 por la Fundación Parsemus donde también obtuvieron resultados similares con disminución de testosterona 70% en 6 meses y disminución en el tamaño testicular buscando la concentración ideal y llegando a la conclusión que la mejor concentración es al 20% de CaCl_2 , concentración utilizada para esta investigación. por lo tanto se puede concluir que el CaCl_2 al 20% diluido en alcohol al 95% produce atrofia testicular y que estos cambios a nivel del testículo produce una disminución en los niveles séricos de testosterona. En el estudio con Raffaella Leoci *et al* 2014. Se describe que altas concentraciones de CaCl_2 en el parénquima testicular induce a una reacción inflamatoria que es caracterizada por la presencia de neutrófilos, macrófagos y predominantemente linfocitos CD8 así como otros estudios previos mencionan que las células inflamatorias mostraron actividad fagocítica y citotóxica elevada después del tratamiento de CaCl_2 , por lo tanto se puede corroborar que la reacción inflamatoria observada en el presente trabajo de investigación es la responsable de las lesiones en el epitelio de los túbulos seminíferos, la muerte de las células germinativas y la presunta infertilidad. Billy Clay 2015 en su trabajo con cloruro de calcio menciona que la inyección de CaCl_2 resulta en la activación del sistema inmune dando respuesta a la ruptura de la barrera de las células de Sertoli y la inflamación localizada con la consecuente liberación de antígenos testiculares. Así mismo se observó la presencia de un tejido de cicatrización cerca al área de inyección del producto debido al incremento del depósito del colágeno intertubular generado por la presencia de fibroblastos activos lo que haría que el tejido se contraiga como en cualquier proceso de reparación tisular, resultando macroscópicamente una reducción el tamaño testicular tal como se pudo observar en el presente estudio. Los resultados obtenidos en este trabajo también se corroboran en lo publicado por Leoci *et al* en el 2014, Kuladip y Prabhat, 2011 donde especifica que el alcohol etílico es una sustancia química que causa la esclerosis testicular por lo tanto esto provoca un sinergismo en las características ya mencionadas del CaCl_2 ocasionando la castración química definitiva o irreversible durante los 6 meses de estudio siendo una alternativa de esterilización no quirúrgica para el control de sobrepoblación canina.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ El parámetro de tamaño testicular evaluado a los 30, 90 y 180 días post inyección intratesticular de CaCl_2 si tuvo una disminución significativa en el tiempo con respecto a los valores iniciales (0 días).
- ✓ El parámetro de nivel sérico de testosterona evaluado a los 180 días (post inyección intratesticular de CaCl_2) también disminuyó significativamente con respecto a los valores iniciales (0 días).
- ✓ Con una sola inyección bilateral intratesticular de CaCl_2 si logró la esterilización.
- ✓ En todos los tratamientos en el presente trabajo, se produjo atrofia testicular (necrosis y degeneración) a la histopatología por lo tanto se puede confirmar la castración química testicular.
- ✓ Se demostró que el método estudiado, es sencillo y rápido de realizar (no se requiere de mucho personal) no presenta dolor detectable y resulta rentable.
- ✓ Es vital mencionar que en el presente informe de investigación se concreta información obtenida en trabajos previos rescatando la concentración de CaCl_2 que presento mejores resultados, sumando la efectividad del alcohol al 95%, teniendo como puntos principales la difusión científica en nuestro territorio peruano, así mismo promover nuevas prácticas con procesos no invasivos por todas las bondades ya mencionadas y por ultimo ser de bajo costo.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Considerar un volumen adicional de 0.2 ml sobre la dosis recomendada ya que está comprobado que en ocasiones se necesitará inyectar este adicional para lograr la sensación de turgencia testicular, es claro mencionar que este es un valor subjetivo según la experiencia del operario.

- ✓ En el caso particular de observarse lesiones testiculares como ulceración en el escroto, no realizar tratamientos ya que este se resolverá espontáneamente en 30 días como máximo. Además recomendar explícitamente el uso de protectores como el collar isabelino.

- ✓ Se sugiere realizar otros estudios en los cuales las muestras sanguíneas sean seriadas durante el día, con un promedio de tres a seis tomas diarias para poder establecer de manera más certera el comportamiento de los niveles de testosterona en cada animal y evaluar la variación posterior a la inyección del Cloruro de Calcio.

- ✓ Recomendar y publicitar al medio veterinario el uso de este producto, considerando que está al alcance de todos, es altamente rentable y sobre todo impulsar su uso en la labor social.

- ✓ Difundir este procedimiento para poder controlar la sobrepoblación canina y así evitar enfermedades zoonóticas que atentan contra la salud pública.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Billy C. Castración con cloruro de calcio como funciona. [internet] 2015. [citado 20 de febrero 2016]. Disponible en: <http://www.spayfirst.org/wp-content/uploads/2015/09/Castracion-con-cloruro-de-calcio-como-funciona-Billy-Clay-MS-DVM-DIPLOMATE-American-Board-of-Veterinary-Toxicology.pdf>
2. Kuladip J, Prabhat K, S. Clinical Evaluation of Non-surgical Sterilization of Male Cats with Single Intra-testicular Injection of Calcium Chloride. Rev. BMC Veterinary Research [internet] 2011. [Citado 20 de marzo 2016]; 7:39. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/39>.
3. Koger LM. 1977. Calcium chloride castration. Practical Necrotizing Agent", Journal of the American Association of Bovine Practitioners (USA). 1 (12). 118–119.
4. Leoci R, Aiudi G, Silvestre F, et al. Acta Veterinaria Scandinavica. A dose-finding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. Rev. BMC Veterinary Research [internet] 2014. [Citado 25 de marzo 2016]. 56(63), 3-8 Disponible en: <http://www.actavetscand.com/content/56/1/63>.
5. Información Técnica y Comercial del Cloruro de calcio. Cosmos [internet] 2008. [citado 26 enero 2016]. Disponible en: <http://www.cosmos.com.mx/wiki/43px/cloruro-de-calcio>.
6. Calcium chloride. Wikipedia [internet] 2002. [citado 04 de Febrero 2016]. Disponible en: https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_chloride

7. Calcium Chloride Chemical Profile. The Innovation Group [internet]. 2005. [Citado 04 febrero del 2016]. Disponible en: www.the-innovation-group.com.
8. Calcium chloride. epilepsy treatment [internet] 2015. [citado 14 de mayo 2016] Disponible en: <https://www.drugs.com/pro/calcium-chloride.html>.
9. Joechle W. 2004. History of non-surgical contraception with drugs in dogs and cats. Second international symposium by ACC&D on non-surgical contraceptive control in cats and dogs; 144–9.
10. Concannon P, Meyers-Wallen V. 1991. Current and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*; 198: 1214–1225.
11. Fahim M, Wang M, Sutcu M, Fahim Z, Yougquist R. 1993. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*; 47:107–122.
12. Inaba T, Umehara T, Mori J, et al. 1996. Reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology*; 46: 671-677.
13. Junaidi A, Williamson P, Cummins J. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reprod. Fertil. Dev.* 2003.15. p.317-322.
14. Trigg T. Advances in use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *International Symposium on Canine and Feline Reproduction.* 2004. 5: 49- 51.

