



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL**

*EFECTO DE LA INMUNOCASTRACIÓN TEMPRANA CON GnRH MODIFICADA
EN CERDOS SOBRE LA MORFOLOGÍA TESTICULAR Y EL METABOLISMO
BIOQUÍMICO*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
GABRIELA YAZMIN CASTELLANOS SÁNCHEZ

TUTORA
DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL
DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DR. DANIEL MOTA ROJAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F. MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 las mujeres más importantes de mi vida: mi madre y mis hermanas.
Antonieta, Guadalupe y Marcela, siempre serán mi motivo para lograr objetivos y por supuesto, espero ser un buen ejemplo para sus hermosos chamacos que tanto quiero:
Becca, Yarett, Diego y Joshua.

Por eso y porque los amo infinitamente, gracias por darme tanto apoyo y alegrías!!!

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora,
por convertirse en mi “madre académica”. Me adoptó y mucho de lo que soy profesionalmente se lo debo a usted. Gracias por esa paciencia y ese enorme apoyo que he recibido desde aquel día en que le solicité un tema de tesis. No sólo logró un gran sentimiento de agradecimiento, también tiene un enorme lugar en mi corazón.
Gracias Dra!!

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina,
por darme la oportunidad de llevar a cabo este estudio en sus instalaciones, con el gran apoyo y disposición de su entonces director el Dr. Roberto Martínez.

Al equipo de trabajo de la Universidad Autónoma Metropolitana,
por apoyarme en las primeras etapas en conjunto con el Dr. Mota; en especial a Dan, que me orientó hasta las últimas etapas de redacción de la tesis.

Al Instituto Nacional de Pediatría,
por permitirme hacer la mayor parte del trabajo de laboratorio. Gracias Dra. Viguera por el apoyo, orientación y confianza que me brindó, por considerarme de su equipo en ese momento y por soportarme cada día. Y por supuesto al Sr. Pedro, pues gracias a su experiencia y tiempo, todas las muestras fueron trabajadas correctamente.

Al Departamento de Reproducción de la facultad,
en especial a Anita!! Tu apoyo incondicional es realmente inigualable.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,
por darme las herramientas necesarias para lograr un grado más en mi carrera profesional.

A los laboratorios Pfizer,
por apoyarme con el producto principal para el desarrollo de la investigación.

A todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron durante estos años; a mis maestros y compañeros de asignatura; a mi compañía y apoyo en Jilotepec: Angela, José Luis, Alan y Lalo; a mis confidentes y hermanos Dianina y Diego; al equipo de voleibol que me ayudó a ser más feliz: María, Juan, Klaux, Lalone... y muchos más que aunque no los nombre, fueron grandes en ese momento; a Clarita y el Dr. Martínez Maya, que simplemente hicieron posible este cierre.

Y sobre todo a mi querida Lorena, quien fue mi compañera permanente y confidente y que se convirtió en mi familia; sin duda, eres no sólo parte de esto señorita, fuiste elemento clave y por eso yo te quiero!!!

A mis sinodales,
por dar los últimos detalles necesarios para culminar este largo trabajo.

A la empresa que me abrió las puertas por primera vez GABSA-IMPEXVET, pues siempre estuvieron detrás de mí para finalizar esta etapa, me tardé un poco pero gracias por esa “presión” que ejercieron durante este tiempo, en especial a la Dra. Hoyos y el Dr. Chorné y sobre todo a Jorge Gómez, por darme todas las facilidades para realizar los últimos detalles de este ciclo, por su apoyo y grandes consejos y por tener siempre una respuesta para todo, mil gracias Bossssss.

A la Universidad Nacional Autónoma de México,
pues gracias a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia soy lo que soy.

