



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

EFFECTO DE LA INMUNOCASTRACIÓN
EN LA INVOLUCIÓN DE LA MORFOLOGÍA
DE LOS TESTÍCULOS DE CERDO

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

GABRIELA YAZMIN CASTELLANOS SÁNCHEZ

Asesor:

Dra. María Elena Trujillo Ortega



México, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi padre Don Mario Castellanos,

Por enseñarme que la escuela siempre está por delante de todo y por estar en mi corazón siempre, gracias papá!! Terminé lo que algún día comencé y sé que donde quiera que estés, te sentirás orgulloso y feliz.

A mi madre Antonieta,

Por estar conmigo durante toda mi vida apoyándome en todos los sentidos, por soportarme, por quererme y porque simplemente fuiste en buena parte el estímulo a lograrlo, te quiero mami!! y esto es para ti.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá,

Gracias por las alegrías que me has dado durante toda la carrera, el apoyo que me brindaste cada día y cada noche de desvelo, cada práctica, cada obstáculo, por estar ahí en todo momento, por darme la vida para poder gozar de esta hermosa universidad y simplemente por ser mi madre, gracias!!!

A mi hermana Guadalupe,

Por ser mi segunda madre y demostrar que la distancia es lo de menos, por convertirte en un ejemplo a seguir por tu gran valentía y fuerza. Te agradezco eso y más hermana, porque sin tu cariño, tus consejos y tu apoyo jamás lo habría logrado.

A mi hermana Marce,

Por estar presente en cada momento y brindarme con gusto y cariño todo lo que necesitara, un techo, comida, un abrazo, un oído, en fin, lo que sólo una hermana como tú puede hacer. Te agradezco tanto por preocuparte por mí y apoyarme en el momento justo.

A Eduardo,

Por llegar a ser parte de mí en este gran paso. Gracias por haber logrado ese enorme amor que siento por ti pues junto a tu compañía, cariño e inmenso apoyo, la universidad se convirtió en la mejor etapa de mi vida.

A mis cuñados,

Por tener que soportarme cada vez que acudiera a mis hermanas.

A Diego, por apoyarme no sólo un año completo, sino desde que decidiste convertirte en mi hermano y preocuparte y quererme como tal. A Joshua, por darme tu apoyo en los momentos necesarios.

A mi abuelita Toña, Mónica y mi tía Carmen,

Porque su preocupación y apoyo no ha sido como a una nieta o sobrina más y sin olvidar que mis “críos” siempre tuvieron atención a pesar de mi ausencia gracias a ustedes.

A Rosalba,

Gracias amiga por brindarme esa valiosa amistad desde el momento que pisamos por primera vez la facultad y que simplemente nos hizo cómplices de mil y un cosas durante todo este tiempo. Gracias por tu cariño, tu apoyo y por considerarme tu hermana por derecho propio.

A mis amigos veterinarios:

Chaber, Chobo, Alfred, Leila, Edgar, Othón, Osqui, Charlie, Santiago, Gemma, Ceci,
y aquellos con los que compartí grandes momentos,

A todos ustedes, gracias por ofrecerme su amistad y apoyo al principio, durante o al final de la carrera. Les agradezco que hayan hecho de esto más que una escuela para estudiar.

A la Dra. Trujillo,

Le agradezco el inmenso apoyo que he recibido en esta etapa final. Sus consejos y experiencia me han hecho ver que si uno se lo propone no es tan difícil, sólo hay que intentarlo.

Al Dr. Héctor, Dr. Oscar, Dr. Víctor, Hugo y don Panchito,

Por el gran apoyo incondicional que me dieron para lograr esta investigación.

A los laboratorios Pfizer, granja “La Joya” y el Departamento de Morfología,

Por darme las herramientas para llevar a cabo este trabajo y así, finalizar esta etapa.

A mis maestros, a la Facultad y a la Universidad,

Por darme la oportunidad de realizar una de mis grandes metas.

Y por supuesto, mil gracias a todos aquellos animales que durante estos años sirvieron de apoyo o incluso dieron su vida, y no por voluntad propia, para adquirir los conocimientos necesarios y hacer de mi profesión lo mejor posible.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
Los testículos, los epidídimos y la espermatogénesis	5
Pubertad de cerdos machos: olor sexual	8
Castración de cerdos machos	11
Características de la inmunocastración	16
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
MATERIAL Y MÉTODO	21
Sujetos experimentales	21
Diseño experimental	21
Castración quirúrgica (orquiectomía bilateral).....	23
Análisis histológico	23
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Cambios en células testiculares y epidídimo	26
Correlación entre número de células intersticiales, peso y diámetro testicular ..	34

Efecto progresivo en diámetro testicular	37
Efecto en espermatogénesis	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	45
ANEXOS	53
Anexo I. Método para la cuenta de células intersticiales	53
Anexo II. Datos obtenidos de la cuenta de células intersticiales, peso y diámetro testicular	55
Anexo III. Datos obtenidos por el método de Johnsen	62

R E S U M E N

CASTELLANOS SÁNCHEZ GABRIELA YAZMIN. Efecto de la inmunocastración en la involución de la morfología de los testículos de cerdo (bajo la dirección de la Dra. María Elena Trujillo Ortega)

Al llegar a la pubertad, los cerdos machos desarrollan un mal sabor y olor en la carne conocido como olor sexual. La castración quirúrgica es la práctica más utilizada para controlar dicho olor pero conlleva muchas desventajas las cuales se han podido evitar con prácticas alternativas como la inmunocastración, método aceptado en diversos países pero aún existen dudas sobre sus efectos benéficos y requiere más investigación para demostrarlos. El objetivo de este estudio fue identificar los cambios morfológicos en testículos y epidídimos de animales inmunocastrados desde la primera dosis de la vacuna anti-GnRH hasta la muerte. La experimentación se realizó en una granja comercial con cerdos de raza híbrida terminal que aplica la vacuna como una práctica cotidiana. Cinco animales se eligieron al azar y se identificaron como controles para no recibir la vacuna anti-GnRH. Para medir el efecto en tamaño testicular se midió el diámetro testicular de 30 animales elegidos al azar a las 3, 9, 10, 11 y 12 semanas después de la primera aplicación. Para observar los cambios morfológicos se eligieron 10 cerdos al azar y los cinco controles y se castraron quirúrgicamente para realizar un análisis histológico posterior; estas castraciones se llevaron a cabo al mismo tiempo que las mediciones del diámetro testicular, esto es, dos cerdos inmunocastrados y un control cada semana. La inmunocastración afecta significativamente el tamaño testicular pero no el número de células intersticiales; sin embargo, se observó una disminución consecutiva del volumen de las células intersticiales (de Leydig) desde la primera dosis, así como signos de muerte y daño celular; el epidídimo

presentó daño en pared epitelial y ausencia de espermatozoides en el lumen. La espermatogénesis es afectada más no se detiene por completo lo cual nos hace pensar que la reversibilidad morfo-funcional es factible. La inmunocastración mediante la vacuna anti-GnRH tiene efecto significativo morfológico aparentemente reversible y el tamaño testicular no puede ser evidencia de ausencia de olor sexual.

INTRODUCCIÓN

La presentación de la pubertad en los cerdos machos conlleva una serie de cambios de diversa índole que van desde el crecimiento de los órganos sexuales así como el desarrollo de la conducta sexual. Así mismo, el sistema endócrino comienza a liberar hormonas encargadas de dichos cambios con la finalidad de convertir al cerdo en un animal sexualmente maduro, esto es, con la capacidad de reproducirse.¹

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es aquella que se encarga de estimular a la hipófisis para la secreción de las hormonas estimuladora de células intersticiales (ICSH o LH) y folículo-estimulante (FSH) que actúan sobre las gónadas para provocar el crecimiento testicular y la esteroidogénesis. La androstenona es un esteroide testicular producto de dicho estímulo cuya función principal es como feromona; sin embargo, es uno de los principales responsables del conocido “olor sexual” en cerdos.^{2,3}

El olor sexual se presenta en la carne de los machos sexualmente maduros (que han llegado a la pubertad) y puede llegar a considerarse como un olor desagradable siendo el principal factor limitante en el mercado para la venta de machos enteros y por ello es importante tener un buen control de dicho olor. Otro contribuyente a dicho olor es el escatol, pero contrario a la androstenona, esta sustancia no es específica de los machos siendo un producto de la degradación microbiana del triptófano en el intestino grueso.⁴

La manipulación de la dieta, una adecuada limpieza, el manejo y los cambios en los pesos al momento de la matanza, así como la selección genética, son algunas de las opciones para controlar dicho olor pero no siempre es comercialmente viable ni eliminan aceptablemente la presencia de dichos agentes.^{5,6} Por ello, la práctica más efectiva que comúnmente se

realiza en la mayoría de los países es la castración quirúrgica que ha generado controversia ya que el cerdo entero tiene una mejor conversión alimenticia y canales más magras; en tanto que la castración quirúrgica afecta negativamente la salud y el bienestar animal pues cuando se hace sin anestesia ni analgesia les produce dolor e incomodidad además de que puede provocar inflamación crónica y mayor retardo en el crecimiento.⁷

Ante estas desventajas, diversas alternativas se han propuesto para lograr dicho fin. Una de ellas es la vacunación contra la GnRH conocida como inmunocastración, la cual ayuda a mejorar la calidad de la carne, y al mismo tiempo representa un método que influye favorablemente en la conducta de los animales; contribuyendo a disminuir el dolor causado por la cirugía o inflamación.⁸ Por ello, la inmunocastración es un tema que ha tomado gran importancia en la última década pues se han demostrado beneficios importantes tanto productivos y de bienestar animal por lo que se ha hecho necesario aumentar los estudios y de esta forma garantizar dichos efectos benéficos.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Los testículos, los epidídimos y la espermatogénesis

Los testículos son las gónadas masculinas que tienen como función producir los espermatozoides (células encargadas de transmitir los genes del macho a la descendencia) y los andrógenos (sustancias que proporcionan las características individuales del macho).⁹

El parénquima testicular (Figura 1) está formado por una serie de túbulos huecos conocidos con el nombre de túbulos seminíferos, rodeados por tejido intersticial. Los túbulos seminíferos están formados por dos tipos de células básicas:^{9,10}

a) *Células de sostén (de Sertoli)*.- Son células piramidales cuya ancha base descansa en la lámina basal y el citoplasma restante se extiende hacia el lumen tubular creando protuberancias largas que rodean a las células germinales durante todo su desarrollo. También forman la barrera hematotesticular responsable de evitar el paso de sustancias al compartimento adluminal que puedan alterar el desarrollo de la espermatogénesis.

Tienen funciones nutritivas, de sostén y de soporte; además fagocitan células espermatogénicas en regresión y despegan cuerpos residuales de las espermátidas. Por otra parte, liberan los espermatozoides en la luz del tubo seminífero (espermiación), modulan la acción de la FSH y la testosterona en las células germinales, participan en la sincronización de los eventos espermatogénicos, producen una proteína fijadora de andrógenos y secretan constituyentes del fluido intratubular como la transferrina y la inhibina.¹⁰

b) *Células germinales primitivas.*- Son varias células espermatogénicas que representan diferentes fases en el desarrollo y diferenciación del espermatozoide y se localizan entre y por encima de las células de sostén. La secuencia de eventos en el desarrollo del espermatozoide desde la espermatogonia es llamada espermatogénesis y se subdivide en tres fases: 1) espermatocitogénesis, el proceso por el cual una espermatogonia madura a espermatocito; 2) meiosis, la división naturacional de los espermatocitos que da lugar a las espermatidas con un número reducido (haploide) de cromosomas y; 3) espermiogénesis, el proceso de transformación de las espermatidas en espermatozoide.⁹

El tejido intersticial está formado por tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y linfáticos, fibroцитos, células mononucleares y células intersticiales (de Leydig). Estas últimas son las encargadas de secretar los andrógenos testiculares (fundamentalmente la testosterona) por acción de la hormona estimuladora de células intersticiales (ICSH o LH) y en el cerdo, llegan a ocupar del 20 al 30% del volumen testicular.¹⁰

Las células intersticiales son de origen mesenquimatoso y se distinguen dos poblaciones: las fetales y las pubertales e incluso en el cerdo se ha identificado un tercer tipo (posnatales tempranas). Los testículos inmaduros contienen numerosas células intersticiales dispuestas a modo de mosaico, con formas poliédricas y citoplasma acidófilo con una mínima presencia de liposomas y núcleo central. Por el contrario, las células intersticiales de los testículos maduros muestran un esquema estructural de células productoras de esteroides, esto es, son poligonales, de unos 14 μm de diámetro, con núcleo esférico central y citoplasma amplio acidófilo. El citoplasma contiene numerosos liposomas que albergan la materia prima para la formación de hormonas. La enzima específica de la transformación de sustancias grasas se localiza en el seno de las mitocondrias esféricas las cuales poseen

crestas tubulares e intervienen directamente en la síntesis de esteroides al ponerse en contacto directo con la grasa de los liposomas para sintetizar la testosterona. Sus complejos de Golgi son relativamente pequeños y no participan en la secreción de andrógenos. Al igual que otras células endócrinas secretoras de esteroides, el rasgo ultraestructural más llamativo de las células intersticiales es su retículo endoplásmico liso tan extenso. También presentan retículo endoplásmico rugoso, pero no tienen vesículas de secreción porque, al parecer, la testosterona se libera con la misma rapidez que con la que se sintetiza y por tanto no se aprecia morfológicamente.^{10,11}

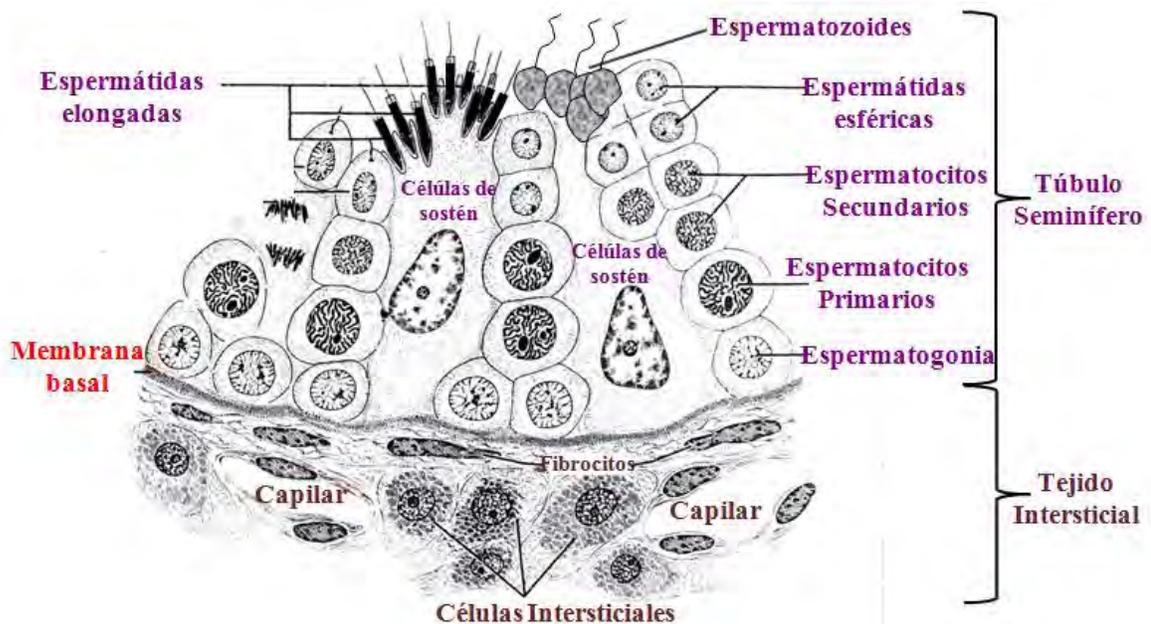


Figura 1. Composición del parénquima testicular y tejido intersticial. (Modificada de: Junqueira y Carneiro. Histología Básica. Barcelona, 2005)

El epidídimo es un conducto enrollado recubierto por un epitelio cilíndrico estereociliado pseudoestratificado rodeado de una pequeña cantidad de tejido conjuntivo laxo y fibras musculares lisas circulares que, de acuerdo a sus características histológicas, se divide en cabeza, cuerpo y cola. La espermiogénesis comienza en los túbulos seminíferos y termina en el epidídimo ya que éste es el responsable de la maduración (en cabeza y cuerpo) y el almacenamiento (en cola) de los espermatozoides.¹⁰

Pubertad de cerdos machos: olor sexual

El término pubertad se refiere al proceso de cambios por los cuales un organismo desarrolla la habilidad de reproducirse y se presenta en los cerdos machos aproximadamente entre las 20 y 24 semanas de vida; sin embargo, además de la edad, diversos factores pueden influir en su presentación tales como: alojamiento grupal o individual, nutrición, fotoperiodo o época del año, raza, entre otros.^{12,13} Se considera que un cerdo adquiere el estado de pubertad cuando aparecen espermatozoides libres en los túbulos seminíferos y se presentan en la cauda epididimal lo cual representa el momento en que el macho es capaz de fecundar aunque es de aclararse que precisamente en ese momento no es cuando tiene el máximo de fertilidad.¹

Así, la pubertad se caracteriza por cambios conductuales, morfológicos y endócrinos.