15. Concannon P, Meyers-Wallen V. 1991. Current and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*; 198:1214–1225.
16. Bertschinger H, Trigg T, Jöchle W. 2002. Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. *Reprod. Suppl*; 60: 41-52.
17. Pineda M, Reimers T, Faulkner L, Hopwood M, Seidel G. 1977. Azoospermia in dogs induced by injections of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *J Am Vet Res*; 38: 831-838.
18. Bloomberg M. 1996. Surgical neutering and non-surgical alternatives. *J Am Vet Med Assoc*; 208:517–519.
19. Farm Animal Welfare Education Centre. FAWEC. [Internet] 2005. [citado 05 marzo 2013]. Disponible en: <http://www.fawec.org>.
20. Galván M. 1994. Esterilización en el perro por inyección del metilcianoacrilato en la cola del epidídimo, *Rev Vet México*; 25 (3).
21. Leonard A, Gerber GB, Leonard F. 1987. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutat Res*; 168: 343–348.
22. Hidiroglou M, Knipfel JE. 1984. Zinc in mammalian sperm: a review. *J Dairy Sci*; 67:1147–1156.
23. Ortega Pacheco A, Rodríguez-Buenfil JC, Leal-Ortega J. 2000. Actividad estral de perros callejeros en la ciudad de Mérida y su relación con edad, tamaño y condición corporal. *Rev Biomed*; 11:107-112.

24. Anonimus. 1976. National Conference on Dog and Cat control: Summary and conclusions. JAVMA, 168: 1125-1134.
25. Fossum TW. Cirugía en pequeños animales, 3° ed. España: ElSevier; 2008. p 1631.
26. Bojrab JM. Técnicas actuales en cirugía de animales pequeños. 3°ed. España: Madrid: Intermédica; 2003. p 917.
27. Dooley MP, Pineda MH. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cats. Am. J. Vet. Res. 1984. 47:286-292.
28. Setchell BP. Spermatogenesis and spermatozoe. En: Austin y R.V. Short. Germ cells and fertilization. Reproduction in mammals. Gran Bretaña; C.R; 1977. p 63-101.
29. Illera M. Glándulas Adrenales. Testículo y Sistema Reproductor Masculino. Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción. 1994. España – Madrid. 146-183, 209-233.
30. Losno W, Coyotupa J. Influencia del macho sobre la progesterona y 17 bestadiol séricos de alpacas hembras en quietud sexual. En 8° Journal Peruana Endocrinol. 1977. Perú.
31. Hales DB, Payne AH. 2005. Testosterone inhibits cAMP-induced de Novo synthesis of Leydig cells cytochrome P-45017 α by an androgen receptor-mediated mechanism. J.Biol.Chem. 262(23): 11200-11206.
32. García A. Fisiología veterinaria. España: Madrid: Interamericana Mc Graw Hill; 1995. p 770.

33. Chastain CB, Ganjam VK. Clinical Endocrinology of companion animals. Philadelphia-Lea: Febiger. p 568.
34. Mc Donald LE. Reproducción y Endocrinología Veterinaria. México: Interamericana; 1991. p 201-234.
35. Lubos H. Bases biológicas de la reproducción Bovina. México: Diana; 1987. p 47-53.
36. Hafez ES. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez ES, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: MacGraw-Hill; 2002. p 441-452.
37. Moore JA, Kakuk TJ. Male dogs naturally infected with *Brucella canis*. Journal Amer. Vetjned. 1969. 155:1352-1358.
38. Hooker CW. The intertubular tissue of the testis. Z.mirk-anat. Forsch. 1965. 72: 462- 438.
39. Romagnoli SE. Canine cryptorchidism. Journal Vet. Clin. North Amer. Small Anim. Pract. 1991. 21:533- 544.
40. Knol BW, Dieleman SJ, Bevers MM, Van den brom WE. GnRH in the male dog: dose-response relationships with LH and testosterone. J. Reprod. Fert. 1993. 46: 159-161.
41. Sabot JF. Determination of plasma testosterone by mass fragmentography using [3,4- ¹³c] testosterone as an internal standard . Journal of chromatography. 1985. 339:233.

42. Ueshiba H, Segawa M, Hayashi T, Miyachi Y, Irie M. Serum profiles of steroid hormones in patients with Cushing's syndrome determined by a new HPLC/RIA method. *Clin Chem*. 1991. 37(8):1329-33.
43. Soto WG, Viana M, Hosomi V, et al. Evaluation of Efficacy and Safety of Zinc Gluconate Associated with Dimethyl Sulphoxide for Sexually Mature Canine Males Chemical Neutering. *Journal compilation*. 2009. 44: 927-931.
44. Guzmán E. Las pruebas de Elisa. México; *Gaceta Médica*. 2004. 140 (3) 48-49.
45. Raichle TL, Paranto ME. Modern blood banking and transfusión practices. Philadelphia: FA Davis; 1994. p.256-75.
46. Sino Biological Inc. [Internet]. 2007. [citado 23 de Agosto del 2013]. Disponible en: <http://www.sinobiological.com>.
47. Crowther John R. The Elisa Guidebook. 2° ed. New York: EEUU: Humana Press; 2009. p 562.
48. Haney W. Fundacion Parsemus. Spayfirst.[internet].2016.[Citado 20 Enero del 2016]. Disponible en: <http://www.spayfirst.org/wp-content/uploads/2014/11/CaCl-formulation-and-dosing-chart-En-Espanol.pdf>.