RESUMEN

El olor sexual es un olor y sabor desagradable en la carne de cerdos machos que han llegado a la pubertad. La inmunocastración es una práctica alternativa a la castración quirúrgica que se lleva a cabo para inhibir dicho olor. Consiste en la administración de una forma modificada de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para inhibir la secreción de la hormona estimulante de células intersticiales (ICSH) y la hormona folículo-estimulante (FSH). Debido al período postnatal de proliferación de células testiculares presente en el cerdo, un protocolo de administración temprana es sugerido para inhibir el olor sexual con una reducción mayor del tamaño testicular y mejora del bienestar animal. El objetivo del presente estudio es analizar los efectos de la inmunocastración convencional en cerdos sobre la morfología testicular y el perfil hormonal comparada con animales inmunocastrados tempranamente y su resultado en el metabolismo bioquímico. Un total de 42 cerdos de raza híbrida terminal fueron designados en tres grupos de experimentación: control (no inmunocastrados), inmunocastración temprana (semana 3 y 11 de edad) e inmunocastración ordinaria (semana 10 y 16 de edad). A las 4, 14, 16, 18, 20 y 24 semanas de edad fueron sacrificados para diversas evaluaciones: perfil hormonal, gasometría sanguínea y toma de muestras testiculares para análisis morfológico. Las variables peso y diámetro testicular, área del epitelio seminífero, histopatología de túbulos seminíferos, establecimiento de la espermatogénesis y perfil hormonal no presentaron diferencias a las 4 semanas de vida. Sin embargo, a las 16 y 20 semanas de vida, la inmunocastración temprana tuvo niveles más bajos comparada con la inmunocastración ordinaria y los controles. A la semana 24 de edad se comportó igual que los controles, con niveles más bajos que el tratamiento ordinario. Los parámetros fisiometabólicos a las 14 y 18 semanas de edad no presentaron diferencias en los dos períodos. Se concluye que la inmunocastración temprana tiene mejor efecto que el tratamiento ordinario hasta 9 semanas antes del sacrificio, no obstante, el estrés no se ve diferenciado comparado con animales enteros.

Olor sexual, inmunocastración, vacuna GnRH, bienestar animal

ABSTRACT

Boar taint is an unpleasant odor and taste in the meat of male pigs that have reached puberty. Immunocastration is an alternative practice to surgical castration that is carried out to inhibit this odor. It involves the administration of a modified form of gonadotropin releasing hormone (GnRH) inhibiting secretion of the interstitial cell stimulating hormone (ICSH) and follicle stimulating hormone (FSH). Due to postnatal testicular cell proliferation present in pigs, a protocol of early administration is suggested to inhibit boar taint with a greater reduction in testicular size and improving animal welfare. The aim of this study is to analyze the effects in pigs immunocastrated conventionally on testicular morphology and hormone profile against a protocol of early immunocastration and result in biochemical metabolism. A total of 42 pigs terminal hybrid breed were appointed in three experimental groups: control (no immunocastrated), early immunocastration (week 3 and 11 of age) and ordinary immunocastration (week 10 and 16 of age). At 4, 14, 16, 18, 20 and 24 weeks of age were slaughter for some evaluations: hormone profile, blood gas analysis and testicular samples for morphological analysis. The variables weight and testicular diameter, area of seminiferous epithelium, histopathology of seminiferous tubules, establishment of spermatogenesis and hormone profile showed no differences at 4 weeks of age. However at 16 and 20 weeks of age, early immunocastrated animals had lower levels compared to the boars and ordinary immunocastrated animals. At week 24 of age, early immunocastrated animals behaved like the boars, and the ordinary immunocastrated animals had the lowest levels. Physiometabolic parameters at 14 and 18 weeks of age did not differ in the two periods between the three groups. We conclude that early immunocastration has better effect than the ordinary treatment up to 9 weeks before slaughter, however, stress is not differentiated compared to the boars.

Boar taint, immunocastration, vaccine GnRH, animal welfare

ÍNDICE

1	Introducción	1
2	Revisión de la literatura	3
2.1	Composición y desarrollo testicular del cerdo	3
2.1.1	El papel de la Célula de Sertoli en la espermatogénesis	3
2.1.2	El epitelio germinal y la espermatogénesis	5
2.1.3	Las células de Leydig: importancia en la esteroidogénesis	8
2.2	Bases endocrinas del funcionamiento testicular	9
2.3	Control de olor sexual y bienestar animal	11
2.3.1	Alternativas a la castración quirúrgica: inmunocastración	11
2.3.2	Alteraciones del comportamiento en la pubertad	12
3	Objetivo	14
3.1	Objetivo general	14
3.2	Objetivos particulares	14
4	Hipótesis	15
5	Material y métodos	16
5.1	Sujetos experimentales	16
5.2	Diseño experimental	16
5.3	Castración quirúrgica	17
5.4	Histología y morfometría microscópica	18
5.5	Análisis hormonal	22
5.6	Gasometría sanguínea	22
5.7	Análisis estadístico	22
6	Resultados	24
6.1	Peso y diámetro testicular	24
6.2	Área del epitelio seminífero	24
6.3	Establecimiento de la espermatogénesis	27