❖ Cambios conductuales

Inicia la presentación de diversas conductas dependientes de una compleja interacción entre el organismo y las condiciones ambientales. Las más importantes son el incremento en la agresividad y la definición de una conducta sexual mediante el cortejo a la hembra que consiste en gruñidos y generación de grandes cantidades de saliva por la cual liberan

feromonas fácilmente perceptibles por la hembra al contacto con ella; además golpes a la hembra en los flancos y olfateo de región anal hasta que la monta.¹⁴

❖ Cambios morfológicos

El volumen de masa muscular se incrementa así como el tamaño de los órganos reproductivos tales como los testículos y las glándulas bulbouretrales. Por otro lado, en los testículos, las células intersticiales y células de sostén empiezan a proliferar; se incrementa el diámetro y largo de los túbulos seminíferos, la formación del lumen tubular y la aparición de células espermatogénicas.^{12,15}

❖ Cambios endócrinos

La regulación endócrina en la pubertad conlleva una compleja interacción entre gonadotropinas y esteroides gonadales. Así, ciertas hormonas son activadas para comenzar su función biológica reproductiva, por ejemplo, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que se libera de forma pulsátil en el hipotálamo estimula a la hipófisis a secretar las hormonas estimuladora de células intersticiales (ICSH o LH) y folículo-estimulante (FSH) las cuales posteriormente, inducen el crecimiento testicular. La ICSH se une a los receptores en las células intersticiales para comenzar la esteroidogénesis y la FSH se encarga de la espermatogénesis hasta el estado de espermatozoides secundario. Los esteroides testiculares son liberados a la circulación y transportados a varios tejidos donde llevan a cabo diversas funciones.²

Un importante esteroide producido es la testosterona que influye en la retroalimentación para regular la secreción de GnRH, ICSH y FSH, estimula el desarrollo de las características sexuales del macho así como el aumento de masa muscular^{15,16} y estimula los estados tardíos de la espermatogénesis. Además, es el principal responsable del funcionamiento de las glándulas accesorias (ya que sin esta hormona simplemente se

vuelven disfuncionales) y del epidídimo, prolongando así el lapso de vida del espermatozoide.^{2,17}

Otro esteroide testicular es la androstenona la cual es transportada y almacenada en las glándulas salivales para desarrollar un papel importante en la conducta sexual como feromona. Puede encontrarse a niveles muy variables debido a diversos factores tales como peso vivo, fase de maduración sexual³ y raza.¹⁸

La androstenona es responsable de un fuerte olor y sabor a orina en la carne conocido como “olor sexual” el cual puede llegar a considerarse como un olor desagradable a pesar de la gran variación de sensibilidad de consumidores ya que mientras algunos pueden detectar bajas concentraciones de androstenona otros simplemente no notan su presencia.¹⁹

Otro contribuyente a dicho olor es un metabolito de la degradación del triptófano en el intestino grueso llamado escatol el cual no es específico de los cerdos machos y se desconoce la función fisiológica que pueda tener en esta especie pues en muchos mamíferos como cabras, bovinos e incluso humanos es una neumotoxina; sin embargo, los cerdos no presentan dicha toxicidad.²⁰ La presencia de dicho metabolito se ve influida de factores como maduración sexual,¹⁵ genética,⁴ nutrición y condiciones de crianza ya que, como puede ser absorbido por la piel, condiciones poco higiénicas aumentan la presencia en grasa subcutánea.⁵

Tanto los niveles de androstenona como de escatol se incrementan al inicio de la pubertad; sin embargo, esta relación no se encuentra bien establecida. Parece ser que el metabolismo del escatol disminuye porque el hígado comienza a metabolizar esteroides testiculares lo que provoca la acumulación del escatol en el organismo pero un cerdo puede tener altos niveles de androstenona y bajos niveles de escatol ya que la acumulación de escatol no está

directamente relacionada a la función testicular y su presencia se debe a diversos factores como se mencionó anteriormente.^{21,22}

Ambas sustancias son altamente lipofílicas favoreciendo su almacén en tejido adiposo y así, por su relativa alta volatilidad, cuando la carne de cerdo es cocinada ambos componentes son fácilmente liberados provocando el olor sexual²³ incluso en concentraciones realmente mínimas (0.5-1.0 ppm para androstenona y 0.20-0.25 ppm para escatol).²⁴

A pesar de la variación de sensibilidad, el olor sexual es el principal factor limitante en el mercado para la venta de machos enteros (no castrados) y por ello es importante su control.

Castración de cerdos machos

A lo largo del tiempo se han intentado diversas prácticas para controlar el olor sexual en cerdos; sin embargo, la castración quirúrgica se ha convertido en la práctica de elección para dicho control por las múltiples ventajas que presenta tales como: el procedimiento consume poco tiempo, afecta a los animales en una forma positiva (menos agresividad) y el riesgo para el personal es bajo; generalmente se realiza después del tercer día de edad para permitir a los lechones obtener el calostro necesario para prevenir infecciones posteriores, mejor crecimiento y cicatrización antes del destete así como definir la teta. Por otro lado, a esta edad los testículos son más fáciles de remover, el riesgo a hemorragias es mínimo y es más sencillo el manejo ya que incluso una persona bien capacitada puede hacerlo por sí sola.²⁵

A pesar de ser la principal herramienta para el control del olor sexual sus efectos negativos son conocidos desde principios del siglo pasado, principalmente el relacionado con la

ganancia de peso, pues comparada con animales enteros es significativamente menor a pesar que la alimentación y condiciones ambientales sean similares.²⁶

Por otro lado, muchos productores la consideran desagradable y actualmente está criticada y cuestionada ampliamente por grupos de bienestar animal porque generalmente es aplicada sin anestesia y, a cualquier edad que se realice, se presentan reacciones conductuales y fisiológicas indicativas de dolor, incluyendo estrés e incomodidad antes y horas después del procedimiento e incluso algunas conductas persisten por muchos días ya que se ha observado el incremento en las concentraciones de cortisol en suero después de la cirugía.⁷

Por lo anterior, diversas alternativas para el control del olor sexual han sido propuestas en las últimas décadas. Algunas de ellas se han llevado a la práctica cotidiana actualmente en ciertos países y algunas otras aún se encuentran en estudio.

Alternativas implementadas actualmente

❖ Castración quirúrgica con anestesia

La castración quirúrgica con anestesia se puede realizar de diversas formas; anestesia local (inyección directa en testículos), general o incluso inhalada (spray nasal o cámaras de dióxido de carbono). El efecto en el animal y el riesgo para el personal es similar al de la castración quirúrgica sin anestesia; sin embargo, el uso de anestesia general es de considerarse para la seguridad en el consumo humano. Consume un mayor tiempo, es más caro y en algunos lugares se exige la participación de personal capacitado; por ello para poder aplicar esta alternativa es necesario que el costo sea mínimo y que el anestésico no dure tanto tiempo para que el animal vuelva con la madre más rápido.^{27,28}

❖ Inmunocastración

La inmunocastración consiste en la inyección de una forma modificada de GnRH conjugada a una proteína que induce la formación de anticuerpos contra GnRH, los cuales se unen a la GnRH endógena previniendo la liberación de ICSH y FSH por parte de la hipófisis.²⁹

Comparada con la castración quirúrgica, la inmunocastración genera beneficios, que incluyen la mejora en la ganancia diaria de peso así como en la eficiencia alimenticia,⁸ sin embargo, afecta el trabajo de rutina y el tiempo que conlleva el proceso para su aplicación. Puede aplicarla ya sea un trabajador o el veterinario pero aún existe la inquietud sobre la seguridad en el personal a pesar de ser mínimo el riesgo si se utiliza el inyector recomendado por el fabricante para una mayor protección. Así mismo se recomienda que no sea aplicado por mujeres en edad fértil lo cual puede ser un inconveniente para ciertas granjas.²⁷

❖ Producción de cerdos enteros

La cría de machos enteros se ha utilizado como alternativa porque se obtienen animales con un mejor crecimiento e índice de conversión además de canales más magras; elimina el dolor asociado a la castración y el ahorro de tiempo que ésta conlleva. No obstante, aparte del olor sexual, los machos enteros muestran un comportamiento sexual más acentuado y una mayor agresividad a la entrada en pubertad que repercute negativamente en el bienestar del grupo.³⁰ Además, en algunas partes del mundo la castración es incluso requerida por algunas razones; por ejemplo, en Italia se produce un jamón curado (Parma Ham) el cual requiere de cierta cantidad de grasa que sólo un animal castrado puede proporcionar ya que un animal entero es demasiado magro.²⁸

El Reino Unido y Gran Bretaña realizan esta práctica desde hace más de 20 años cuando decidieron abandonar la castración de lechones. En la actualidad, casi todos los cerdos de estos países se dejan enteros. También en algunos países del sur de Europa (Chipre, Portugal y España) se realiza considerablemente dicha práctica; sin embargo empieza a decaer debido a que los cerdos deben ser sacrificados a una edad más temprana.²⁷

Alternativas en estudio (no implementadas)

❖ Semen sexado

Comparando la cría de machos enteros con la de hembras podríamos evitar el olor sexual; sin embargo, los machos presentan una mejor conversión alimenticia y menor cantidad de grasa (diferencia menor en la especie porcina comparada con los bovinos y ovinos).³¹

La clasificación de semen de acuerdo al sexo es posible pero aun no se encuentra como uso rutinario en cerdos. La técnica actual basada en citometría de flujo consume bastante tiempo (se requiere de 10 horas para producir una dosis con 150 millones de espermatozoides). Además, para reducir el número de células espermáticas necesarias para una dosis es necesario realizar inseminación artificial intrauterina la cual debe ser llevada a cabo por personal debidamente capacitado, pues la que se hace rutinariamente y de forma más sencilla es en el cérvix.²⁷

❖ Uso de sustancias para la destrucción del tejido testicular

Existen ciertas sustancias tales como ácidos y sales que han sido investigadas para ser utilizadas como alternativas a la castración. Estas sustancias son fácilmente administradas, seguras para los animales, el riesgo del personal es bajo, no producen hemorragia y el dolor es mínimo. Sin embargo, se han llegado a observar tumefacciones en los testículos y

escroto, además la información sobre el dolor relacionado a posibles reacciones es muy limitada e insuficientemente documentada para poder llegar a una conclusión certera.²⁷

❖ Control genético

La selección genética de animales con baja presencia de olor sexual puede representar una alternativa amigable respecto al bienestar animal pero a largo plazo ya que es necesario realizar una selección cuidadosa para no afectar algún otro factor que pueda estar ligado a dicha característica. Por ejemplo, los metabolismos de la androstenona y el escatol son procesos equivalentes; sin embargo la metabolización del escatol es necesaria para eliminar sustratos xenobióticos mientras que el almacenamiento de la androstenona es biológicamente importante para la función reproductiva. Así, entendiendo que los mecanismos de acumulación de estos dos productos han sido investigados por un interés en común, su impacto en la selección puede ser probablemente diferente.⁶

Proyecto PIGCAS

Diversos países de Europa han enfocado su preocupación al bienestar animal sin descuidar las necesidades de los productores. Ejemplo de esto es el proyecto llamado PIGCAS (Actitud, prácticas y situación de la castración de lechones en Europa) que se desarrolló en un período de 24 meses (2007-2009) por 27 países de la Unión Europea. Dicho proyecto tuvo como objetivo obtener información mediante cuestionarios sobre la opinión de diversas personas involucradas en la cadena comercial de la carne porcina (desde productores hasta consumidores) para respaldar la futura política europea sobre bienestar animal en el área de castración quirúrgica sin anestesia y sus métodos alternativos. Así, concluyeron que no será prohibida la castración quirúrgica sin anestesia en la Unión Europea en un futuro cercano pues a pesar que en algunos países (tales como Noruega y

Suiza) ya está prohibido legalmente, aún se requiere más investigación sobre las diversas alternativas que existen, en especial, semen sexado y crianza de machos enteros; sin embargo, la inmunocastración y la castración quirúrgica con anestesia pueden ser soluciones temporales.²⁷

Características de la inmunocastración

La GnRH es una hormona peptídica que ha sido ampliamente utilizada en medicina humana para el control de tumores de mama, próstata, ovario y endometrio;³² sin embargo, se ha reportado atrofia testicular debido al incremento en los niveles de anticuerpos contra GnRH que la aplicación conlleva.³³ Por otro lado, es usada para inmunizar animales, suprimiendo la producción de testosterona y espermatozoides (esteroidogénesis y gametogénesis) ya que afecta el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal logrando una efectiva inhibición del crecimiento testicular y de la síntesis de esteroides sexuales la cual, finalmente, reduce la aparición del olor sexual.³

La inmunocastración es una práctica aprobada actualmente en diversos países (Suiza, Australia, Nueva Zelanda, Brasil, México, Corea, Tailandia, Costa Rica, El Salvador, Sudáfrica, entre otros) pero aún no se considera una práctica de rutina. La aprobación se logró apenas en la mayoría de los países en el año 2008, excepto para Australia, el cual lleva más de 8 años.²⁷ Existe un solo producto autorizado llamado Improvac ®, del laboratorio Pfizer, el cual consiste, como ya se ha mencionado, en un forma modificada de la GnRH conjugada a una proteína para inducir la formación de anticuerpos frente a dicho factor, que al unirse a la GnRH endógena inhiben la secreción de ICSH y FSH por parte de la hipófisis.³⁴

La GnRH natural de mamífero está conformada por 10 aminoácidos, así, la vacuna (como es llamada por la forma en que actúa), contiene una forma modificada con sólo nueve aminoácidos lo que hace que el organismo no la reconozca; aún así, la GnRH es muy pequeña para ser inmunogénica por lo que se encuentra unida a una proteína de transporte además de un adyuvante acuoso que juntos resultan en elementos extraños para los receptores de la hipófisis estimulando al sistema inmune a producir altos niveles de anticuerpos circulantes.²³ Es administrada dos dosis vía subcutánea, con 4 semanas de diferencia, y la segunda inyección se administra 4-6 semanas antes de la matanza.³⁴ La primera dosis provoca una respuesta inmune primaria pues se produce una baja cantidad de anticuerpos principalmente de tipo IgM no específicos y se establece una memoria inmunológica. Después de la segunda dosis, el título de anticuerpos circulantes se eleva rápidamente predominando IgG altamente específicos.³⁵

Las vacunas son generalmente consideradas seguras desde el punto de vista de salud pública ya que es difícil que sobrevivan al proceso de cocción de la carne o en todo caso, al tracto intestinal del consumidor. Por ello, esta vacuna no tiene efecto alguno en el consumidor ya que al administrarla oralmente no genera anticuerpos. Además no tiene efecto hormonal por sí misma ya que administrada vía intravenosa no altera niveles hormonales.²³

Estudios realizados con dicha vacuna han concluido que la inmunocastración es una manera efectiva de eliminar el olor sexual sin las desventajas de la castración quirúrgica; sin embargo, Jaros *et al.*, 2005, encontró que de 270 animales utilizados dos no lograron el efecto esperado, lo cual se atribuyó a una falta de respuesta inmunológica que puede ser variable entre distintos individuos.¹⁶