ANEXOS

Anexo 1

CUADRO 1. Resumen de antecedentes sobre investigaciones de CaCl₂ en diversas especies.

| PRINCIPIO ACTIVO | TAMAÑO MUESTRAL | RESULTADOS | REFERENCIA |
|-------------------|---|--|--------------------------------|
| CaCl ₂ | 14 caninos (3-30 días post inyección) | Mineralización, fibrosis y degeneración de tubulos y epidídimo. | Billy Clay et. Al 2015 |
| CaCl ₂ | 18 gatos (60 días) evaluación de concentración de dosis 5 %, 10%, 20% | Degeneración y fibrosis, disminución en el conteo de esperma, disminución de testosterona al 20% | Kuladip D., Prabhnmt K.S. 2011 |
| CaCl ₂ | 300 toros | Resultados exitosos | Koger LM 1977 |
| CaCl ₂ | 1 toro Holstein (60 días) | Atrofia y fibrosis | Koger LM 1977 |
| CaCl ₂ | 1 Canino (60 días) | Atrofia con un pequeño remanente de testículo. | Koger LM 1977 |
| CaCl ₂ | 1 canino (3 meses) | Disminuyo 2 cm de la circunferencia testicular y se elimino el comportamiento de marcado. | Koger LM 1977 |
| CaCl ₂ | 50 perros (1 año) evaluación de la mejor concentacion 0%, 10%, 20%, 30% y 60% | La mejor concentración fue al 20 % | Leoci R. <i>Et al</i> 2011. |

Fuente: Elaboración propia, 2016

Anexo 2

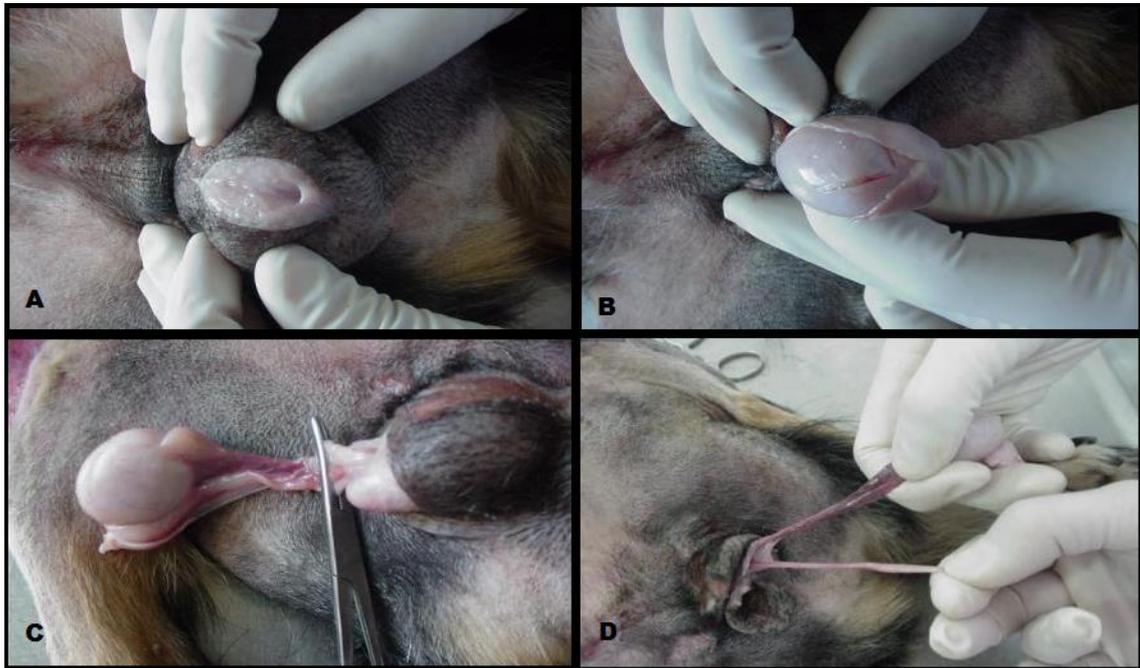


Imagen 1. Castración pre-escrotal abierta: procedimiento. A. Incisión cutánea; B. Exteriorización del testículo. Apertura de túnica vaginal parietal.; C. Se muestra testículo y cordón espermático; D. Se aísla el conducto deferente.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Anexo 3