6.4 Histopatología de túbulos seminíferos	27
6.5 Mediciones hormonales	28
6.6 Indicadores fisiometabólicos	32
7 Discusión	34
8 Conclusiones	37
9 Bibliografía	38
10 Anexos	48

1. INTRODUCCIÓN

La carne de cerdos machos que han llegado a la pubertad presenta un olor y sabor desagradable conocido como olor sexual y que es detectado por algunos consumidores, el cual es provocado principalmente por dos sustancias: la androstenona y el escatol. La androstenona, un esteroide testicular, es exclusiva de los cerdos machos y su síntesis comienza al inicio de la pubertad. Por otro lado, el escatol, un metabolito de la degradación del triptófano, influye de la misma manera que la androstenona, encontrándose altas cantidades en tejido adiposo (Bonneau, 1982; Zamaratskaia, 2004).

Así, para controlar dicha característica, los lechones son castrados quirúrgicamente en las primeras semanas de vida; sin embargo, aunque se elimina el olor sexual, también se afecta negativamente la calidad de la canal y la eficiencia alimenticia (Carrol *et al.*, 2006).

La inmunocastración es una práctica alternativa que actualmente se utiliza en diversos países. Consiste en la administración de una forma modificada de la hormona liberadora de gonadotropinas (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 la hormona estimulante de células intersticiales (ICSH) y la hormona foliculoestimulante (FSH) por parte de la hipófisis (Zamaratskaia *et al.*, 2008a). El fabricante recomienda la administración dos dosis vía subcutánea, con 4 semanas de diferencia, y la segunda inyección debe ser aplicada 4-6 semanas antes del sacrificio. Diversos estudios han demostrado el efecto de la vacuna (con dicho protocolo de aplicación) sobre la morfología testicular y la alteración de niveles hormonales así como el desarrollo de anticuerpos GnRH (Dunshea *et al.*, 2001; Jaros *et al.*, 2005; Claus *et al.*, 2007); sin embargo, no se tienen datos del efecto a nivel metabólico que pudiera sufrir el animal ya que al bloquear una hormona de gran importancia, podría verse favorecido el bienestar animal por la disminución de conductas agresivas propias de un animal entero al llegar a la pubertad (Fernández *et al.*, 1994a).

Así mismo, se sabe que la inmunocastración llega a reducir el tamaño testicular; sin embargo, la presencia de testículos repercute en el rendimiento de canal.

El cerdo es el único animal que presenta proliferación y diferenciación de células de Leydig en la etapa neonatal, comenzando en el día 100 de gestación y terminando hasta 5 semanas después del nacimiento aproximadamente; dicho período se caracteriza por altos niveles

de ICSH y testosterona, los cuales disminuyen posteriormente hasta la pubertad (Geiger *et al.*, 1999).

Por ello, se sugiere que un cambio en el protocolo de aplicación podría lograr un desarrollo testicular menor sin afectar la eficiencia productiva pues la elevación en los niveles de testosterona en el período neonatal no influye significativamente en el crecimiento muscular ni en la síntesis de proteína; al parecer, estos efectos son manifestados sólo en la pubertad (Skjaerlund *et al.*, 1994).

Por todo lo anterior, el presente estudio busca analizar los efectos de la inmunocastración en cerdos sobre la morfología testicular y el perfil hormonal de animales inmunocastrados convencionalmente contra un protocolo de administración temprano alternativo y su resultado en el metabolismo bioquímico.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Composición y desarrollo testicular del cerdo

Los testículos son las gónadas masculinas que tienen como función principal producir espermatozoides y andrógenos; los primeros son las células encargadas de transmitir los genes del macho a la descendencia mientras que los segundos son sustancias que proporcionan las características individuales del macho. Así, el parénquima testicular está formado por una serie de túbulos huecos conocidos con el nombre de túbulos seminíferos, rodeados por tejido intersticial (Stabenfeldt y Edqvist, 1999).