Por otro lado, Dunshea *et al.*, 2001, reportaron el incremento en los niveles de anticuerpos GnRH y la disminución en la concentración de androstenona y escatol en la grasa de los animales al sacrificio (valores debajo de los rangos aceptables) en el 100% de estos; pero no fue así en el caso de la testosterona la cual no mostró disminución en el 8% de los animales tratados.³⁴

Existen otros estudios, además de los mencionados, basados en la medición de anticuerpos GnRH (a distintos intervalos en el período de la primera dosis al sacrificio), testosterona, escatol y androstenona (en sangre o grasa), diámetro y peso de testículos y glándulas bulbouretrales al sacrificio así como la ganancia diaria de peso; con diferencias no significativas ($P < 0.05$), todos llegan a la conclusión de la eficacia en la vacuna para controlar el olor sexual y disminuir los efectos negativos de la castración quirúrgica.^{35, 36, 37}

Sin embargo, es importante mencionar que el tamaño de los órganos no puede ser un indicador confiable de la respuesta a la vacunación ya que algunos machos enteros llegan a tener glándulas más pequeñas y testículos menos pesados que los castrados quirúrgicamente.³⁶

Claus *et al.*, 2007, encontraron un rápido incremento de anticuerpos después de la segunda dosis; sin embargo, los aspectos cuantitativos son altamente variables dependiendo de cada individuo. La disminución continua que se presenta después de este incremento quizás permita que la función testicular se recupere antes de ser enviados al rastro si es que esta dosis es administrada tempranamente.³⁵

Por ello, Zamaratskaia *et al.*, 2008, realizaron un estudio para determinar la duración del efecto después de la segunda dosis encontrando que la inhibición del olor sexual se alcanza hasta 22 semanas después. Para este tiempo, el tamaño de los testículos y las glándulas bulbouretrales varía mucho entre individuos y aunque los órganos reproductivos no están

recuperados totalmente, el incremento en la variación sugiere una regresión en la involución testicular después de este tiempo, lo que no garantiza la ausencia del olor sexual.²⁹

Como se ha mencionado, diversas investigaciones se han enfocado a la inmunocastración de forma indirecta mediante estudios dirigidos al incremento de anticuerpos GnRH y cambios endócrinos; pero algunos otros han intentado observar los cambios que a nivel histológico ocurren en el parénquima testicular.^{38,39}

Además, las principales investigaciones sobre el efecto de las gonadotropinas así como de los andrógenos sobre las células se ha basado en estudios de parámetros en peso testicular y evaluación cualitativa histológica del epitelio seminífero,⁴⁰ y por ello, sería importante realizar un estudio histopatológico que nos ayude a identificar los efectos causados en el peso testicular.⁴¹

Así, la literatura sobre inmunocastración sólo señala estudios histológicos al momento de la muerte y ya que existen hipótesis sobre la regresión de la función testicular sería factible estudiar la secuencia de los cambios histológicos en el testículo a distintos períodos entre la primera dosis y la muerte con el fin de analizar cómo influyen dichos cambios en el tamaño testicular así como algunos aspectos que puedan influir en esta regresión. Así mismo, analizar los cambios que suceden en epidídimo ya que, como se mencionó, su funcionalidad depende principalmente de las células intersticiales.

Por ello, la obtención de estos datos ayudará a conocer más a fondo la eficacia de esta vacuna para su consecuente uso como alternativa a la castración quirúrgica y aumentar la certeza de los resultados en las granjas que utilicen el producto.

HIPÓTESIS

Si la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es la principal responsable de la función morfo-funcional de los testículos entonces la inmunocastración provoca involución reversible en las células intersticiales y cambios morfológicos que conllevan a una disminución del tamaño testicular así como alteraciones en epidídimos.

OBJETIVO

Objetivo General

Describir la secuencia de los cambios morfológicos de los testículos y por ende de epidídimo debido a la inmunocastración.

Objetivos Particulares

1. Verificar el efecto de la inmunocastración en el tamaño y peso testicular.
2. Realizar la cuenta de células intersticiales en cortes histológicos para ver el impacto de la inmunocastración en ellas.
3. Detallar los efectos microscópicos en el túbulo seminífero, grado de espermatogénesis, células intersticiales y epidídimo a consecuencia de la inmunocastración y su relación con los cambios en el tamaño y peso testicular y su posible reversibilidad funcional.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos experimentales

El presente trabajo se realizó en una granja comercial ubicada en Atlixco, Puebla, la cual maneja cerdos de raza híbrida terminal en su línea de engorda mediante un programa de producción intensiva. Los animales se encuentran alojados en corrales de 6.00 x 4.00 m con 20-24 cerdos por corral y la dieta se basa en concentrado de 3.8 Mcal/kg de energía metabolizable y 19.5% de proteína cruda; con disponibilidad de agua permanente. Los cerdos utilizados no estuvieron expuestos a ningún cambio en condiciones ambientales.

Diseño experimental

Se utilizó la vacuna Improvac[®] y cada dosis consistió en una inyección subcutánea bajo la oreja de 2 ml del producto. El protocolo de aplicación se realizó de acuerdo a la planeación de la granja de la siguiente manera: la primera dosis a las 11 semanas de vida y la segunda dosis a las 19 semanas de vida; cuatro semanas después de esta última dosis fueron llevados al matadero, esto es, a las 23 semanas de vida. Así, el período de experimentación comprendió 12 semanas (desde la primera dosis hasta llegar al matadero).

Se escogieron aleatoriamente cinco cerdos del lote seleccionado para comenzar con la experimentación; dichos animales sirvieron de control, pues fueron identificados (aretados) para que no recibieran la vacuna anti-GnRH; sin embargo, se encontraron en las mismas condiciones que los demás cerdos de ese lote.

El diseño experimental a seguir se resume en el Cuadro 1 y consistió en lo siguiente:

- **Morfometría macroscópica:** Para evaluar el efecto sobre tamaño testicular se realizaron mediciones del diámetro testicular (dt) con el uso de un vernier a 28 cerdos elegidos al azar a las 3 semanas después de la primera inyección del lote al que pertenecían los cerdos control. Dicha acción se repitió a las 9, 10, 11 y 12 semanas.
- **Morfometría microscópica:** En un grupo de 15 cerdos no sólo se evaluó el efecto anteriormente mencionado sino también el efecto a nivel histológico; a dicho grupo pertenecían los cinco cerdos control y 10 cerdos elegidos al azar. Para ello se midió el diámetro testicular de dos cerdos vacunados y un control y posteriormente fueron castrados quirúrgicamente (cq). Los testículos se pesaron, se midieron nuevamente y se obtuvieron muestras de testículos izquierdo y derecho de cada animal así como de epidídimos para su posterior valoración histológica. Dichas acciones se hicieron en las mismas fechas que las mediciones para evaluar el tamaño testicular, esto es, a las 3, 9, 10, 11 y 12 semanas después de la primera inyección.

<i>Semanas de edad</i>	11	14	19	20	21	22	23
<i>Semanas del experimento</i>	0	3	8	9	10	11	12
<i>Aplicación de vacuna</i>	X		X				
<i>Medición de dt en cerdos vacunados</i>		30		30	30	30	30
<i>Medición de dt en cerdos control</i>		1		1	1	1	1
<i>No. de cq en cerdos control</i>		1		1	1	1	1
<i>No. de cq en cerdos vacunados</i>		2		2	2	2	2

Cuadro 1. Protocolo de experimentación

Para los análisis posteriores, los datos y muestras obtenidas de los cerdos a los que se les realizó castración quirúrgica se identificaron como se muestra en el Cuadro 2.

<i>Período del experimento</i>	<i>Identificación</i>	
	<i>Control</i>	<i>Vacunado</i>
<i>Semana 3</i>	A	1,2
<i>Semana 9</i>	B	3,4
<i>Semana 10</i>	C	5,6
<i>Semana 11</i>	D	7,8
<i>Semana 12</i>	E	9,10

Cuadro 2. Identificación de muestras

Castración quirúrgica (orquiectomía bilateral)

Se realizó bajo anestesia general mediante una combinación de tiletamina con zolazepam (nombre comercial: Zoletil) I.M. a una dosis de 8-10 mg / kg de peso; previa sedación con azaperona (nombre comercial: Sural) I.M. a una dosis de 2 mg / kg de peso.

Análisis histológico

Se tomaron muestras de 1 cm³ de cortes transversales de los epidídimos y de la sección media de los testículos derecho e izquierdo de cada animal castrado y se fijaron en solución de Bouin (75% de ácido pícrico, 24.5% de formol puro y 0.5% de ácido acético) por 24 horas. Posteriormente se procesaron de acuerdo con el método de inclusión en parafina mediante un histoquinete automatizado y se realizaron cortes a un espesor de 5µm con un

microtomo. Dichos cortes se tiñeron con hematoxilina - eosina para valorar estructura histológica.⁴²

Para la cuenta celular se eligieron 12 campos al azar de una muestra testicular de cada cerdo con la finalidad de conocer su población por mm², para ello se utilizó un ocular con retícula micrométrica y el objetivo de 40X.⁴³ (Anexo I)

Para determinar el grado de espermatogénesis se utilizó el método de Johnsen (1970) el cual califica a un túbulo seminífero con un puntaje de 1 a 10 de acuerdo a la presencia o ausencia de las diferentes células espermatogénicas para lo cual se eligieron 30 túbulos al azar de una muestra testicular de cada cerdo para su evaluación con el objetivo 40X (Cuadro 3).⁴⁴

<i>Indice</i>	<i>Características morfológicas</i>
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 por túbulo)
8	No hay espermatozoides maduros, presencia de espermátidas maduras.
7	Gran cantidad de espermátidas.
6	Presencia de pocas espermátidas (5 por túbulo)
5	Gran cantidad de espermatoцитos presentes
4	Pocos espermatoцитos presentes (5 por túbulo)
3	Presencia únicamente de espermatogonias
2	No hay células germinales, sólo están presentes las células de Sertoli
1	No hay células en el túbulo

Cuadro 3. Clasificación del grado de espermatogénesis por el método de Johnsen

Análisis estadístico

El efecto de la inmunocastración en los animales castrados quirúrgicamente sobre la cantidad de células intersticiales, peso y diámetro testicular se analizó mediante la prueba exacta de Fisher y la obtención de la recta de mínimos cuadrados por regresión lineal simple; así mismo se manejó el criterio de excluir aquellos animales que tuvieran un valor más allá de una desviación estándar de la media y repetir el análisis si al comparar estas pruebas resultaran opuestas. Además, se determinaron los coeficientes de correlación de dichas características. El efecto en la espermatogénesis fue observado mediante la prueba exacta de Fisher en base a las medias de los datos obtenidos por el índice de Johnsen.

El efecto progresivo sobre tamaño testicular se examinó mediante un análisis de varianza (ANOVA), considerando serie de tiempos, en base a todas las mediciones realizadas en cerdos inmunocastrados en el período de experimentación.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa computacional Statistical Package for the Social Science (SPSS, versión 16.0) y para efectos de interpretación de las pruebas utilizadas se consideraron como significativas aquellas en las que se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Cambios en células testiculares y epidídimo

1) Semana 3: Los testículos y epidídimos de los cerdos 1 y 2 tuvieron patrones similares a los del cerdo A, esto es, las células intersticiales tenían forma irregular, ausencia de espermatidas y espermatozoides en la luz tubular así como de estos en epidídimo y pocas células en línea germinal; sin embargo, los cerdos inmunocastrados presentaron descamación ligera y vacuolización en epitelio germinal y del epidídimo, así como picnosis nuclear (incremento de basofilia del núcleo) de células intersticiales y germinales. (Figuras 2a y 2b).

2) Semana 9: Los testículos y epidídimos del cerdo B difieren de los del cerdo A ya que el volumen de las células intersticiales se incrementó (se hipertrofiaron) así como el epitelio germinal y del epidídimo; incluso ya hay presencia de espermatidas y espermatozoides en los túbulos seminíferos y espermatozoides en el lumen de epidídimo. Por otro lado, tienen similitud con el cerdo 3, no así para el cerdo 4 ya que presenta variabilidad en la hipertrofia de las células intersticiales siendo en la mayoría mínima y el epitelio del epidídimo muestra vacuolización y hay ausencia de espermatozoides en el lumen de éste. (Figuras 3a y 3b).

3) Semana 10: Los testículos y epidídimos del cerdo C se mantienen igual al cerdo B; no obstante la comparación de los testículos con los cerdos 5 y 6 muestra una disminución del volumen de las células intersticiales (más evidente en 5 que en 6) así como en la presencia de espermatozoides (Figura 4a). Por su parte, el epidídimo del cerdo 5 muestra daño estereociliar y del epitelio así como desorganización celular con poca presencia de

espermatozoides en el lumen mientras que el epidídimo del cerdo 6 no muestra dichas alteraciones pero los espermatozoides se encuentran ausentes (Figura 4b).

4) Semana 11: Los testículos del cerdo D presentan diferencia con el cerdo C ya que hay hipertrofia de las células intersticiales y algunos túbulos tienen bastantes espermátidas y espermatozoides; mientras que los epidídimos son muy similares. En cuanto a los testículos de los cerdos vacunados existen ciertas diferencias. Las características del epidídimo y las células intersticiales del testículo del cerdo 7 son iguales a las del control D; sin embargo, hay una rara presencia de espermatozoides así como una desorganización del epitelio germinal. Por su parte, los testículos del cerdo 8 muestran una marcada disminución del volumen de células intersticiales contra el control D pero el epitelio germinal y la presencia de espermatozoides es similar. Así mismo, el lumen del epidídimo del cerdo 8 carece de espermatozoides (Figuras 5a y 5b).

5) Semana 12: Los testículos y epidídimos del cerdo E muestran mayor cantidad de espermatozoides que D; por su parte, los testículos de los cerdos vacunados 9 y 10 presentan una disminución de espermatozoides e incluso se encuentran dañados y desorganización celular del epitelio germinal, así mismo la disminución del volumen de las células intersticiales es evidente (Figura 6a). Las células del epitelio del epidídimo disminuyeron así como los estereocilios se encuentran dañados; la presencia de espermatozoides es mínima en epidídimo del cerdo 9 mientras que en el 10 simplemente no los hay (Figura 6b).