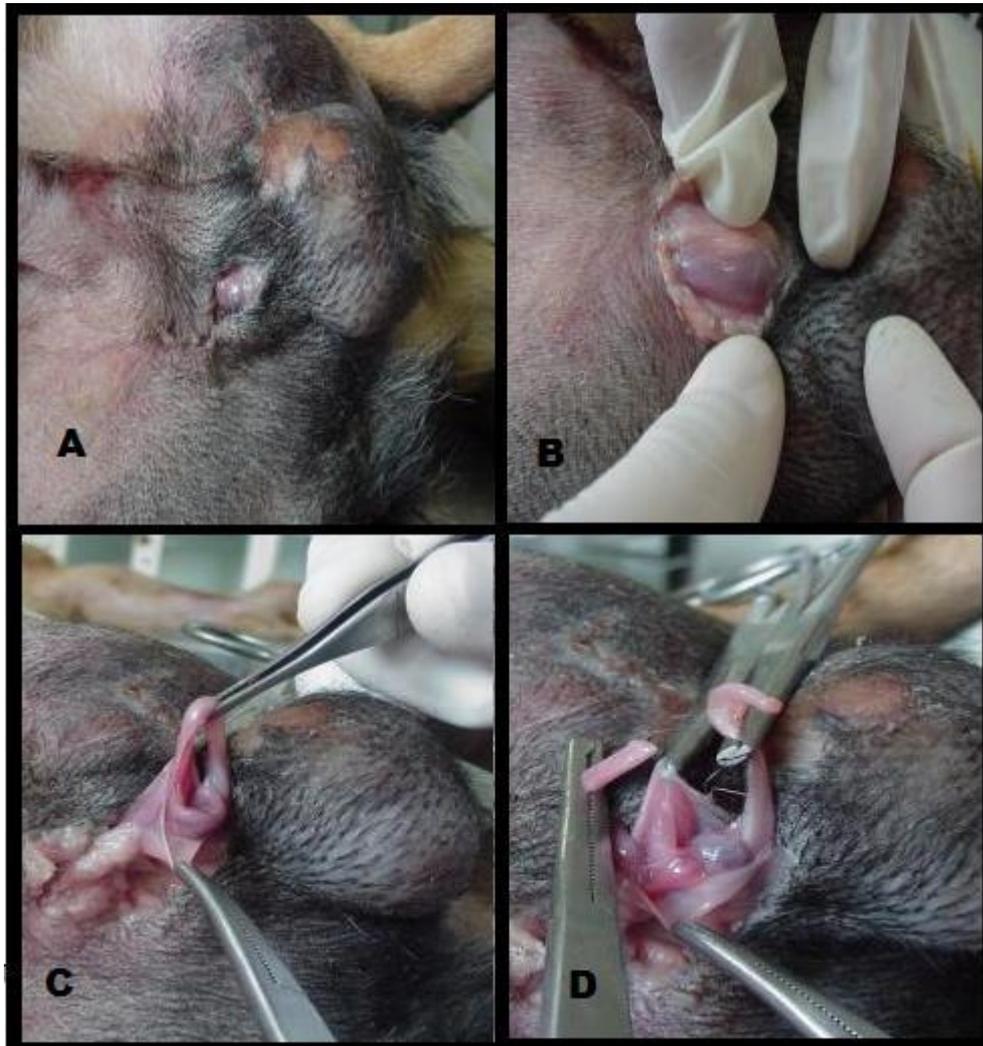


Imagen 2. Vasectomía: procedimiento. A. Incisión cutánea; B. Cordón espermático; C. Se aísla el conducto deferente del cordón espermático, D. Se secciona el conducto deferente y se ligan los extremos.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Anexo 4



Imagen 3. Materiales e insumos utilizados en el procedimiento.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Anexo 5

FORMATO 1. Ficha de autorización y compromiso de los propietarios.

Ficha N° 02

ACTA DE AUTORIZACION PARA CASTRACION QUÍMICA

Yo, **PAOLA BOJA NOVICV**, identificado(a) con DNI N°: **44861937**. Domiciliado(a) en **URB. SANTA BEATRIZ B5 WUANCHAQ**. Fono/Cel.: **988608998**.

Mayor de edad: si...X. / no.....

SOY PROPIETARIO DE LA MASCOTA:

| | | | |
|---------|------------|-------|-----------------|
| NOMBRE: | REX | RAZA: | SHIT-ZUT |
| PESO: | 8 K | EDAD: | 7 AÑOS. |

DECLARO: Estar completamente informado de los siguientes riesgos y obligaciones:

1. Deberá traer en ayuno por lo menos 12 hs para la sedación superficial
2. La mascota tendrá inflamación en los testículos por algunos días (max. 10 días) post inyección.
3. La mascota no debe lamerse los testículos con mucha frecuencia después de la inyección, si sucediera comunicar con el veterinario.
4. El propietario se compromete a traer a su mascota en los siguientes días para la evaluación del mismo (0 días, 30 días, 90 días y 180 días).
5. La intervención quirúrgica al final del proceso (180 días) precisa de anestesia general por lo cual el paciente debe venir en ayuno por lo menos 12 hs antes.
6. Me comunicaron y explicaron todos los riesgos e implicancias de una anestesia general.
7. Toda intervención quirúrgica, tanto por la técnica operatoria como por la situación vital de cada animal a tratar lleva implícitas comunes y potencialmente serias complicaciones que podrían requerir tratamientos complementarios, tanto médicos como quirúrgicos, así como un porcentaje de mortalidad.
8. Los honorarios de la intervención han sido estipulados en la suma de S/ 00.00 importe que quien firma al pie declara aceptar.
9. Sobre el presente consentimiento no hay medida causal de nulidad o anulabilidad que pudiera invalidarlo, por lo que expreso mi conformidad con la firma puesta al final del presente documento.

Por las consideraciones expuestas: **CONSIENTO Y MANIFIESTO MI CONFORMIDAD** para que se le realice a mi mascota la castración química.

Cusco, 16 de noviembre de 2016.



Firma del Propietario



Huella Digital

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Anexo 6

Imagen 4. Medición de tamaño testicular con el uso del Vernier.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Anexo 7

TABLA 1. Tabla de dosificación de Cloruro de Calcio según medida testicular.

| Anchura Testicular | Dosis por testículo |
|--------------------------------------|---|
| 10-14 mm y gatos sexualmente maduros | 0.25ml (si siente que los testículos se están sobrellenando, deténgase antes de inyectar la dosis completa) |
| 15-18 mm | 0.5 ml |
| 19-22 mm | 0.8 ml a 1 ml (continúe hasta que se sientan los testículos llenos) |
| 23-24 mm | 1 ml a 1.5 ml (continúe hasta que se sientan los testículos llenos) |
| 25-26 mm | 1.5 ml a 2 ml (continúe hasta que se sientan los testículos llenos) |
| 27 mm o más | 1.5 ml a 2.5 ml (continúe hasta que se sientan los testículos llenos) |

Siempre ponga en la jeringa 0.2 ml más de cloruro de calcio que la dosis máxima recomendada. Aproximadamente un 10% de los perros requieren hasta 0.2 ml de cloruro de calcio más con el fin de lograr una sensación firme después de la inyección. Esto incluye a perros grandes y pequeños ya que la longitud del testículo puede cambiar significativamente el volumen requerido.

Fuente: Haney W. 2010(51).

Anexo 8

Imagen 5. Limpieza y desinfección de la zona testicular.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Anexo 9