2.1.1 El papel de la Célula de Sertoli en la espermatogénesis

Las células 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. Gracias a las uniones estrechas que existen entre ellas, se forma la barrera hematotesticular responsable de evitar el paso de sustancias al compartimento adluminal que puedan alterar el desarrollo de la espermatogénesis (Stabenfeldt y Edqvist, 1999). Esto hace que sean de vital importancia en el desarrollo y funcionamiento testicular pues entre las tantas funciones que realizan están las de soporte y nutrición a las células germinales; compartimentalización del túbulo seminífero por la barrera hematotesticular; liberación de espermátidas maduras al lumen tubular; secreción de fluido, proteínas y factores de crecimiento; fagocitosis de células en degeneración así como del residuo citoplásmico que permanece dentro del epitelio seminífero una vez que la espermiación ocurre. De hecho, la regulación de la espermatogénesis por la hormona folículo-estimulante (FSH) y la testosterona (Te), ésta última producida en las células de Leydig, ocurre a través de la acción de estas hormonas en las células de Sertoli (Griswold, 1998; Johnson *et al.*, 2008). Así mismo, gracias a las células de Sertoli, los testículos son órganos inmunoprivilegiados. Estas células expresan diversas moléculas inmunoprotectoras relacionadas con la apoptosis de células germinales tales como el ligando Fas (FasL) o aquellas que influyen en el mantenimiento de la barrera hematotesticular como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1) (Yin *et al.*, 2006).

En el desarrollo gonadal del macho, estas células son consideradas las más importantes ya que son de las primeras en diferenciarse durante la vida fetal, en el caso del cerdo, a los 56 días post coito (Pelliniemi LJ, 1975). Uno de los aspectos que le dan esa importancia en la diferenciación sexual radica en su función de secretar la hormona antimulleriana (AMH) que es la encargada de suprimir el desarrollo del tracto femenino (Tilman y Capel, 2002). Existen dos períodos de proliferación de células de Sertoli en el cerdo. El primero ocurre en la vida postnatal, desde el nacimiento hasta el primer mes de edad observándose un incremento en número de hasta siete veces (McCoard *et al.*, 2001); posteriormente, a los tres o cuatro meses de edad, se presenta el segundo período (Franca *et al.*, 2000; Avelar *et al.*, 2010). Se ha visto que después de las 20 semanas, esto es, al comienzo de la pubertad, la proliferación comienza a disminuir siendo nula posteriormente (Klobucar *et al.*, 2003). Existen diversos marcadores que muestran el cese de la actividad proliferativa y el comienzo de la diferenciación; por ejemplo, las células de Sertoli maduras expresan una proteína anti-apoptótica BCL-w (Ross *et al.*, 2001); por otro lado, se da el establecimiento de la barrera hematotesticular, la secreción del fluido tubular, la formación del lumen y una amplia proliferación de espermatogonias y formación de espermatoцитos primarios (Franca *et al.*, 2000).

Así mismo, GATA-4, una molécula relacionada a la proliferación y diferenciación celular, se expresa en células de Sertoli de cerdos desde el nacimiento hasta las 12 semanas de edad y disminuye después de las 16 semanas de edad coincidiendo con los períodos de proliferación y diferenciación, y por tanto, el comienzo de la espermatogénesis. (Lee *et al.*, 2006).

En mamíferos, el número de células de Sertoli por testículo se establece desde el período postnatal pues se ha visto que un mayor número de células de Sertoli (a causa de un hipotiroidismo inducido en ratas) resulta en una mayor cantidad de espermatozoides producido; así, la cantidad de estas células determinan el tamaño testicular en la vida adulta (Chubb, 1992; Hess *et al.*, 1993) y por ello son las principales reguladoras en la capacidad de producir espermatozoides (McCoard *et al.*, 2001; Franca *et al.*, 2005).

Cada célula de Sertoli es capaz de mantener un número limitado de células germinales y con ello, la eficiencia espermatogénica se relaciona con el número de células germinales que mantiene cada célula de Sertoli (Johnson *et al.*, 2000; Franca *et al.*, 2005). Sin embargo, el número de células de Sertoli está íntimamente relacionado con la eficiencia espermatogénica ya que, por ejemplo, el cerdo salvaje presenta mayor cantidad de células

de Sertoli que el cerdo doméstico pero su relación con las células germinales es menor, esto es, una célula de Sertoli mantiene menos células germinales y así, el tamaño testicular es menor (Almeida *et al.*, 2006).