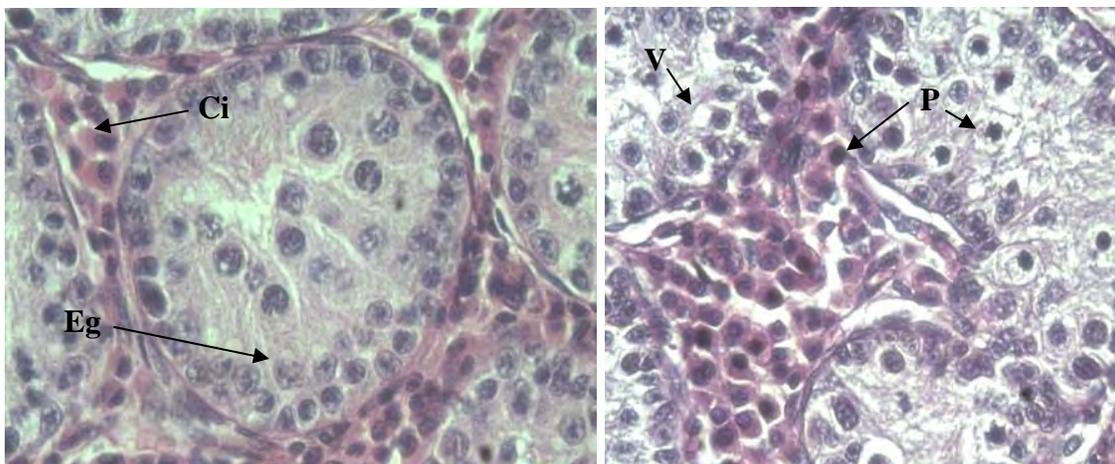


Figura 2a. Microfotografía de cortes transversales de los testículos en la semana 3 del período de experimentación que muestra la presencia de núcleos picnóticos de células intersticiales y germinales y vacuolización de células germinales en un cerdo inmunocastrado comparado con el cerdo control. Izquierda: Cerdo A. Derecha: Cerdo 1. Eg = Epitelio germinal. Ci = Células intersticiales. V = Vacuolas. P = Núcleos picnóticos. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

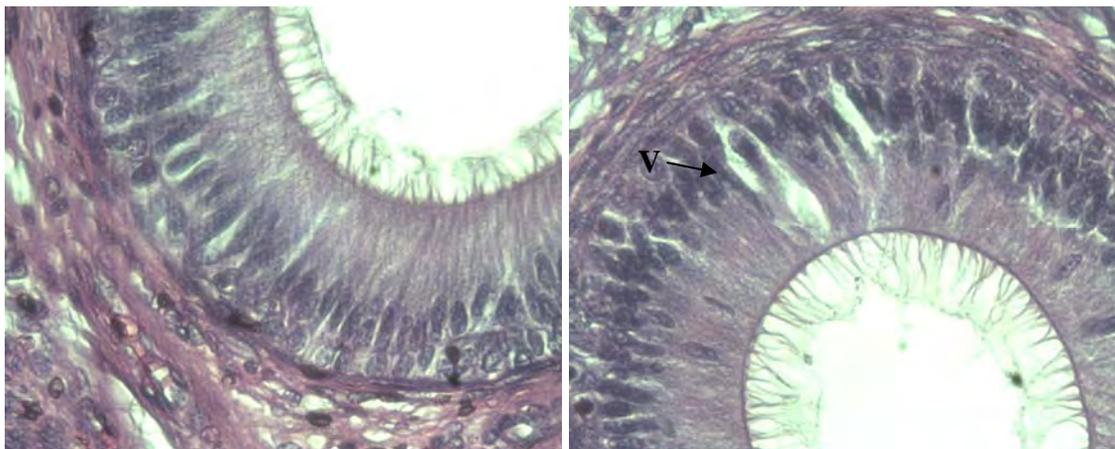


Figura 2b. Microfotografía de cortes transversales de los epidídimos en la semana 3 del período de experimentación que muestra la vacuolización del epitelio en un cerdo inmunocastrado comparado con el cerdo control. Izquierda: Cerdo A, Derecha: Cerdo 2. V = Vacuolas. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

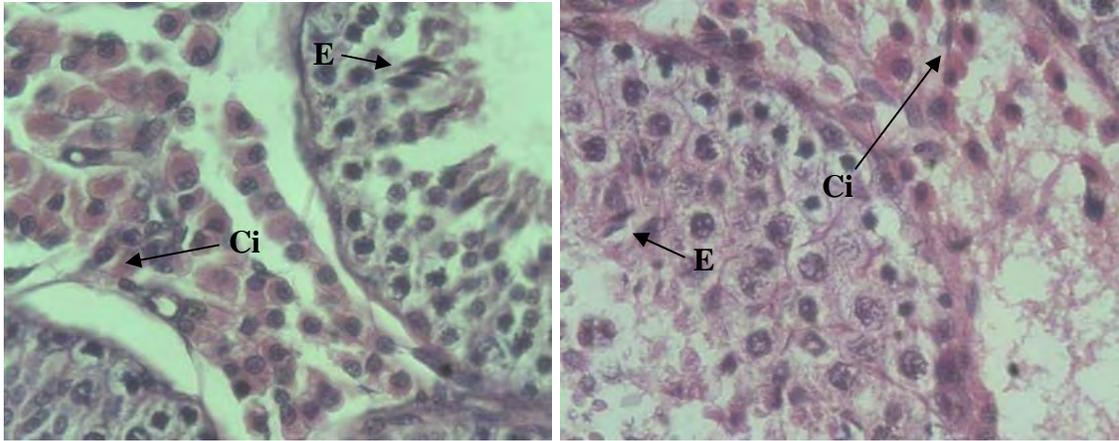


Figura 3a. Microfotografía de cortes transversales de los testículos en la semana 9 del período de experimentación que muestra la presencia de espermatidas tanto en el cerdo inmunocastrado como en el control y la hipertrofia de células intersticiales la cual es menor en el cerdo inmunocastrado. Izquierda: Cerdo B, Derecha: Cerdo 4. E = Espermatidas. Ci = Células intersticiales. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

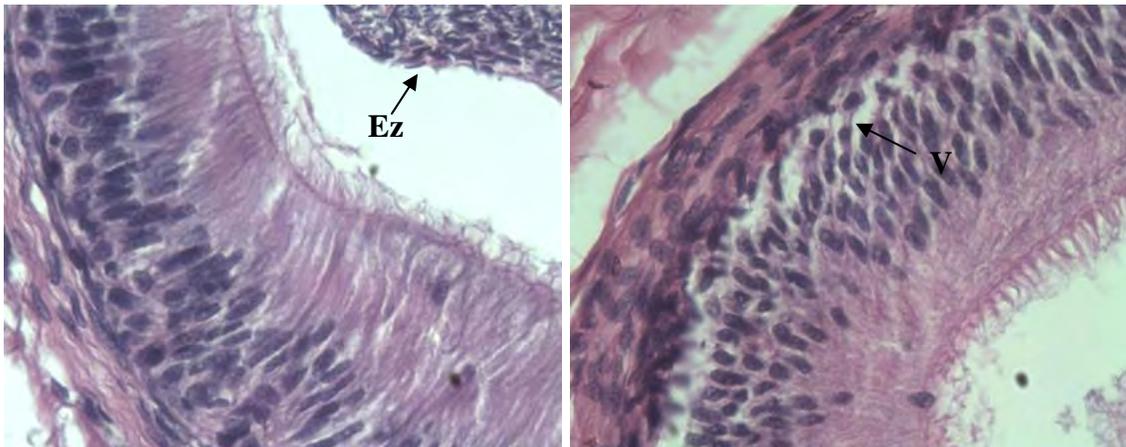


Figura 3b. Microfotografía de cortes transversales de los epidídimos en la semana 9 del período de experimentación que muestra la presencia de espermatozoides en el cerdo control contrario a un cerdo inmunocastrado y la vacuolización del epitelio en un cerdo inmunocastrado. Izquierda: Cerdo B, Derecha: Cerdo 4. Ez = Espermatozoides. V = Vacuolas. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

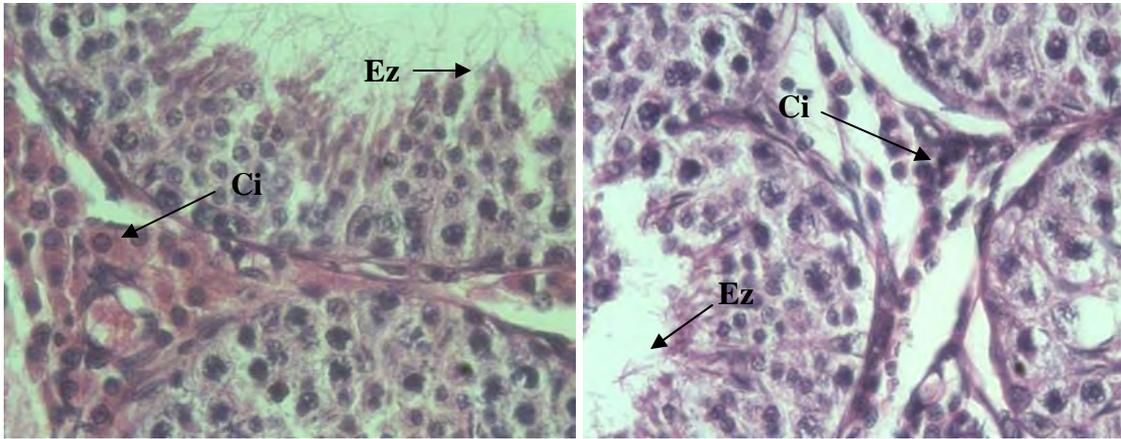


Figura 4a. Microfotografía de cortes transversales de los testículos en la semana 10 del período de experimentación que muestra la disminución del volumen de las células intersticiales y la menor cantidad de espermatozoides en un cerdo inmunocastrado comparado con el cerdo control. Izquierda: Cerdo C, Derecha: Cerdo 5. Ez = Espermatozoides. Ci = Células intersticiales. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

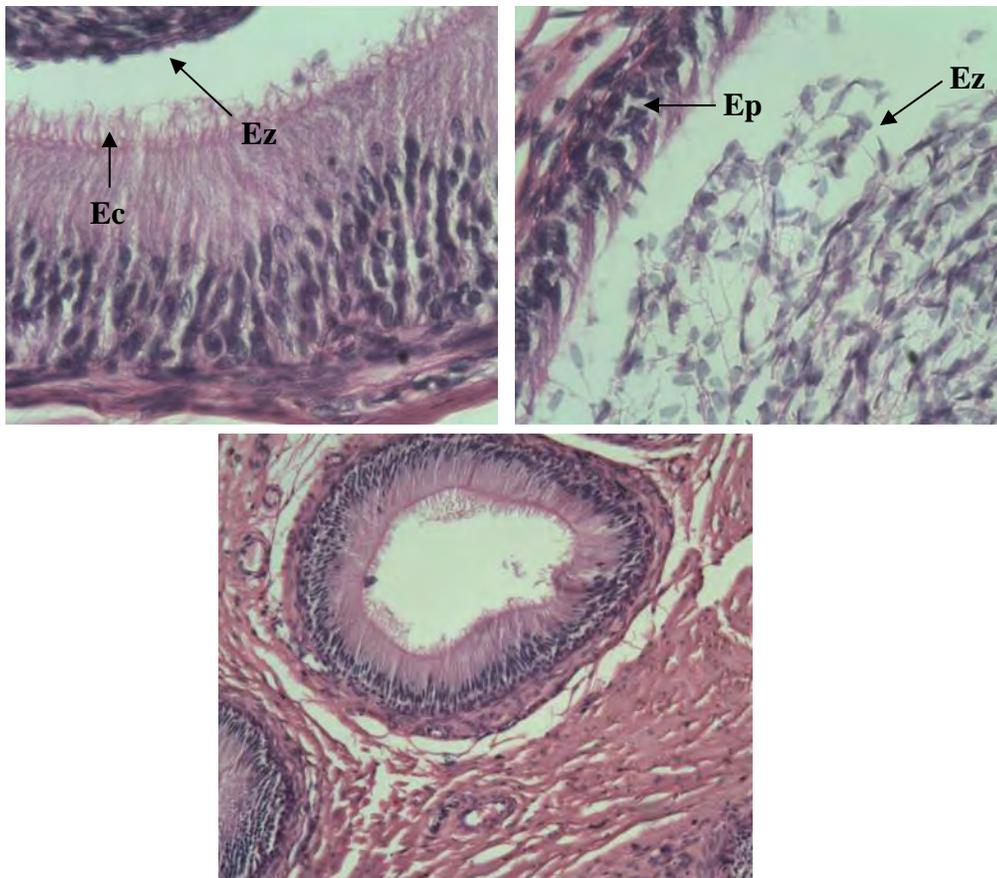


Figura 4b. Microfotografía de cortes transversales de los epidídimos en la semana 10 del período de experimentación que muestra el daño estereociliar y del epitelio así como la disminución o ausencia de espermatozoides en un cerdo inmunocastrado comparado con el cerdo control. Izquierda arriba: Cerdo C, Derecha arriba: Cerdo 5, Abajo: Cerdo 6. Ez = Espermatozoides. Ec = Estereocilios. Ep = Epitelio. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X (Arriba) y 100X (Abajo).

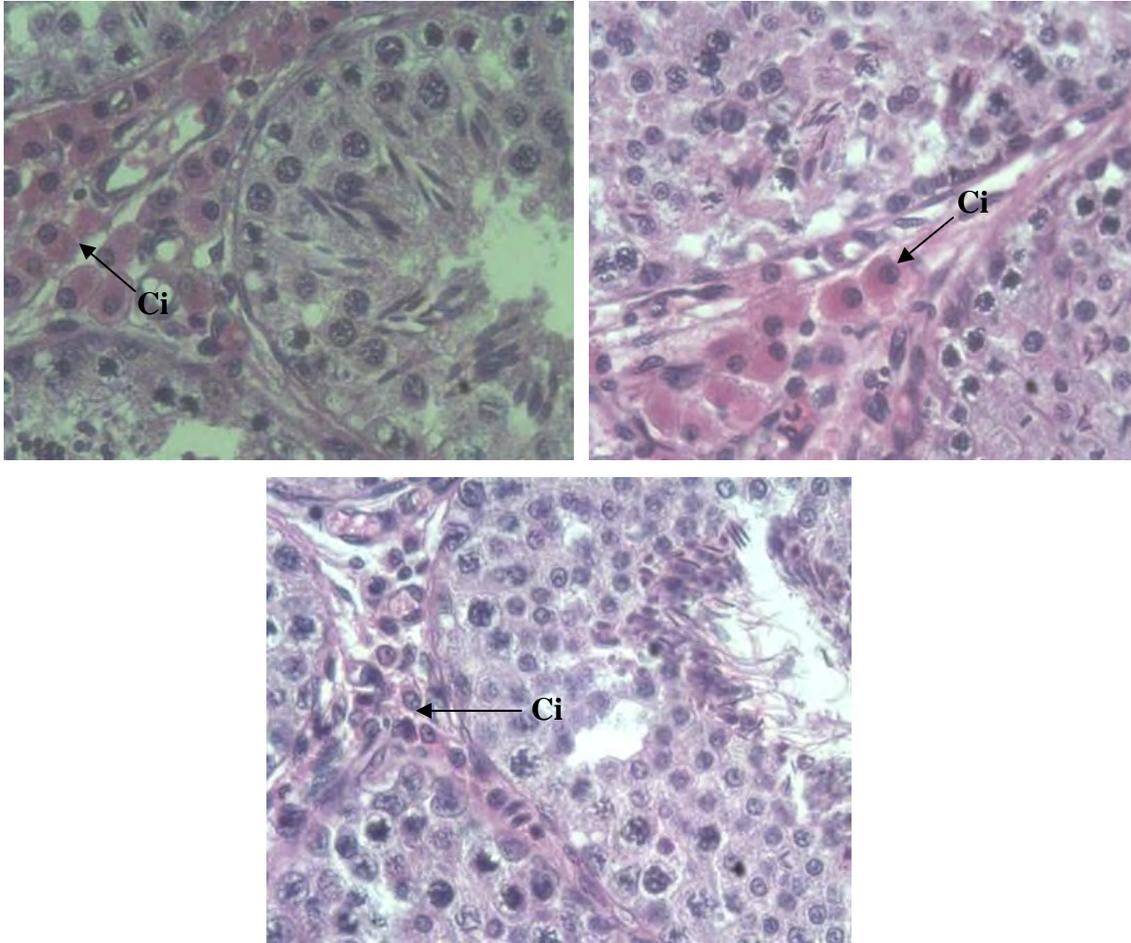


Figura 5a. Microfotografía de cortes transversales de los testículos en la semana 11 del período de experimentación que muestra la variabilidad en la disminución del volumen de las células intersticiales entre cerdos inmunocastrados comparados con el cerdo control. Izquierda arriba: Cerdo D, Derecha arriba: Cerdo 7, Abajo: Cerdo 8. Ci = Células intersticiales. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