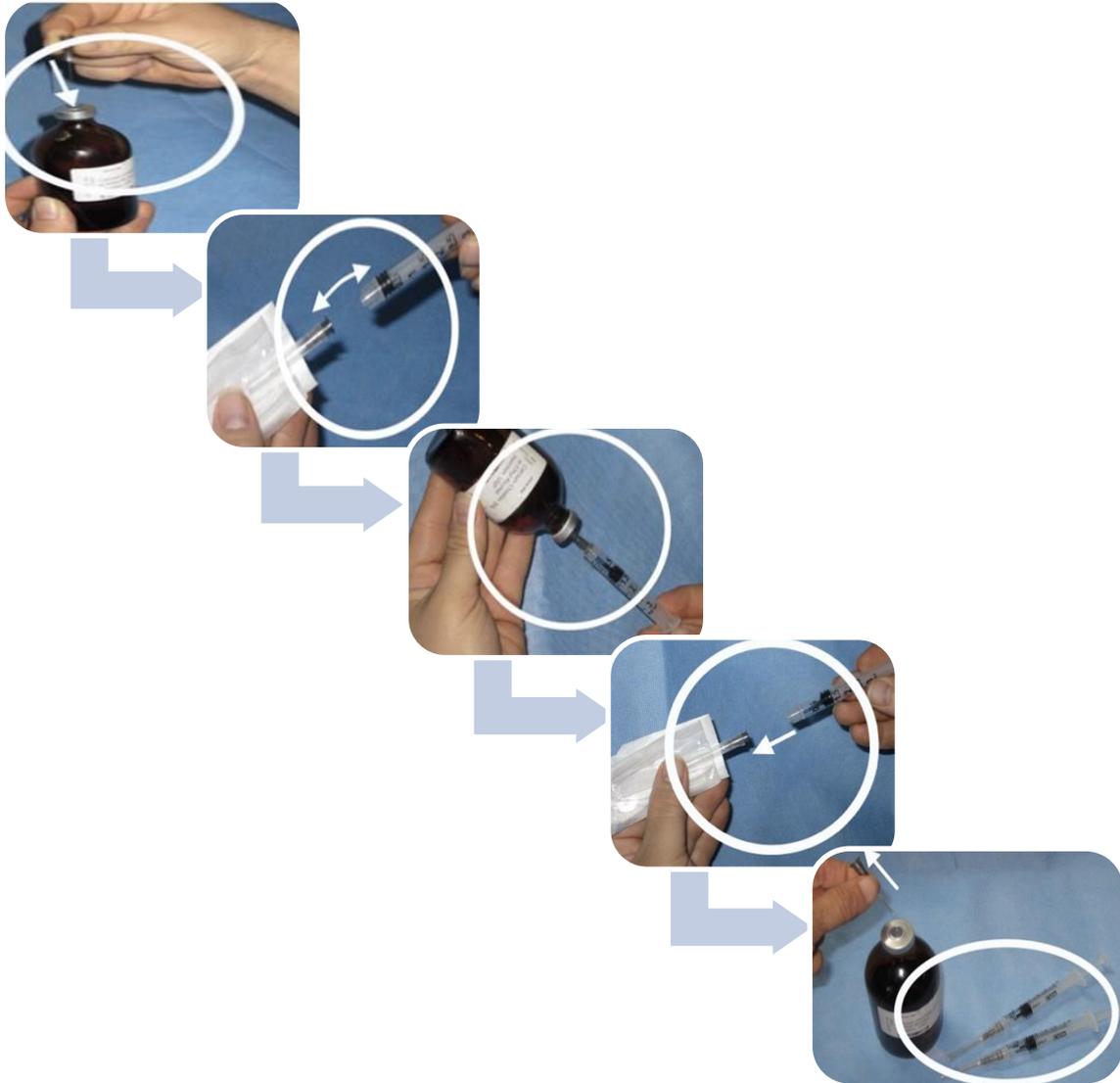


Imagen 6. Secuencia metodológica del manejo idóneo del Cloruro de Calcio.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Anexo 10



Imagen 7. Aplicación adecuada del cloruro de calcio intratesticular.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Anexo 11

Tabla 2. Tabla de resultados obtenidos.

| N° | NOMBRE | EDAD (años) | RAZA | PESO (K) | Medición Testicular (cm) | | | | | | | | Dosis (ml) | | Testosterona (ng/ml) | | |
|----|---------|-------------|----------|----------|--------------------------|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|-----|------------|----------|----------------------|-------|-----|
| | | | | | Testículo Izquierdo | | | | Testículo Derecho | | | | Test Izq | Test Der | Inicial | Final | |
| | | | | | 0 | 30 | 90 | 180 | 0 | 30 | 90 | 180 | | | | | |
| 1 | Gringo | 1 | Mestizo | 25 | 2,5 | 2 | 1,7 | 1,4 | 1,4 | 2,4 | 1,9 | 1,5 | 1,3 | 1,6 | 1,6 | 2,5 | 0,8 |
| 2 | Rex | 7 | Shih Tzu | 8 | 1,8 | 1,4 | 1,2 | 1 | 1,8 | 1,4 | 1,3 | 1,2 | 0,6 | 0,5 | 3,89 | 1,7 | |
| 3 | Cybor | 1,3 | Mestizo | 25 | 2,2 | 2,1 | 2 | 1,8 | 2,4 | 2,3 | 2,2 | 2 | 1 | 1,5 | 7,6 | 4 | |
| 4 | Nicky | 2 | Shih Tzu | 10 | 1,9 | 1,5 | 1,2 | 1 | 1,9 | 1,5 | 1,1 | 0,9 | 0,8 | 0,9 | 2,8 | 0,16 | |
| 5 | Clavo | 7 | Pequines | 4,5 | 1,8 | 1,4 | 1,3 | 1 | 1,6 | 1,4 | 1 | 0,8 | 0,5 | 0,5 | 4,01 | 1,02 | |
| 6 | Charlie | 5 | Pequines | 4,5 | 1,6 | 1,3 | 1,1 | 0,8 | 1,6 | 1,3 | 1,1 | 0,8 | 0,5 | 0,5 | 3,75 | 0,9 | |
| 7 | Doggy | 1,2 | Pequines | 5,5 | 1,4 | 1,2 | 0,9 | 0,7 | 1,5 | 1,2 | 1 | 0,8 | 0,35 | 0,5 | 2,88 | 0,4 | |

Fuente: Elaboración propia, 2017.

Anexo 12

Imagen 8: Orquitis



Fuente: Elaboracion propia, 2017.

Anexo 13

Escroto necrosado por
autotraumatismo.

Ablasion de escroto a
consecuencia del
autotraumatismo.

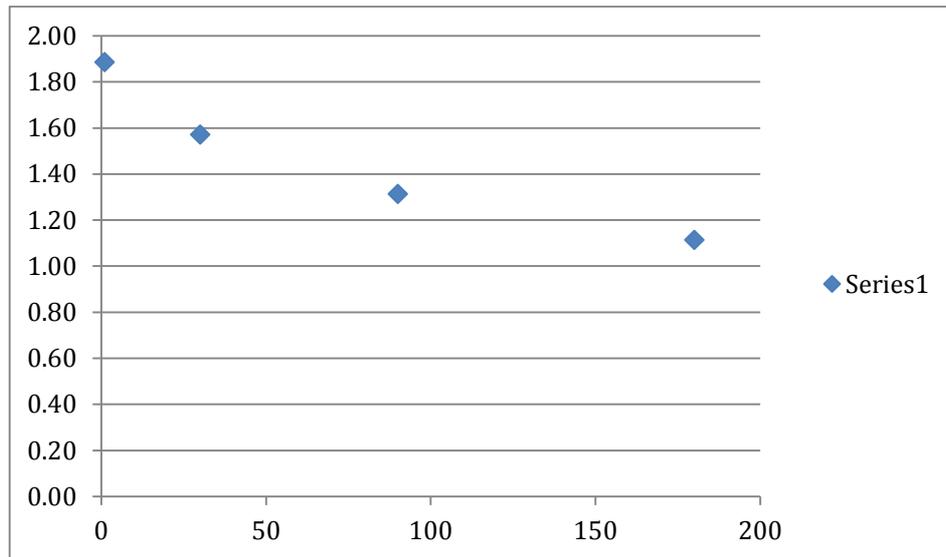


Imagen 9: Autotraumatismo por lamido

Fuente: Elaboracion propia, 2017.

Anexo 14

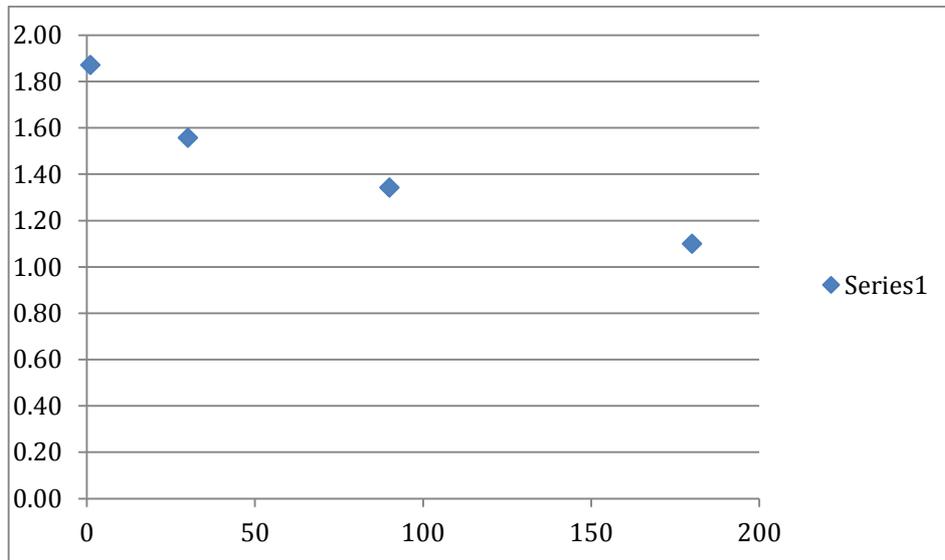
Diagrama 1. Dispersión de la variable de medición testicular derecha evaluado a los 0, 30, 90 y 180 días post inyección.



Fuente: Elaboracion propia, 2017.

Anexo 15

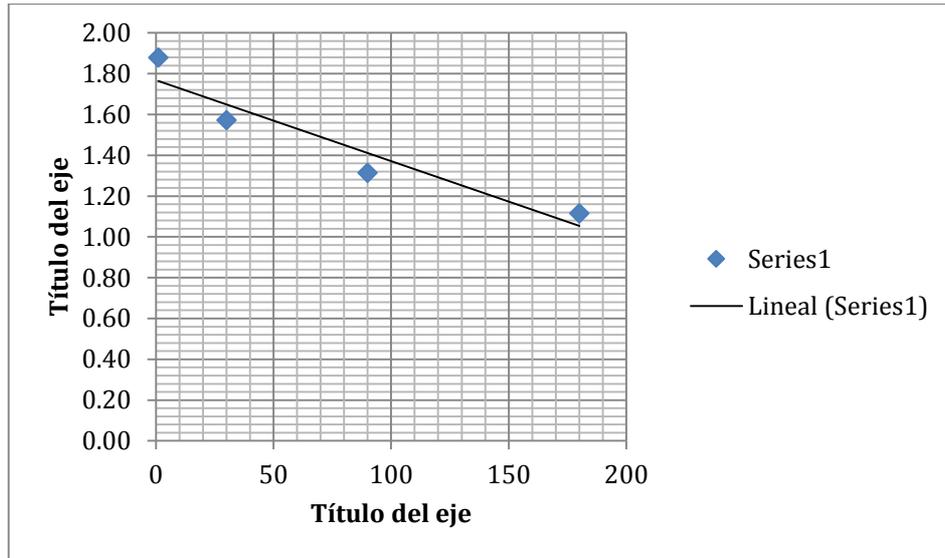
Diagrama 2. Dispersión de la variable de medición testicular izquierdo en los tiempos 0, 30 ,9 y 180 días post inyección.



Fuente: Elaboracion propia, 2017.

Anexo 16

Diagrama 3. Dispersión del promedio de las variables medición testicular en los tiempo 0, 30, 90 y 180 días post inyección.



Fuente: Elaboracion propia, 2017.