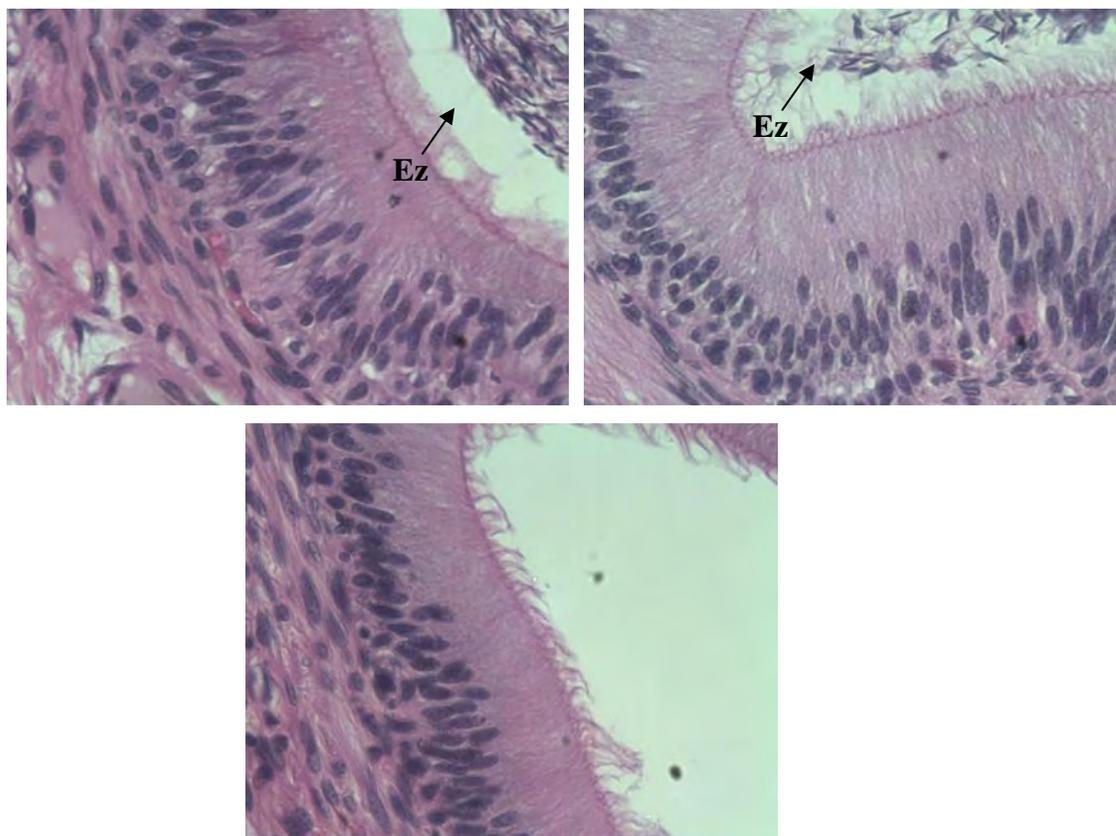


Figura 5b. Microfotografía de cortes transversales de los epidídimos en la semana 11 del período de experimentación que muestra la disminución o ausencia de espermatozoides en un cerdo inmunocastrado comparado con el cerdo control. Izquierda arriba: Cerdo D, Derecha arriba: Cerdo 7, Abajo: Cerdo 8. Ez = Espermatozoides. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

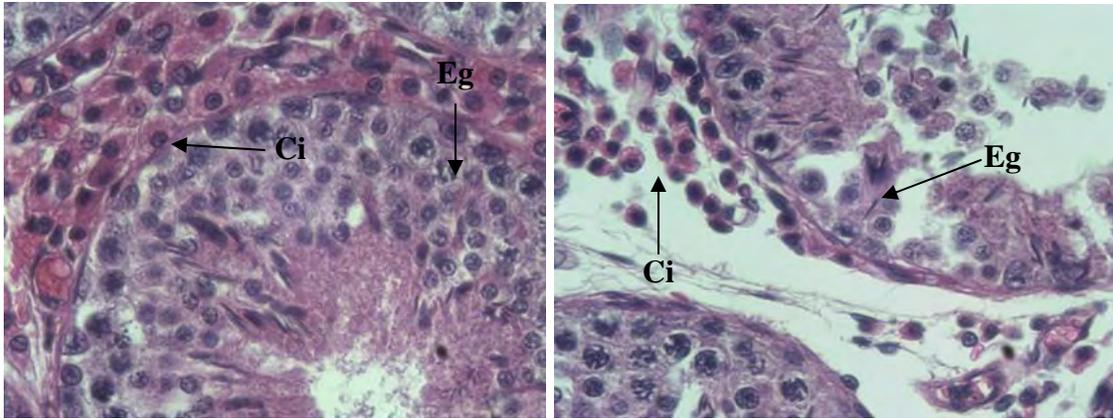


Figura 6a. Microfotografía de cortes transversales de los testículos en la semana 12 del período de experimentación que muestra la disminución del volumen de las células intersticiales y desorganización celular del epitelio germinal. Izquierda. Cerdo E, Derecha: Cerdo 10. Eg = Epitelio germinal. Ci = Células intersticiales. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

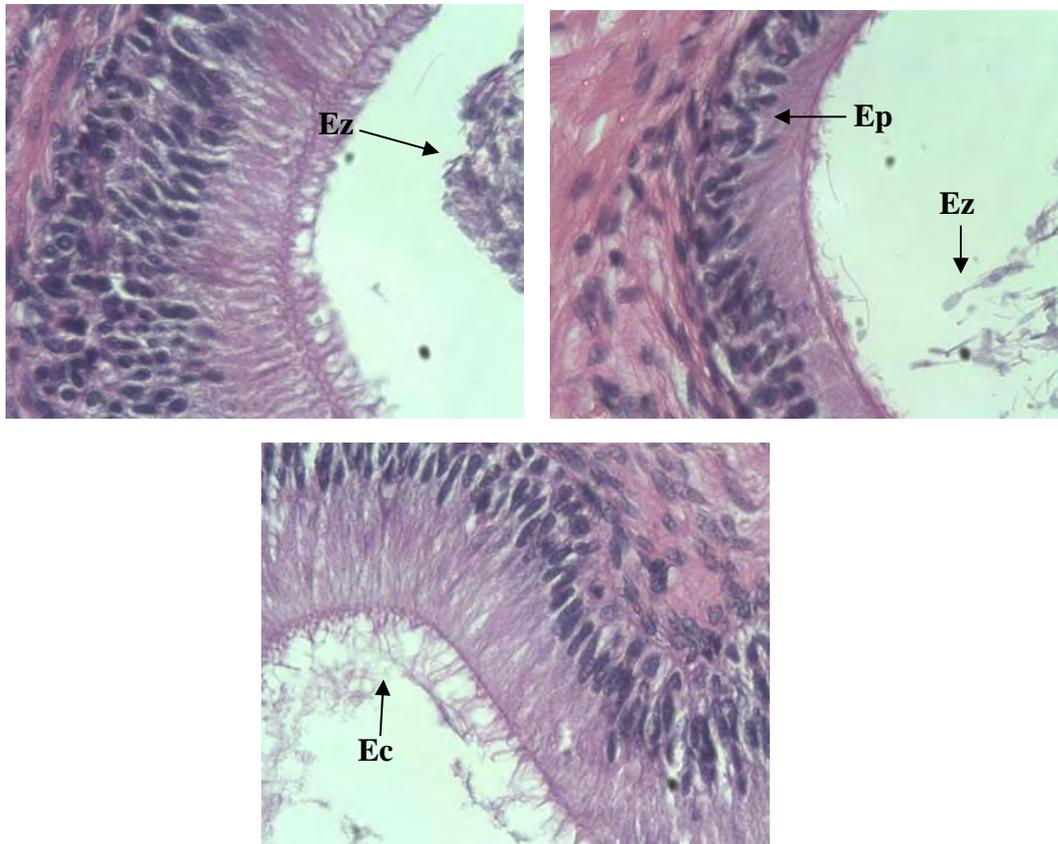


Figura 6b. Microfotografía de cortes transversales de los epidídimos en la semana 12 del período de experimentación que muestra el daño estereociliar y del epitelio así como la disminución o ausencia de espermatozoides en un cerdo inmunocastrado comparado con el cerdo control. Izquierda arriba: Cerdo E, Derecha arriba: Cerdo 9, Abajo: Cerdo 10. Ez = Espermatozoides. Ec = Estereocilios. Ep = Epitelio. Hematoxilina-Eosina, con un aumento total de 400X.

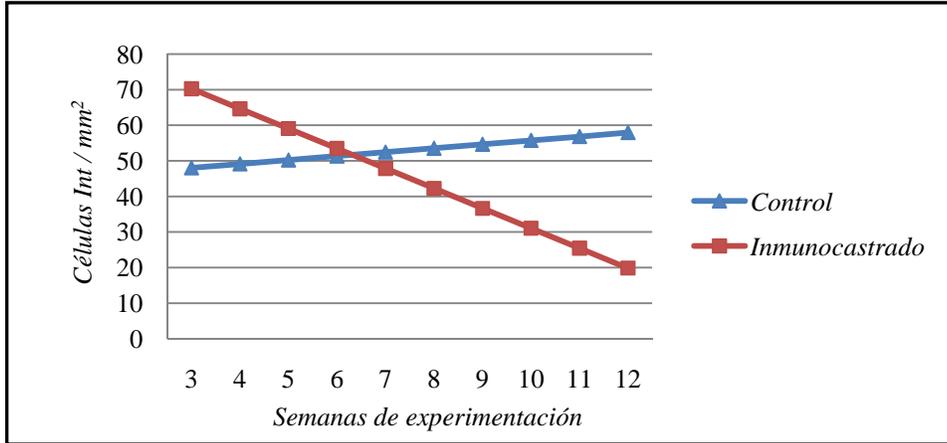
Correlación entre número de células intersticiales, peso y diámetro testicular

El Anexo II muestra los datos obtenidos de la cuenta celular, medición de peso y diámetro testicular. Mediante dichos datos se calculó el efecto de la vacuna sobre el número de células intersticiales (Células Int), el peso (P) y diámetro testicular antes (DT1) y después (DT2) de la castración quirúrgica tanto de testículo izquierdo como derecho (Cuadro 4). El peso y diámetro testicular de los cerdos inmunocastrados es significativamente menor ($P < 0.05$) mientras que el número de células intersticiales no muestra diferencia significativa ($P > 0.05$).

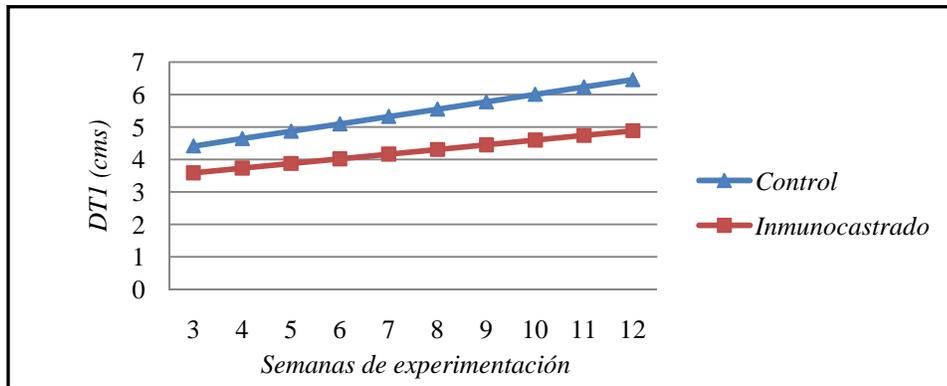
Los resultados obtenidos de la recta de mínimos cuadrados muestran que a lo largo del período las células intersticiales de los cerdos inmunocastrados disminuyen, contrario a los controles que van en aumento mientras que el peso y diámetro testicular si presentan un aumento constante durante el período, pero menor al de los cerdos control (Gráficas 1a,b,c,d).

<i>Característica</i>	<i>Control</i>	<i>Inmunocastrado</i>	<i>Valor de P</i>
<i>Células Int (por mm²)</i>	54.65±15.75	40.51±17.93	0.159
<i>DT1 (cms, derecho)</i>	5.69±1.14	4.33±0.53	0.007
<i>DT1 (cms, izquierdo)</i>	5.87±1.05	4.56±0.60	0.012
<i>DT2 (cms, derecho)</i>	5.42±1.07	4.15±0.71	0.008
<i>DT2 (cms, izquierdo)</i>	5.49±1.06	4.22±0.80	0.009
<i>P (gramos, derecho)</i>	180.40±78.61	87.30±37.91	0.017
<i>P (gramos, izquierdo)</i>	200.60±94.33	94.60±44.41	0.022

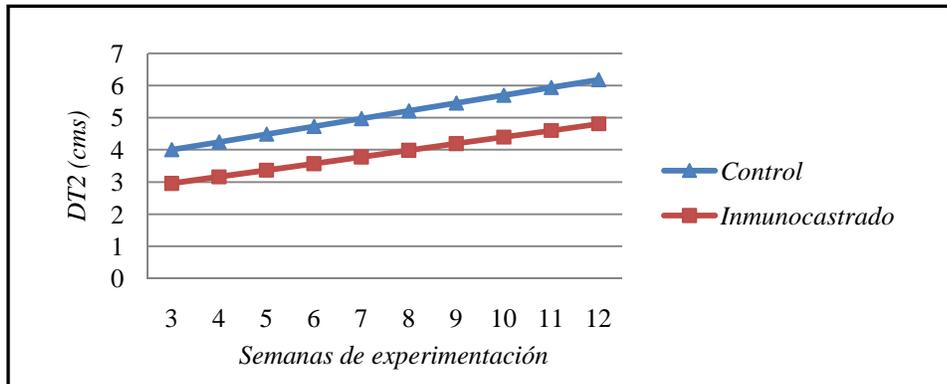
Cuadro 4. Efecto de la inmunocastración sobre el número de células intersticiales, peso y diámetro testicular (se presentan las medias de los valores ± desviación estándar)



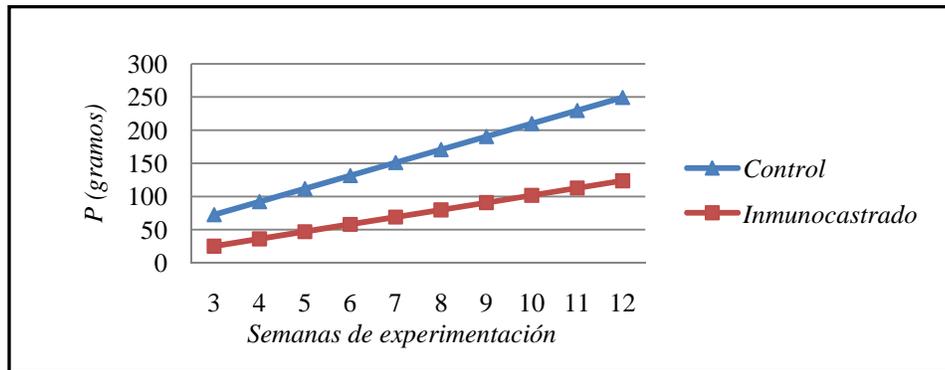
Gráfica 1a. Comportamiento de células intersticiales. (Recta de mínimos cuadrados)



Gráfica 1b. Comportamiento del diámetro testicular (con escroto). (Recta de mínimos cuadrados)



Gráfica 1c. Comportamiento del diámetro testicular (sin escroto). (Recta de mínimos cuadrados)



Gráfica 1d. Comportamiento del peso testicular. (Recta de mínimos cuadrados)

Los resultados de ambas pruebas resultaron opuestos; así, se eliminaron a los animales control que tuvieron un valor más allá de una desviación estándar de la media. El control D con un valor de 32 células intersticiales / mm^2 fue excluido y los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 5; el peso y diámetro testicular de los cerdos inmunocastrados permanece significativamente menor ($P < 0.05$), con excepción de DT2 izquierdo; y el número de células intersticiales sigue sin mostrar diferencia significativa ($P > 0.05$) pero con un valor menor que en la primera prueba ($P = 0.066$).

El peso y diámetro testicular en los animales inmunocastrados se encuentran correlacionados en más del 85%; sin embargo, estas variables tienen una correlación indirecta de un 70-85% con el número de células intersticiales (Cuadro 6).

<i>Característica</i>	<i>Control</i>	<i>Inmunocastrado</i>	<i>Valor de P</i>
<i>Células Int (por mm²)</i>	48.18±28.60	40.51±17.93	0.066
<i>DT1 (cms, derecho)</i>	5.57±1.28	4.33±0.53	0.021
<i>DT1 (cms, izquierdo)</i>	5.71±1.18	4.56±0.60	0.037
<i>DT2 (cms, derecho)</i>	5.28±1.18	4.15±0.71	0.047
<i>DT2 (cms, izquierdo)</i>	5.34±1.17	4.22±0.80	0.060
<i>P (gramos, derecho)</i>	168.50±85.42	87.30±37.91	0.037
<i>P (gramos, izquierdo)</i>	179.50±94.33	94.60±44.41	0.022

Cuadro 5. Efecto de la inmunocastración sobre el número de células intersticiales, peso y diámetro testicular eliminando al control D (se presentan las medias de los valores ± desviación estándar).

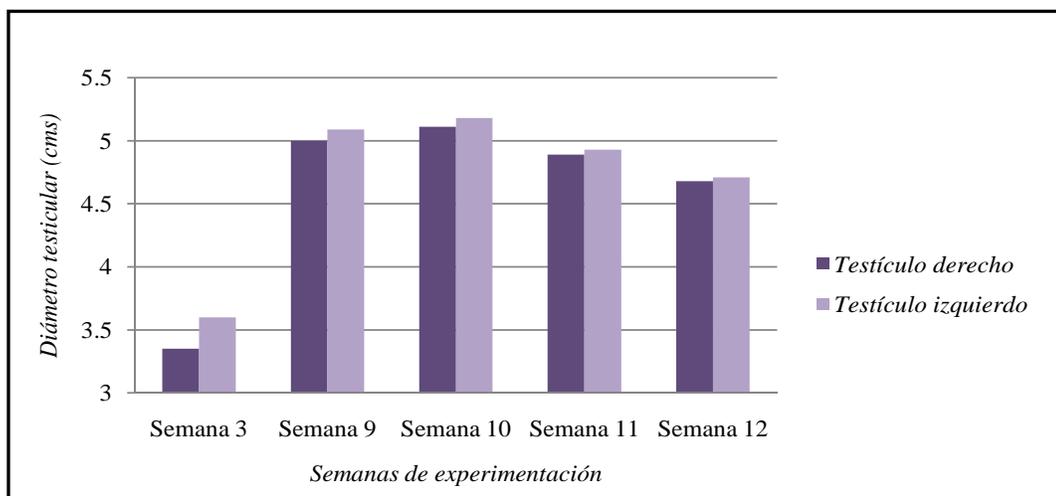
	<i>DT1 der</i>	<i>DT1 izq</i>	<i>DT2 der</i>	<i>DT2 izq</i>	<i>P der</i>	<i>P izq</i>
<i>CélulasInt</i>	-0.8479	-0.7450	-0.8957	-0.8526	-0.8816	-0.8661
<i>DT1 der</i>		0.9539	0.9749	0.9365	0.9434	0.9164
<i>DT1 izq</i>			0.9307	0.9041	0.8594	0.8526
<i>DT2 der</i>				0.9832	0.9617	0.9387
<i>DT2 izq</i>					0.9493	0.9329
<i>P der</i>						0.9810

Cuadro 6. Coeficientes de correlación para el número de células intersticiales, peso y diámetro testicular.

Efecto progresivo en diámetro testicular

El diámetro testicular presenta un incremento entre la semana 3 y la semana 9 pero después de ello empieza a disminuir periódicamente (Gráfica 2). Así, tanto el diámetro en testículo derecho como izquierdo presenta un aumento significativo ($P < 0.05$) entre la semana 3 y la semana 9; de esta semana a la semana 10 el tamaño testicular no se modifica ($P > 0.05$) y posteriormente, a la semana 11 existe una disminución significativa ($P < 0.05$). De la semana

11 a la semana 12 el tamaño del testículo derecho se mantiene ($P>0.05$) mientras que el izquierdo sigue disminuyendo significativamente ($P<0.05$). (Cuadro 7).



Gráfica 2. Efecto progresivo del diámetro testicular izquierdo y derecho (media de valores de todos los cerdos inmunocastrados)

<i>Semanas</i>	<i>Testículo derecho</i>	<i>Testículo Izquierdo</i>
3-9	0.0000	0.0000
9-10	0.1644	0.2295
10-11	0.0000	0.0000
11-12	0.1808	0.0000

Cuadro 7. Diferencias significativas en tamaño testicular entre las semanas de experimentación (valores de P)

Efecto en espermatogénesis

La espermatogénesis en la semana 3 (animales A, 1 y 2) no se encuentra completamente desarrollada ya que la presencia de espermátidas en los túbulos seminíferos es escasa volviéndose nula en los animales inmunocastrados (no hay valores de 6 o más). En las

semanas posteriores la espermatogénesis es variable tanto en animales control como inmunocastrados; con valores mayores a 7 en animales control y presencia de algunos 6 en inmunocastrados. (Cuadro 8a y 8b) (Anexo III). Sin embargo, la comparación entre animales control e inmunocastrados respecto al grado de espermatogénesis no presenta diferencia estadística significativa ($P=0.817$).

<i>Animal</i>	<i>Media</i>	<i>Desv est</i>	<i>Máx</i>	<i>Min</i>
<i>A</i>	5.03	0.85	7	4
<i>B</i>	9.33	0.71	10	8
<i>C</i>	9.5	0.82	10	7
<i>D</i>	9.07	0.98	10	7
<i>E</i>	8.9	1.03	10	7

Cuadro 8a. Índice de espermatogénesis en animales control

<i>Animal</i>	<i>Media</i>	<i>Desv est</i>	<i>Máx</i>	<i>Min</i>
<i>1</i>	3.57	0.63	5	3
<i>2</i>	3.4	0.5	4	3
<i>3</i>	9.5	0.82	10	7
<i>4</i>	8.97	1.3	10	6
<i>5</i>	9.5	0.9	10	7
<i>6</i>	9.37	1	10	7
<i>7</i>	8	1.07	10	7
<i>8</i>	9.6	0.86	10	6
<i>9</i>	9.5	0.9	10	7
<i>10</i>	9.3	1.29	10	6

Cuadro 8b. Índice de espermatogénesis en animales inmunocastrados

DISCUSIÓN

Hasta donde se tiene conocimiento, no existen estudios que hayan evaluado el efecto de la inmunocastración en la morfología testicular y del epidídimo a diferentes períodos desde la primera dosis de aplicación hasta la muerte en condiciones naturales de una granja y con el diseño experimental adaptado a su calendario de vacunación anti-GnRH.

Estudios basados en niveles hormonales y de anticuerpos hallaron que después de la primera dosis no existe alteración evidente en los animales inmunocastrados (hay presencia de anticuerpos pero el tamaño testicular y los niveles de hormonas no se afectan);^{34,35,36} sin embargo, en este estudio se observó que el parénquima testicular presenta evidencias de muerte y daño celular tales como vacuolización, picnosis y descamación; así mismo el epidídimo presenta daño epitelial, probablemente como producto de la ausencia de testosterona.⁴⁵ Un estudio realizado en ratas menciona que ante la ausencia de GnRH aumenta la apoptosis de las células germinales solamente,⁴⁶ pero en el presente estudio se observó tanto en las células germinales como intersticiales. Además, los animales inmunocastrados no muestran espermátidas como el animal control; sin embargo, ya que cada individuo puede presentar la pubertad a diferentes intervalos,¹ no puede asegurarse que es un efecto de la inmunocastración.

Posterior a la segunda dosis, los cambios morfológicos se vuelven más evidentes desde la primer semana siguiente pues los controles demuestran la existencia de la espermatogénesis debido a la presencia de espermatozoides en epidídimo; sin embargo los animales inmunocastrados muestran alteraciones tales como la disminución consecutiva en el tamaño de las células intersticiales, disminución de células en la línea germinal, principalmente

espermáticas y espermatozoides, hasta la ausencia de espermatozoides en epidídimo a partir de la semana 9 del período de experimentación. Dichas alteraciones varían entre cada animal pero para la última semana los daños son similares, coincidiendo con otros estudios que reportan hallazgos después de la muerte.^{38,39,47}

Estos cambios podrían explicar los resultados de un estudio realizado en animales inmunocastrados con dos dosis a las ocho y cuatro semanas antes de la muerte, donde se observó disminución de nivel de testosterona y tamaño testicular dos semanas después de la segunda dosis.³⁴

Además, se ha visto que los niveles de ICSH (LH) y testosterona disminuyen significativamente producto de la inmunización; sin embargo, en la especie porcina solamente, los niveles de FSH no se afectan y aunque aún se desconoce la causa, se alude que quizá exista un componente independiente de FSH a la GnRH en los cerdos.^{39,48}

Probablemente por esta razón las principales alteraciones morfológicas se presentaron en las células intersticiales, en los estados tardíos de las células germinales y epidídimo.⁴⁹

Se han realizado investigaciones en otras especies sobre el efecto de la inmunocastración en la morfología testicular, los cuales exponen hallazgos similares a este estudio. Por ejemplo, en ratas se observa disminución de células germinales y peso testicular⁵⁰ y en borregos también se ha visto disminución de células germinales así como ausencia de espermatozoides en epidídimo y alteración en la espermatogénesis.⁵¹

Ya que la recta de mínimos cuadrados da una vista más general de datos provenientes de una muestra pequeña que se encuentran ampliamente dispersos⁵² se puede ver que el número de células intersticiales en los animales control va aumentando contrario a los animales inmunocastrados (Gráfica 1a). Así mismo, la correlación de número de células intersticiales con diámetro y peso testicular es negativa, esto es, mientras el número de

células disminuye el tamaño testicular aumenta (Cuadro 6). Considerando que todas las células testiculares aumentan en número pero la densidad del volumen de los túbulos seminíferos respecto al volumen total testicular se incrementa del 40% al 90%; mientras que el tejido intersticial pasa del 60% al 10% en los cerdos machos al llegar a la pubertad entre los cuatro y cinco meses de edad (17-22 semanas),⁵³ se considera que no hay efecto significativo en el número de células intersticiales coincidiendo con los resultados obtenidos por Wagner *et al.*, 2004.³⁹ Así, el incremento en el peso y diámetro testicular en los animales inmunocastrados no se ve afectado, pues está directamente relacionado con la producción espermática diaria de un macho adulto.⁵⁴ Pero debido a las alteraciones morfológicas, la velocidad de incremento es menor; por lo cual se demuestra un efecto significativo de la vacuna anti-GnRH, coincidiendo con otros estudios que han evaluado dicha característica pero que no es determinante como ausencia de olor sexual porque algunos animales pueden presentar testículos pequeños con niveles altos de androstenona y viceversa.^{34, 36, 55, 56, 57}

Analizando el efecto progresivo en diámetro testicular durante el período en animales inmunocastrados se puede ver que existe un marcado aumento entre la semana 3 y la 9 (Gráfica 2), los cambios morfológicos muestran que en este lapso los animales están entrando a la pubertad,¹² el efecto no es significativo entre la semana 9 y 10, mientras que a la semana 11 disminuye el tamaño y al finalizar el efecto varía entre testículo izquierdo y derecho por razones desconocidas a pesar que se ha estudiado que no existen diferencias entre ambos testículos⁵⁸ (Cuadro 7). Así, los cambios morfológicos son consecutivos desde la segunda dosis a la muerte y no marcan un efecto significativo de la semana 10 a la 11, lo cual sería un motivo más para determinar que el tamaño testicular no puede correlacionarse con la ausencia de olor sexual. Por otro lado, en este estudio no se midieron niveles

hormonales ni de androstenona y/o escatol por lo que simplemente se describe lo que sucede a nivel morfológico y no si efectivamente hay ausencia de olor sexual.

El aumento de tamaño de células intersticiales en los cerdos durante la pubertad conlleva una gran cantidad de receptores a ICSH,⁵⁹ por lo tanto, su disminución en tamaño sugiere una gran pérdida de estos receptores lo que permite un lapso amplio antes de su reacción ante la presencia de ICSH.⁶⁰ Así, como las células intersticiales no se ven afectadas en número, la espermatogénesis tampoco muestra efecto significativo por la vacuna anti-GnRH, a pesar que los animales inmunocastrados llegan a presentar algunos índices más bajos que los controles; lo anterior prueba la posible reversibilidad funcional de los testículos reportada 22 semanas después de la segunda dosis.^{29, 61}

Por otro lado, a pesar que la vacuna es recomendada con 4 a 5 semanas de diferencia entre la primera y segunda dosis, el estudio demostró que la vacuna tiene efecto aunque este período se incremente por diversas situaciones que pueda atravesar una granja.

CONCLUSIONES

Los resultados en este estudio mostraron que la vacuna anti-GnRH afecta morfológicamente los testículos desde la primera dosis de aplicación pues hay evidencia de muerte celular; sin embargo, las alteraciones son más evidentes después de la segunda dosis de aplicación presentando además disminución del volumen de células intersticiales por la ausencia de ICSH evidenciado por las alteraciones en epidídimo, incluso si el tiempo entre la primera y segunda dosis es mayor al recomendado por el fabricante. Así mismo, el peso y tamaño testicular se ve alterado, pero no por el número de células intersticiales sino por su morfología y por los cambios en el epitelio germinal, pero ya que las observaciones son variables en cada animal, estas características no son determinantes para comprobar la acción de la inmunocastración. Por otro lado, la existencia de la espermatogénesis hasta el final del período de experimentación demostró la posible reversibilidad funcional testicular.

REFERENCIAS

1. Hughes PE, Varley MA. Reproducción del cerdo. España: Acribia, 1984.
2. Hafez ES, Jainudeen MR, Rosnina Y. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: Hafez ES, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. South Carolina: McGraw-Hill, 2000: 33-55.
3. Bonneau M. Compounds responsible for boar taint, with special emphasis on androstenone: a review. *Livest Prod Sci* 1982; 9: 687-707.
4. Lundström K, Malmforms B, Stern S, Rydhmer L, Eliasson-Selling L, Mortensen AB, Mortensen HP. Skatole levels in pigs selected for high lean tissue growth rate on different dietary protein levels. *Livest Prod Sci* 1994; 38: 125-132.
5. Andersson K, Schaub A, Andersson K, Lundström K, Thomke S, Hansson I. The effects of feeding system, lysine level and gilt contact on performance, skatole levels and economy of entire male pigs. *Livest Prod Sci* 1997; 51: 131-140.
6. Robic A, Larzul C, Bonneau M. Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue: a review. *Genet Sel Evol* 2008; 40: 129-143.
7. Carrol JA, Berg EL, Strauch TA, Roberts MP, Kattesh HG. Hormonal profiles, behavioral responses, and short-term growth performance after castration of pigs at three, six, nine, or twelve days of age. *J Anim Sci* 2006; 84: 1271-1278.
8. Mackinnon JD, Pearce MC. Improvac (Pfizer animal health): an immunological product for the control of boar taint in male pigs. *The Pig Journal* 2007; 59: 29-67.

9. Stabenfeldt GH, Edqvist L. Procesos de la reproducción en el macho. En: Swenson MJ, Reece WO. Fisiología de los animales domésticos de Dukes. Uteha, 1999: 665-677.
10. Wrobel KH, Dellman HD. Sistema reproductor masculino. En: Dellman HD. Histología Veterinaria. Pennsylvania: Acribia, 1993: 245-266.
11. Blanco A, García J. Aparato genital masculino. En: Gázquez-Ortíz A. Tratado de histología veterinaria. Barcelona: Masson, 2004: 363-380.
12. Martínez Gamba RG. Principales factores que afectan la reproducción en el cerdo. Ciencia Veterinaria 1998; 8: 187-222.
13. Fuentes A, Lago de S G, Chang A, Semidey de S G, Regueiro C, Soler L. Pubertad en machos porcinos. I. Biometría testicular. Zootecnia Trop 1995; 13: 151-162.
14. Hemsworth PH, Tilbrook AJ. Sexual behavior of male pigs. Hormones and Behavior 2007; 52: 39-44.
15. Zamaratskaia G, Rydhmer L, Chen G, Madej A, Andersson HK, Lundström K. Boar taint is related to endocrine and anatomical changes at puberty but not to aggressive behavior in entire male pigs. Reprod Dom Anim 2005; 40: 500-506.
16. Jaros P, Bürgi E, Stärk KDC, Claus R, Hennessy D, Thun R. Effect of active immunization against GnRH on androstenone concentration, growth performance and carcass quality in intact male pigs. Livest Prod Sci 2005; 92: 31-38.
17. Kochakian CD, Tillotson C. Myotrophic effects of castration and testosterone in thyroidectomized guinea pigs. Am J Physiol 1957; 189: 425-427.
18. Xue J, Dial GD, Holton EE, Vickers Z, Squires EJ, Lou Y, Godbout D, Morel N. Breed differences in boar taint: relationship between tissue levels of boar taint compounds and sensory analysis of taint. J Anim Sci 1996; 74: 2170-2177.