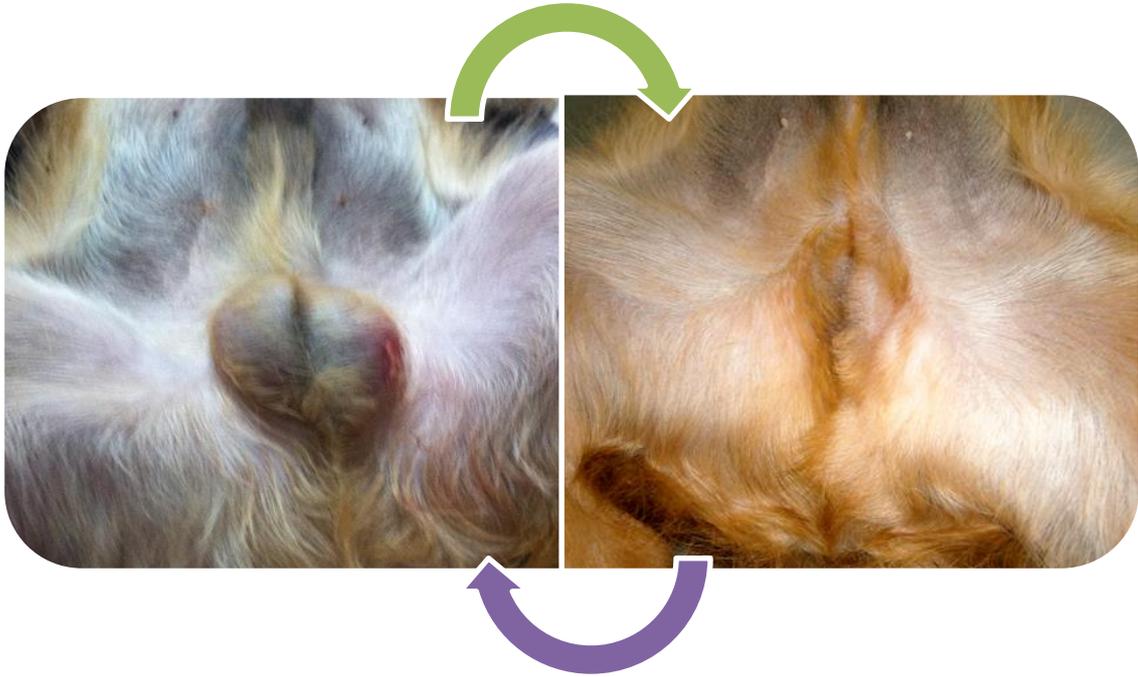
Anexo 17

Imagen 10. Comparación en el mismo paciente del tamaño testicular inicial y a los 180 días pos castración química.

Fuente: Elaboración propia, 2017.

Anexo 18

FORMATO 2. Resumen del informe bioquímico sobre niveles de testosterona.



LAPAVET
LABORATORIO DE PATOLOGÍA VETERINARIA
 Avenida circunvalación 1241 San Luis
 Tel: 7717384 Cel. 996578692 Nextel 839*4344
BIOQUÍMICA SÉRICA

Especie: Canino
Raza: Varios
Propietario: Varios
Remitente: Clínica Veterinaria Pet's House.

Nombre: Varios
Sexo: Macho
Edad: -
Contacto: Luisa Puchuri

| NOMBRE | TESTOSTERONA | | VALORES NORMALES |
|---------|--------------|------------|------------------|
| | INICIAL | FINAL | |
| GRINGO | 2.5 ng/ml | 0.8 ng/ml | 0.1 – 5 ng/ml |
| REX | 3.89 ng/ml | 1.7 ng/ml | 0.1 – 5 ng/ml |
| CYBOR | 7.6 ng/ml | 4 ng/ml | 0.1 – 5 ng/ml |
| NICKY | 2.8 ng/ml | 0.16 ng/ml | 0.1 – 5 ng/ml |
| CLAVO | 4.01 ng/ml | 1.02 ng/ml | 0.1 – 5 ng/ml |
| CHARLIE | 3.75 ng/ml | 0.9 ng/ml | 0.1 – 5 ng/ml |
| DOGGY | 2.88 ng/ml | 0.4 ng/ml | 0.1 – 5 ng/ml |


 Cesar Palacios Egoavil MV MS
 Patólogo Veterinario
 CMVP 5265

Fuente: Elaboración propia, 2017.

Anexo 19

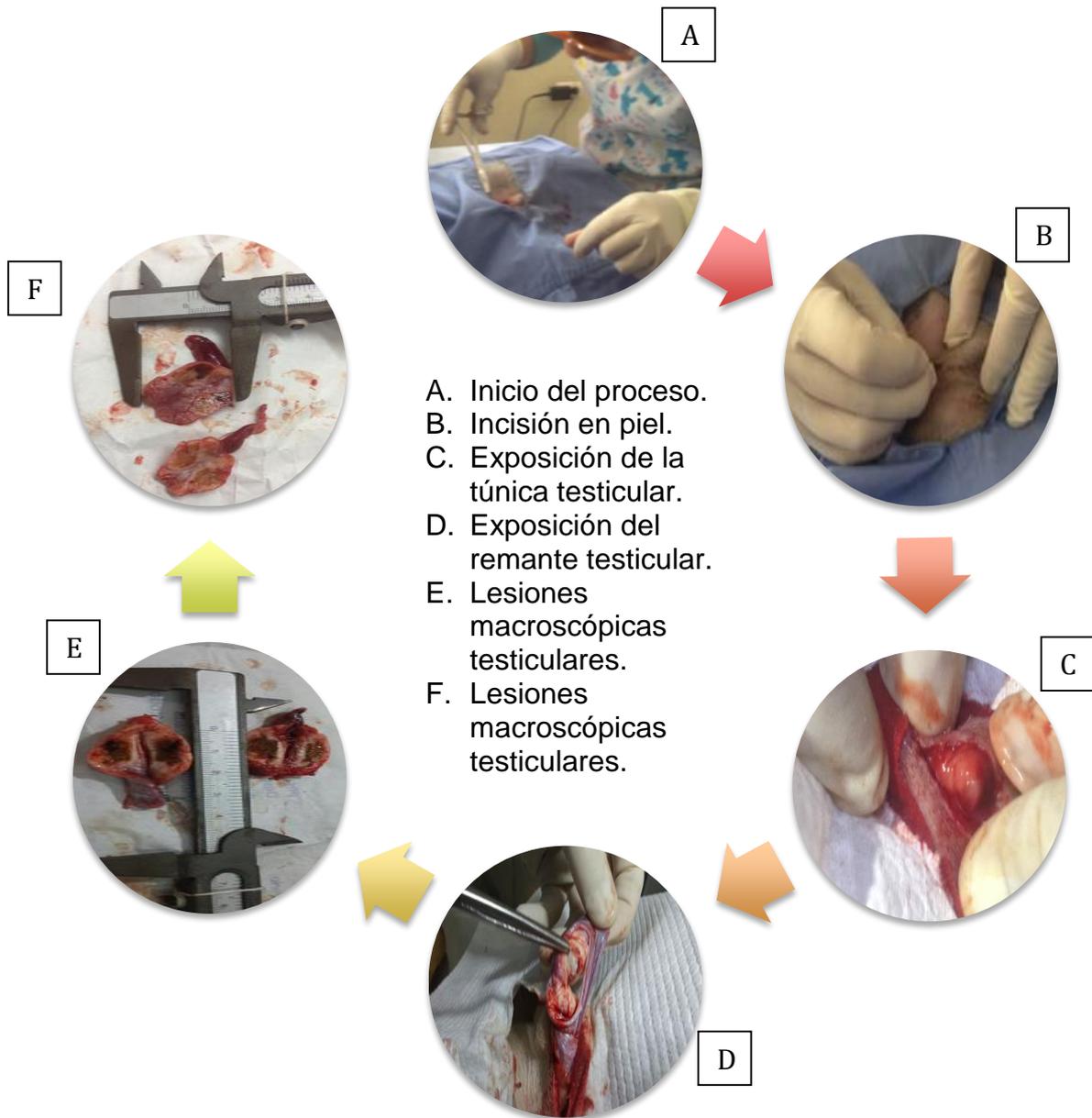


Imagen 11. Secuencia fotográfica del proceso de castración quirúrgica (técnica pre-escrotal abierta) para la histopatología.