19. Wysocki CJ, Beauchamp GK. Ability to smell androstenone is genetically determined. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 4899-4902.
20. Yost GS. Mechanisms of 3-methylindole pneumotoxicity. *Chem Res Toxicol* 1989; 2:273-279.
21. Zamarataskaia G. Factors involved in the development of boar taint (tesis de doctorado). Uppsala Suecia: Swedish University of Agricultural Sciences, 2004.
22. Babol J, Squires EJ, Lundström K. Relationship between metabolism of androstenone and skatole in intact male pigs. *J Anim Sci* 1999; 77: 84-92.
23. Clarke I, Walker J, Hennessy D, Kreeger J, Nappier J, Crane J. Inherent food safety of a synthetic gonadotropin-releasing factor (GnRF) vaccine for the control of boar taint in entire male pigs. *Intern J Appl Res Vet Med* 2008; 6: 7-14.
24. Walstra P, Claudi-Magnussen P, Chevillon C, von-Seth G, Diestre A, Matthews KR, Homer DB, Bonneau M. An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: levels of androstenone and skatole by country and season. *Livest Prod Sci* 1999; 62: 15-28.
25. McGlone JJ, Nicholson RI, Hellman JM, Herzog DN. The development of pain in young pigs associated with castration and attempts to prevent castration-induced behavioral changes. *J Anim Sci* 1993; 71: 1441-1446.
26. Van Wagenen G. Some effects of early castration on the growth of the male rat. *Am J Physiol* 1928; 84: 461-467.
27. PIGCAS Attitudes, practices and state of the art regarding piglet castration in Europe. Final report. (página en internet). Newcastle: PIGCAS Sixth framework programme 2007-2008. Disponible en: <http://www.w3.rennes.inra.fr/pigcas/index.htm>

28. Lumb S. Towards a more “humane” castration for piglets. *Pig Progress* 2007; 23: 24-26.
29. Zamaratskaia G, Rydhmer L, Andersson HK, Chen G, Lowagie S, Andersson K, Lundström K. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using ImprovacTM, on hormonal profile and behavior of male pigs. *Anim Reprod Sci* 2008; 108: 37-48.
30. Cronin GM, Dunshea FR, Butler KL, McCauley I, Barnett JL, Hemsworth PH. The effects of immuno- and surgical-castration on the behavior and consequently growth of group-housed, male finisher pigs. *Appl Anim Behav Sci* 2003; 81: 111-126.
31. Field RA. Effect of castration on meat quality and quantity. *J Anim Sci* 1971; 32: 849-858.
32. Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Motta M. The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol* 2003; 24: 279-295.
33. Li J, Zhang J. Immunological hormone atrophy by gonadotropin-based drug. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 495-499.
34. Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long KA, Lopaticki S, Nugent EA, Simons JA, Walker J, Hennessy DP. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J Anim Sci* 2001; 79: 2524-2535.
35. Claus R, Lacorn M, Danowski K, Pearce MC, Bauer A. Short-term endocrine and metabolic reactions before and after second immunization against GnRH in boars. *Vaccine* 2007; 25: 4689-4696.

36. Zamaratskaia G, Andersson HK, Chen G, Andersson K, Madej A, Lundström K. Effect of a gonadotropin-releasing hormone vaccine (Improvac) on steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs. *Reprod Dom Anim* 2008; 43: 351-359.
37. Robles A, Trujillo ME, Martínez V, Lozano JI. Castración inmunológica en cerdos de engorda. Memorias del XLII Congreso Nacional de AMVEC; 2007 julio 25-28; Querétaro (Querétaro). Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007: 171.
38. Hilbe M, Jaros P, Ehrensperger F, Zlinszky K, Janett F, Hässig M, Thun R. Histology and immunohistochemical findings in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2006; 148: 599-608.
39. Wagner A, Claus R. Involvement of glucocorticoids in testicular involution after active immunization of boars against GnRH. *Reproduction* 2004; 127: 275-283.
40. Steinberger E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Rev* 1971; 51: 1-22.
41. Sellers RS, Mortan D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, Perry R, Schafer K. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 751-755.
42. Bacha WJ, Bacha LM. *Color Atlas of Veterinary Histology*. 2nd ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
43. Prado R, Lavielle RE, Anzaldúa SR, Pérez M. Distribución diferencial de células cebadas en el cuello uterino de cerdas con desarrollo folicular y cuerpo lúteo ováricos. *Vet Mex* 1999; 30: 143-147.

44. Peters MAJ, de Rooij DG, Teerds KJ, van der Gaag I, van Sluijs FJ. Spermatogenesis and testicular tumors in ageing dogs. *J Reprod Fertil* 2000; 120: 443-452.
45. Lanning LL, Creasy DM, Chapin RE, Mann PC, Barlow NJ, Regan KS, Goodman DG. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 507-520.
46. Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization selective tubule stages. *Endocrinology* 1995; 136: 5-12.
47. Awoniyi CA, Chandrashekar V, Arthur RD, Schanbacher BD, Falvo RE. Changes in testicular morphology in boars actively immunized against gonadotropin hormone-releasing hormone. *J Androl* 1988; 9: 160-171.
48. Awoniyi CA, Chandrashekar V, Arthur RD, Schanbacher BD, Amador AG, Falvo RE. Pituitary and Leydig cell function in boars actively immunized against gonadotrophin-releainsg hormone. *J Reprod Fert* 1988; 84: 295-302.
49. Schinckel AP, Johnson RK, Kittok RJ. Testicular development and endocrine characteristics of boars selected for either high or low testis size. *J Anim Sci* 1984; 58: 675-685.
50. Yu L, Zhang ZF, Jing CX, Wu FL. Intraperitoneal administration of gonadotropin-releasing hormone-PE40 induces castration in male rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2106-2109.
51. Odabas O, Kanter M. Histological investigation of testicular and accessory sex glands in ram lambs immunized against recombinant GnRH fusion proteins. *Eur J Gen Med* 2008; 5: 21-26.

52. Daniel WW. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. New York: Limusa Wiley, 2002.
53. Franca LR, Silva VA, Chiarini-Garcia H, Garcia SK, Debeljuk L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 2000; 63: 1629-1636.
54. Huang YT, Johnson RK. Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits. *J Anim Sci* 1996; 74: 750-760.
55. Oonk HB, Turkstra JA, Lankhof H, Schaaper WM, Verheijden JH, Meloen RH. Testis size after immunocastration as parameter for the absence of boar taint. *Livest Prod Sci* 1995; 42: 63-71.
56. Zeng XY, Turkstra JA, van de Wiel DF, Guo DZ, Liu XY, Meloen RH, Schaaper WM, Chen FQ, Oonk HB, Zhang X. Active immunization against gonadotrophin-releasing hormone in Chinese male pigs. *Reprod Dom Anim* 2001; 36: 101-105.
57. Turkstra JA, Zeng XY, van Diepen JT, Jongbloed AW, Oonk HB, van de Wiel DF, Meloen RH. Performance of male pigs immunized against GnRH is related to the time of onset of biological response. *J Anim Sci* 2002; 80: 2953-2959.
58. Kennelly JJ, Foote RH. Sampling boar testes to study spermatogenesis quantitatively and to predict sperm production. *J Anim Sci* 1964; 23: 160-167.
59. Lunstra DD, Ford JJ, Christenson RK, Allrich RD. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol Reprod* 1986; 34: 145-158.
60. Claus R, Rottner S, Rueckert C. Individual return to Leydig cell function after GnRH-immunization of boars. *Vaccine* 2008; 26: 4571-4578.

- 61.** Einarsson S, Andersson K, Wallgren M, Lundstrom K, Rodriguez-Martinez H. Short- and long-term effects of immunization against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. *Theriogenology* 2009; 71: 302-310.

A N E X O S

Anexo I

Método para la cuenta de células intersticiales

La cuenta celular se realizó mediante un objetivo 40X con retícula milimétrica como se muestra en la Figura 2. Se eligieron 12 campos al azar de una muestra testicular de cada cerdo y se registró el número de núcleos de células intersticiales de cada cuadro de la retícula (25 cuadros). Posteriormente, se obtuvo la suma total de cada campo y a su vez la de todos los campos. Dicho resultado fue dividido entre 12 para obtener el promedio de número de células por mm^2 .

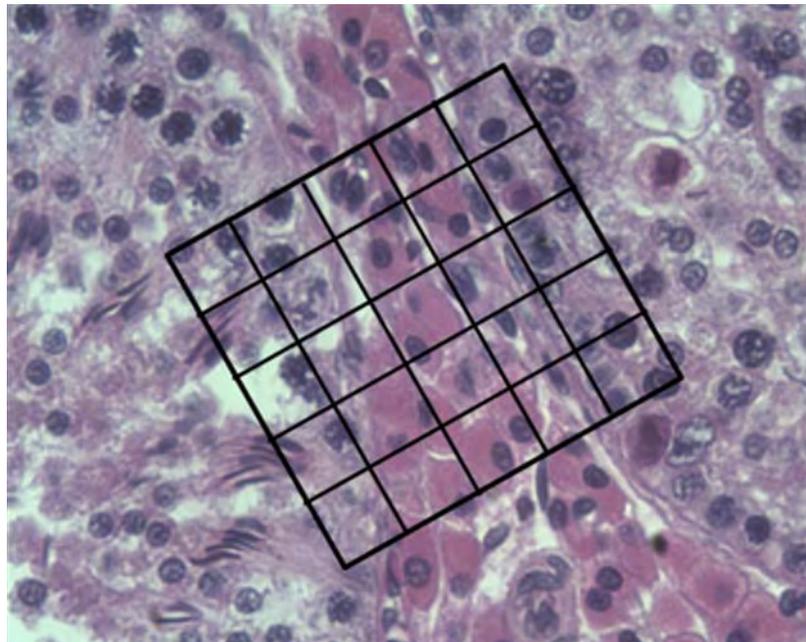


Figura 2. La cuenta celular se realizó mediante una retícula micrométrica en 12 campos al azar de una muestra testicular; considerando los núcleos celulares dentro de cada cuadro y aquellos que se superpusieran en la línea izquierda y debajo de dicho cuadro.

Anexo II

Datos obtenidos de la cuenta de células intersticiales, peso y diámetro testicular

Animales de la semana 3 del período de experimentación

CONTROL A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	8	0	6	0	0	0	0	0	0	0	2
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	2	1	0	1	0	1	0	3	0	0
7	0	4	0	2	0	8	0	0	0	0	0	1
8	4	0	5	0	0	5	4	0	4	1	5	4
9	7	0	3	7	0	0	0	0	5	0	0	0
10	0	0	1	1	7	0	0	0	3	0	10	0
11	1	1	7	4	0	0	0	0	2	1	0	0
12	4	4	6	9	2	2	0	6	0	4	0	0
13	4	2	12	1	6	11	12	17	7	11	10	9
14	1	6	10	7	9	7	2	2	1	0	16	2
15	2	6	4	2	3	2	0	3	0	0	10	0
16	0	0	0	0	0	0	2	10	0	1	0	0
17	1	2	0	0	5	0	5	0	0	0	10	0
18	4	6	0	0	0	2	7	0	5	0	19	7
19	0	6	0	0	0	2	0	0	0	4	5	3
20	1	8	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	5	12	2	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	11	4	3	0
23	0	5	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0	0
25	0	3	0	0	0	0	1	0	5	0	0	0
Total	29	62	51	40	32	40	34	41	57	43	92	28

Total

549

Células intersticiales/mm2 = **46**

INMUNOCASTRADO 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	0	0	2	8	8	0	1	2	2
2	6	0	0	13	0	0	4	1	3	1	4	10
3	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	6	0
4	0	0	0	2	0	4	0	4	0	0	0	0
5	0	0	5	0	1	9	2	0	0	2	0	5
6	0	0	8	0	0	1	0	0	2	0	5	0
7	14	8	0	3	0	5	2	0	8	0	0	8
8	1	4	8	6	0	4	2	1	7	0	12	11
9	3	1	3	1	1	4	0	3	6	0	5	0
10	2	0	1	2	1	0	2	0	4	0	3	6
11	0	0	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0
12	10	0	0	4	3	4	2	1	1	5	0	6
13	13	4	10	6	8	12	10	12	3	8	6	11
14	6	5	0	0	7	5	0	1	2	9	4	0
15	0	0	1	10	0	0	0	0	3	1	3	2
16	0	0	5	1	5	2	4	0	0	0	3	0
17	0	0	0	1	3	0	4	4	0	8	0	4
18	2	12	2	0	6	1	5	0	2	0	0	8
19	4	11	0	0	5	2	0	0	0	4	0	8
20	0	3	9	11	0	6	0	1	0	5	4	1
21	2	0	2	4	4	5	0	1	0	0	3	4
22	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	10	6
23	0	4	2	0	0	0	3	0	6	0	1	0
24	0	0	15	3	3	0	5	0	3	0	8	1
25	2	0	10	0	3	7	0	0	0	1	12	0
Total	65	52	92	73	50	73	53	37	52	57	91	93

Total

788

Células intersticiales/mm2 = **66**

INMUNOCASTRADO 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	6	1	2	2	0	3	8	4	2	3
2	3	0	2	0	1	0	0	0	0	1	1	0
3	6	2	0	4	1	2	0	3	2	1	0	8
4	0	0	0	0	9	3	2	2	1	0	5	0
5	0	2	0	0	5	2	0	2	0	2	3	0
6	0	2	9	0	5	9	0	4	5	2	0	2
7	5	0	7	2	3	5	1	0	5	9	5	4
8	7	4	2	3	0	3	3	3	3	6	3	14
9	1	0	0	1	1	3	4	2	4	6	4	2
10	0	0	0	0	3	0	4	0	3	0	7	0
11	0	4	1	1	0	0	7	4	0	0	0	5
12	11	0	2	5	7	8	8	7	2	4	6	8
13	6	8	10	6	3	4	10	9	8	9	9	12
14	8	5	2	1	0	0	7	10	0	7	5	0
15	0	10	0	3	0	0	2	2	1	3	3	0
16	0	0	0	0	0	0	6	1	1	4	3	3
17	2	0	0	3	8	4	3	5	4	2	0	7
18	7	4	6	5	9	11	9	4	7	2	4	5
19	8	2	5	3	3	0	5	0	0	4	8	0
20	0	5	4	10	9	0	0	0	2	4	0	2
21	0	6	0	6	3	4	0	2	5	11	4	0
22	0	1	1	0	4	0	0	0	1	5	8	0
23	0	5	3	0	3	9	2	0	2	4	0	0
24	0	3	0	0	0	0	0	3	0	1	13	0
25	1	9	0	7	3	0	0	0	2	9	7	5
Total	65	72	60	61	82	69	73	66	66	100	100	80

Total

894

Células intersticiales/mm2 = **75**

Animales de la semana 9 del período de experimentación

CONTROL B												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	2	1	0	0	0	3	0	0	0	7	0
2	0	2	6	0	0	4	0	0	0	0	1	13
3	3	0	4	0	0	1	0	0	0	4	0	1
4	3	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
5	0	0	0	5	0	0	3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	7	0	1	16	6	0	1	0
7	3	7	5	2	2	10	3	8	1	4	4	8
8	9	11	7	8	5	11	7	0	4	4	4	7
9	8	3	7	7	13	3	4	2	6	0	5	0
10	2	0	2	6	10	0	2	4	2	0	0	0
11	9	2	0	0	14	1	0	7	6	8	0	3
12	7	7	0	4	12	5	3	11	3	11	4	5
13	10	7	7	9	10	4	12	7	3	14	8	9
14	5	0	2	2	7	9	8	6	4	12	2	2
15	0	0	0	0	3	3	0	5	6	3	0	0
16	2	3	0	0	4	1	0	0	2	2	0	2
17	2	2	0	8	10	0	0	7	0	3	4	3
18	3	10	5	4	2	1	0	8	0	0	9	4
19	3	0	3	0	0	6	2	1	0	0	11	0
20	0	0	0	0	0	3	3	0	3	7	2	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	4	2	0	0	4	0	0	8	0
23	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	7	0
24	1	0	5	0	0	0	1	0	0	4	0	0
25	0	0	0	0	0	3	1	0	6	3	3	0
Total												
	70	58	54	59	102	57	59	85	59	74	84	57

Células intersticiales/mm2 = 68

INMUNOCASTRADO 3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2	3	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	3	2	0	0	0	0	1	0	0
3	0	0	0	2	0	0	1	0	0	5	1	0
4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6	8	0	5	0	0	5	2	0	3	0	0	4
7	2	5	3	5	3	2	3	2	4	0	1	2
8	4	2	2	6	8	4	10	6	4	8	4	4
9	2	1	3	0	0	5	6	3	3	1	0	4
10	1	4	0	0	0	0	2	2	5	2	4	0
11	5	0	0	0	0	0	2	0	8	0	0	1
12	7	5	4	4	2	8	3	2	8	0	4	10
13	6	7	9	3	4	7	9	4	11	7	12	12
14	5	3	3	0	0	5	10	3	4	0	9	9
15	7	0	0	0	0	1	3	0	2	0	3	2
16	1	1	0	5	2	0	0	0	8	0	0	0
17	1	1	3	3	4	3	0	0	2	6	7	6
18	0	2	3	4	4	0	1	0	0	7	4	2
19	0	0	0	0	2	6	3	2	1	3	0	4
20	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	4
21	2	2	0	5	6	0	0	0	4	1	0	0
22	0	0	1	8	5	0	0	0	0	3	0	0
23	0	0	0	0	3	7	0	0	0	2	2	0
24	0	0	0	0	0	1	0	7	0	2	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Total												
	53	37	43	50	47	54	55	32	70	51	51	64

Células intersticiales/mm2 = 51

INMUNOCASTRADO 4												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	0	7	0	0	3	6	0	0	1
2	0	0	0	3	0	0	0	1	5	0	0	0
3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5	0	0	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	2	0	0	9	0	0	0	1
7	1	0	3	0	1	0	0	6	3	0	0	4
8	2	8	2	9	0	0	5	2	0	4	5	3
9	1	2	4	1	1	3	3	0	0	6	0	3
10	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	5
11	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0
12	4	5	3	3	7	2	4	4	0	4	7	3
13	13	9	11	14	9	8	13	5	7	7	8	8
14	0	0	3	4	4	6	2	3	3	5	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
17	0	2	0	4	0	0	4	0	3	0	0	3
18	2	6	3	3	1	5	6	3	2	3	12	0
19	4	0	5	0	5	7	3	7	1	6	0	0
20	3	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	0
24	0	0	7	0	9	0	3	4	0	5	5	0
25	4	0	0	0	1	4	2	0	0	4	2	0
Total												
	36	32	48	45	47	41	54	49	34	47	48	31

Células intersticiales/mm2 = 43

Animales de la semana 10 del período de experimentación

CONTROL C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	3	1
2	2	0	5	4	7	2	0	0	0	0	2	9
3	1	3	6	0	1	0	2	1	0	0	0	8
4	0	0	2	0	1	3	0	6	0	0	0	3
5	0	0	0	1	4	0	0	2	0	0	2	0
6	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2	0	4	11	6	3	0	1	1	0	11	3
8	8	6	10	2	7	8	7	11	4	2	6	5
9	1	2	0	3	9	4	2	7	0	0	5	4
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11	4	0	0	0	0	0	1	3	0	1	0	0
12	6	3	3	1	4	6	6	9	3	6	11	12
13	8	6	8	4	9	9	8	10	6	10	11	9
14	5	0	0	5	3	4	10	2	7	8	7	0
15	4	0	0	0	0	0	0	4	7	0	0	0
16	12	2	0	0	0	0	6	3	0	0	3	1
17	1	7	8	0	0	4	9	0	0	0	5	12
18	0	0	7	0	8	1	2	2	1	3	0	7
19	0	0	1	4	10	1	0	2	0	4	0	0
20	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0
21	6	1	3	0	0	2	2	0	2	0	5	1
22	0	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	7	0	2	0	0	0	0	0	0	3
24	0	0	6	2	1	0	0	3	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	4	0	9	0	0
Total												
	60	35	74	43	77	47	55	66	28	53	71	79
	688											

Total

Células intersticiales/mm2 = **57**

INMUNOCASTRADO 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	0
5	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
6	0	0	4	0	5	0	0	1	0	0	0	0
7	0	0	3	0	4	0	0	0	0	0	2	0
8	4	5	0	5	5	4	5	0	4	5	3	1
9	0	3	0	0	3	6	1	0	0	4	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	3	2	9	1	0	0	0	0	3	0	0	5
13	8	10	4	9	3	6	12	9	6	5	7	16
14	0	0	2	0	6	4	0	4	0	4	3	1
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
17	2	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0
18	1	2	0	3	0	7	4	2	1	2	0	0
19	0	0	4	2	2	4	2	1	0	0	5	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
24	0	2	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0
25	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Total												
	28	28	26	25	28	31	24	32	14	28	26	25
	315											

Total

Células intersticiales/mm2 = **26**

INMUNOCASTRADO 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2
3	2	0	0	2	1	4	0	0	0	4	0	0
4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
6	0	0	0	0	0	0	0	7	2	0	6	0
7	0	2	0	10	0	0	3	6	4	0	6	4
8	3	3	0	0	10	3	0	6	0	7	3	1
9	3	3	4	0	0	0	0	1	2	0	6	2
10	1	3	2	2	0	0	4	0	3	0	5	0
11	0	3	1	1	3	0	1	0	7	0	0	2
12	3	7	5	4	5	1	0	3	8	3	5	1
13	4	11	8	14	9	8	4	6	5	8	11	10
14	0	3	0	0	7	0	6	2	3	1	2	6
15	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
16	7	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
17	10	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	0
18	1	3	4	4	3	4	0	0	0	0	2	0
19	0	0	0	8	3	1	2	0	0	3	0	4
20	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
22	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0
23	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	1	8	0	0	0	0	0	1
25	0	0	0	5	0	5	1	0	5	0	0	2
Total												
	36	40	26	52	46	35	22	33	45	32	58	35
	460											

Total

Células intersticiales/mm2 = **38**

Animales de la semana 11 del período de experimentación

CONTROL D

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	
2	2	0	2	0	0	3	0	0	1	0	0	0	
3	0	1	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	4	
6	0	0	0	5	0	0	0	2	3	2	0	0	
7	1	6	2	1	3	0	3	3	3	2	3	3	
8	5	6	2	0	6	3	1	2	2	6	3	1	
9	3	0	0	0	0	5	6	0	0	0	0	1	
10	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	8	
11	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	
12	0	0	7	5	2	0	2	1	2	1	0	0	
13	7	4	6	5	4	4	7	10	8	4	8	6	
14	1	0	5	3	4	6	2	5	4	0	3	4	
15	0	0	1	0	0	4	0	1	0	0	2	0	
16	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	3	
18	3	0	0	6	8	0	7	0	3	0	7	2	
19	0	3	0	4	3	0	2	7	0	6	4	0	
20	0	5	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0	
21	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	4	0	0	3	0	0	1	0	1	0	2	0	
24	0	0	0	0	0	0	3	1	0	4	0	0	
25	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	
Total													388

Total

Células intersticiales/mm2 = **32**

INMUNOCASTRADO 7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	
7	0	2	0	2	0	4	0	1	0	3	2	0	
8	3	5	1	3	3	3	2	3	0	1	3	0	
9	0	0	0	3	2	1	0	2	0	0	1	0	
10	0	2	1	4	0	0	0	2	0	0	1	0	
11	0	5	0	0	3	0	1	0	5	2	2	0	
12	0	0	4	0	7	2	3	0	5	0	7	1	
13	4	5	4	4	8	8	5	4	3	3	7	6	
14	2	5	3	0	4	1	0	3	2	4	2	0	
15	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
17	4	0	0	0	3	0	3	0	1	2	3	2	
18	4	1	0	2	4	1	3	1	6	2	2	3	
19	3	6	0	4	5	1	3	0	4	0	0	3	
20	0	0	0	0	7	0	2	0	0	0	0	0	
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
23	0	0	0	5	0	0	1	0	0	0	0	1	
24	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
25	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
Total													309

Total

Células intersticiales/mm2 = **26**

INMUNOCASTRADO 8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	0	0	0	0	0	0	2	8	2	0	0	0	
2	0	1	0	0	0	0	3	3	0	0	1	0	
3	0	0	0	2	2	1	6	0	0	0	2	0	
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	
5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	
7	1	3	0	0	0	0	0	9	0	1	0	2	
8	6	4	7	2	2	7	3	5	0	3	8	4	
9	1	0	0	3	2	0	0	0	2	4	0	0	
10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
12	1	0	2	0	0	0	0	6	3	12	0	5	
13	8	2	4	4	3	4	6	3	13	0	9	5	
14	0	2	0	2	8	0	0	6	0	0	0	0	
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
17	4	0	5	1	1	0	0	9	1	5	2	0	
18	8	7	5	5	4	4	7	8	4	0	6	2	
19	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
23	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	0	
24	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total													344

Total

Células intersticiales/mm2 = **29**

Animales de la semana 12 del período de experimentación

CONTROL E

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	8	3	0	0	0	0	2
3	1	0	0	0	0	2	1	0	6	0	0	5
4	0	2	3	3	3	0	1	0	3	0	0	0
5	0	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0
6	1	0	0	2	1	0	8	0	2	3	0	0
7	11	0	0	3	6	11	7	4	6	5	0	4
8	2	5	0	7	6	9	8	6	3	0	3	7
9	0	2	7	7	2	6	10	0	9	0	4	5
10	0	0	0	0	0	5	4	3	4	2	0	0
11	0	0	0	2	2	6	0	0	0	3	9	5
12	5	2	10	4	7	5	2	5	2	9	8	8
13	10	12	5	11	7	6	7	7	7	7	5	5
14	9	2	3	11	4	2	6	8	8	6	5	6
15	2	0	0	5	0	0	0	3	1	9	0	0
16	0	0	0	5	10	4	0	0	0	0	5	7
17	4	5	4	11	5	8	0	0	0	0	3	9
18	8	9	9	9	5	8	9	0	5	4	2	9
19	5	0	4	12	9	0	0	9	9	4	3	7
20	2	0	0	7	2	0	0	1	1	2	3	0
21	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0
22	8	0	0	2	0	9	0	0	0	0	0	0
23	7	1	0	0	0	5	3	2	6	0	0	6
24	0	7	0	0	0	0	0	6	0	0	2	0
25	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Total												
	79	48	48	103	73	94	72	48	78	54	52	87

Células intersticiales/mm2 = **70****INMUNOCASTRADO 9**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0
2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0
3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	2
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
6	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0
8	0	4	3	6	4	0	0	0	5	11	0	5
9	1	0	0	1	0	5	0	0	2	3	0	4
10	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0
11	0	0	0	1	3	0	1	1	0	0	0	2
12	2	3	0	2	2	2	0	3	1	3	1	1
13	8	7	7	5	6	5	5	4	0	2	2	7
14	2	2	8	2	4	0	0	0	0	0	2	0
15	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17	0	4	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1
18	4	7	1	0	0	3	0	0	5	2	2	4
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
20	5	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0
21	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	3	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
23	2	4	1	0	0	2	0	0	4	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
25	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2
Total												
	31	31	26	22	20	19	18	13	21	23	14	31

Células intersticiales/mm2 = **22****INMUNOCASTRADO 10**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
2	0	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	2	0	0	5	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
7	0	3	0	2	0	1	1	1	0	0	0	4
8	0	5	5	2	0	9	5	0	4	2	1	0
9	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	5
12	0	0	10	4	0	3	3	2	2	3	1	11
13	7	3	12	5	6	5	6	9	10	7	9	4
14	2	5	1	7	1	3	7	2	3	1	1	2
15	0	2	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0
16	0	4	2	2	0	0	3	0	0	0	0	0
17	2	0	1	1	0	3	1	0	5	0	0	0
18	4	2	3	0	3	9	0	3	1	3	0	1
19	0	0	2	0	1	6	0	0	0	8	3	5
20	0	0	3	0	0	4	0	0	0	1	0	2
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4
22	2	0	0	0	0	1	0	0	7	0	0	0
23	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2	1	0
25	0	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Total												
	18	28	44	26	20	62	28	17	35	31	20	34

Células intersticiales/mm2 = **30**

Animal	# Cél Interst / mm ²	Diam Test 1 (cm)		Peso Test (g)		Diam Test 2 (cm)	
		Der	Izq	Der	Izq	Der	Izq
A	46	3.85	4.16	46	49	3.56	3.75
B	68	6.89	6.75	229	255	6.19	6.31
C	57	5.99	6.5	225	242	5.91	6.1
D	32	6.19	6.5	228	285	5.98	6.11
E	70	5.54	5.44	174	172	5.44	5.18
1	66	3.39	3.75	22	15	3.04	3.08
2	75	3.43	3.36	19	21	2.69	2.44
3	51	4.32	4.71	79	90	4.25	4.5
4	43	4.7	4.98	116	120	4.46	4.69
5	26	5.05	5.65	122	133	4.97	4.88
6	38	4.35	4.48	110	122	4.39	4.65
7	26	4.25	4.14	89	91	4.17	4.19
8	29	4.6	4.68	105	101	4.51	4.47
9	22	4.56	4.9	120	149	4.55	4.68
10	30	4.65	5.03	91	104	4.5	4.63

* Los números en rojo fueron los testículos que se tomaron para la cuenta celular.

Anexo III

Datos obtenidos por el método de Johnsen

	A	B	C	D	E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	5	10	10	9	8	3	3	10	10	8	10	9	10	9	10
2	5	8	10	7	8	3	4	10	10	10	10	7	10	10	10
3	5	9	10	9	8	4	3	10	9	10	10	10	10	9	7
4	5	10	9	8	8	3	3	10	9	10	10	9	9	10	10
5	4	10	10	8	8	4	4	7	9	10	10	8	9	10	10
6	5	8	8	10	8	4	3	8	7	9	10	10	9	10	10
7	5	9	10	9	7	3	4	9	7	10	9	9	10	10	6
8	5	9	10	9	8	3	3	10	9	10	10	7	10	9	7
9	5	9	10	10	8	4	3	9	10	10	9	7	10	10	9
10	4	8	10	10	9	3	3	8	9	9	10	7	10	8	10
11	5	10	10	10	9	3	3	10	9	10	9	7	8	7	10
12	4	10	10	7	10	4	4	9	10	9	10	8	6	9	10
13	5	9	10	8	9	4	3	10	10	10	10	9	10	10	7
14	4	10	10	8	10	3	3	10	10	10	10	10	10	10	10
15	5	10	8	10	7	4	4	10	8	9	10	7	10	10	10
16	5	10	7	9	10	3	3	10	10	10	7	9	10	10	10
17	5	10	10	8	10	4	3	10	9	10	8	9	10	10	10
18	5	10	10	8	10	3	4	10	10	8	9	9	10	10	10
19	4	9	10	10	10	4	4	9	10	9	7	8	10	7	9
20	4	9	9	10	9	5	3	10	7	10	8	7	10	10	7
21	4	9	9	10	10	4	3	9	10	10	10	7	10	10	7
22	5	10	9	9	9	3	4	9	10	10	10	8	10	10	10
23	5	9	10	8	10	4	4	10	9	10	10	7	10	10	10
24	5	9	10	10	8	4	3	10	7	10	10	7	10	10	10
25	5	10	10	9	8	3	4	10	10	10	10	8	10	8	10
26	6	10	8	10	10	4	4	8	6	7	10	7	9	10	10
27	7	10	10	10	10	3	3	10	6	10	9	7	9	10	10
28	6	9	9	9	10	3	4	10	9	10	9	8	9	10	10
29	7	9	9	10	8	5	3	10	10	7	7	7	10	10	10
30	7	8	10	10	10	3	3	10	10	10	10	7	10	9	10
Total	151	280	285	272	267	107	102	285	269	285	281	239	288	285	279
Promedio	5.03	9.33	9.5	9.07	8.9	3.57	3.4	9.5	8.97	9.5	9.37	7.97	9.6	9.5	9