Fuente: Elaboración propia, 2017

Anexo 20

FORMATO 3. Resumen del informe histopatológico testicular.



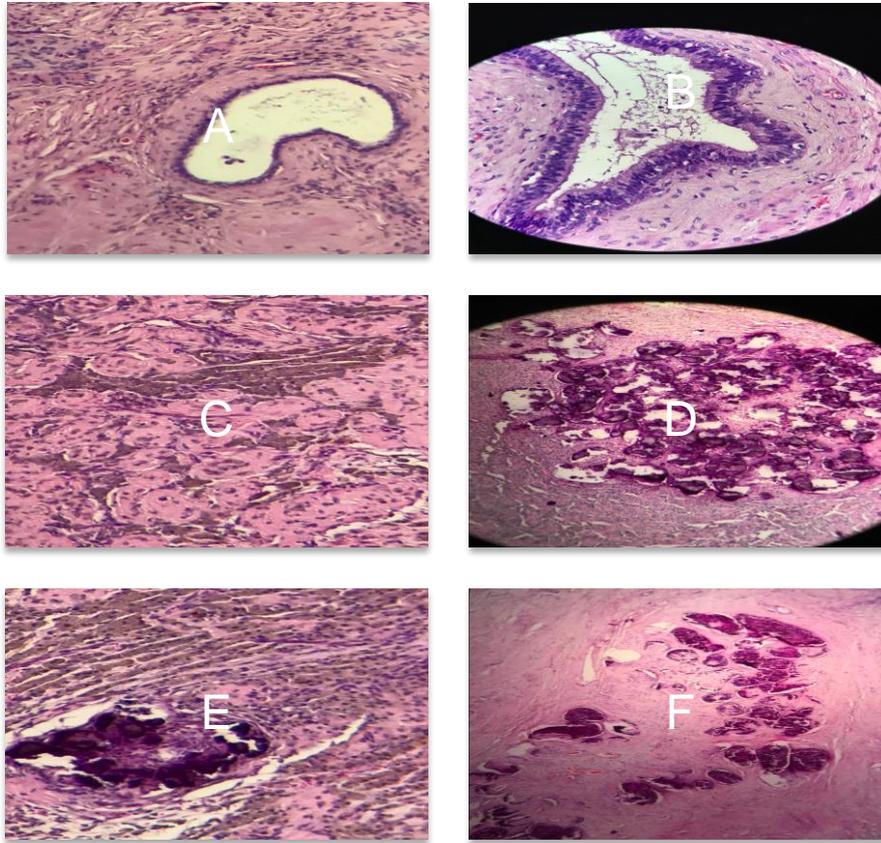
INFORME HISTOPATOLÓGICO

| NOMBRE | MUESTRA | DESCRIPCIÓN |
|---------|---------|---|
| Gringo | 1 | Epidídimo y testículos, inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal severa sin túbulos seminíferos normales o sin esperma. |
| | 2 | Epidídimo y testículos, inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal severa sin túbulos seminíferos normales o sin esperma. |
| Rex | 1 | Testículos, inflamación linfocitaria, fibrosis, necrosis, mineralización, multifocal sin normales túbulos seminíferos sin esperma ausencia de espermatozoides, presencia del Epidídimo, sin esperma. |
| | 2 | Testículos, inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal sin túbulos seminíferos normales o sin espermatozoides, Presencia del Epidídimo sin esperma. Una de las secciones de los testículos con túbulos seminíferos es más evidente y alguna degeneración de espermatozoides- la mayoría de los túbulos tienen Sertoli células degenerativas. |
| Nicky | 1 | Epidídimo y los testículos, inflamación linfocitaria, la fibrosis, la mineralización y multifocal sin túbulos seminíferos normales o ausencia de espermatozoides, severa. Granulomas (pigmento marrón dentro de histiocitos) y la necrosis de los túbulos seminíferos. |
| | 2 | Epidídimo y testículos, inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal severa sin túbulos seminíferos normales o sin esperma. Granulomas (pigmento marrón dentro de histiocitos) y la necrosis de los túbulos seminíferos. |
| Clavo | 1 | Epidídimo y los testículos, hemorragia aguda en túbulos seminíferos, mineralización en la pared de una arteria grande, no hay presencia de espermatozoides. |
| | 2 | Pequeña muestras, epidídimo, fibrosis, pequeños foco de histiocitos y severa necrosis |
| Charlie | 1 | Epidídimo y los testículos, una moderada degeneración de los túbulos seminíferos, los espermatozoides no están presentes. |
| | 2 | Epidídimo y los testículos, una moderada degeneración de los túbulos seminíferos, los espermatozoides no están presentes. Una pequeña inflamación y fibrosis histiocítica. |
| Cybor | 1 | Testículos afectado, los espermatozoides no están presentes. Epidídimo, fibrosis con mineralización, moderada. |
| | 2 | Epidídimo y los testículos, enfoque moderada de la mineralización y la fibrosis en forma de cápsulas, moderada. Espermatozoides no están presentes. |
| Doggy | 1 | Pequeña muestras, epidídimo, fibrosis, pequeños foco de histiocitos y severa necrosis. No hay testículos presentes en esta muestra, no hay esperma presente. |
| | 2 | Epidídimo y testículos, inflamación linfocitaria, fibrosis, mineralización multifocal severa sin túbulos seminíferos normales o sin esperma. |

1: testículo izquierdo, 2: testículo derecho.

Fuente: Elaboración propia, 2017

Anexo 21



A: fibrosis y severa necrosis. B: túbulos seminíferos sin esperma. C: fibrosis y mineralización. D: fibrosis e inflamación linfocitaria E: Fibrosis y mineralización (aumento a 40x). F: fibrosis y mineralización (4x).

Imagen 12. Fotos de la histopatología testicular posterior a la inoculación de cloruro de Calcio.

Fuente: Elaboración propia, 2017.