2.1.2 El epitelio germinal y la espermatogénesis

Diversas células germinales dentro del túbulo seminífero representan diferentes fases en el desarrollo y diferenciación del espermatozoide localizándose entre y por encima de las células de Sertoli. La espermatogénesis es la secuencia de eventos que transcurren en el desarrollo de dichas células, desde una espermatogonia hasta su diferenciación en espermatozoide; es un proceso altamente coordinado que en cerdos, al igual que en todos los mamíferos, consta de tres fases que se caracterizan por diferencias morfológicas y funcionales (Stabenfeldt y Edqvist, 1999). Así, el proceso espermatogénico comienza con la proliferación de espermatogonias por medio de mitosis y su diferenciación a espermatocito (fase también conocida como espermatocitogénesis), prosigue con la fase espermatocitaria a través de dos divisiones meióticas y termina con la espermiogénesis en donde las espermátidas haploides se diferencian en espermatozoides. Estas tres fases comprenden aproximadamente un tercio del proceso cada una por lo que cada fase dura alrededor de dos semanas pues la duración total de la espermatogénesis en el cerdo es de 40 días aproximadamente (Franca y Cardoso, 1998; Eddy, 2002).

Diferencias entre especies pueden encontrarse en la espermatogénesis; sin embargo, dicho proceso en el cerdo es muy similar al ratón, por ejemplo, cuatro tipos de espermatogonias pueden observarse en ambas especies: espermatogonia indiferenciada tipo A (A_s , A_{pr} , A_{al}), espermatogonia diferenciada tipo A (A_1 , A_2 , A_3 , A_4), espermatogonia intermedia y espermatogonia tipo B (Frankenhuis *et al.*, 1982; Aguilar *et al.*, 2004) (*Figura 2.1.2.1*).

En los mamíferos existen diferentes asociaciones celulares dentro del epitelio germinal clasificadas como etapas, las cuales dan lugar al llamado ciclo del epitelio seminífero. Estas etapas se caracterizan por la forma del núcleo de la espermátida, el tipo de divisiones meióticas o pueden basarse en el desarrollo del sistema acrosómico (Berndtson, 1977); con lo cual se han podido identificar ocho diferentes etapas en el cerdo (Franca *et al.*, 2005).

El estudio del ciclo del epitelio seminífero ha sido útil para análisis comparativos, caracterización del proceso así como datos precisos relacionados a la estructura y función

del testículo y su relación con hallazgos fisiológicos y bioquímicos (Wing y Christensen, 1982).

La duración del ciclo del epitelio seminífero es controlada básicamente por las células germinales (Franca *et al.*, 1998) y se considera constante entre razas. Así, en el cerdo cada ciclo espermatogénico dura de 8.6 a 9 días dando lugar a un total de 4.5 ciclos aproximadamente necesarios para que el proceso sea completado, desde espermatogonia tipo A hasta la espermiación (Amann y Schanbacher, 1983; Franca *et al.*, 1998).

El rango de proliferación de células germinales en cerdos es muy amplio. Así, se ha visto que la pubertad y por consiguiente la maduración sexual comienzan aproximadamente a las 20 y 32 semanas respectivamente, en la mayoría de las razas; esto, considerando diversos marcadores tales como peso testicular, establecimiento de la espermatogénesis, diámetro tubular, liberación de los primeros espermatozoides a la luz del túbulo seminífero, niveles de testosterona, entre otros (Van Straaten y Wensing, 1977; Franca *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que, para mantener una producción continua de espermatozoides, se establece lo que se conoce como “ola del epitelio seminífero” en donde algunas células de Sertoli no proliferan antes de la pubertad; sin embargo, empiezan a diferenciarse más tempranamente que otras. Estas células soportan el comienzo de las fases de la espermatogénesis que incluye la diferenciación de espermatogonias tempranas y la subsecuente maduración de células germinales a través de la meiosis en la primera ola del ciclo. Las demás células de Sertoli durante esta primera ola siguen proliferando para permitir al testículo crecer al tamaño adulto así como la renovación de células madre y migración de éstas a los nichos de nuevas células de Sertoli que comenzarán a formar la nueva ola (Perey *et al.*, 1961).

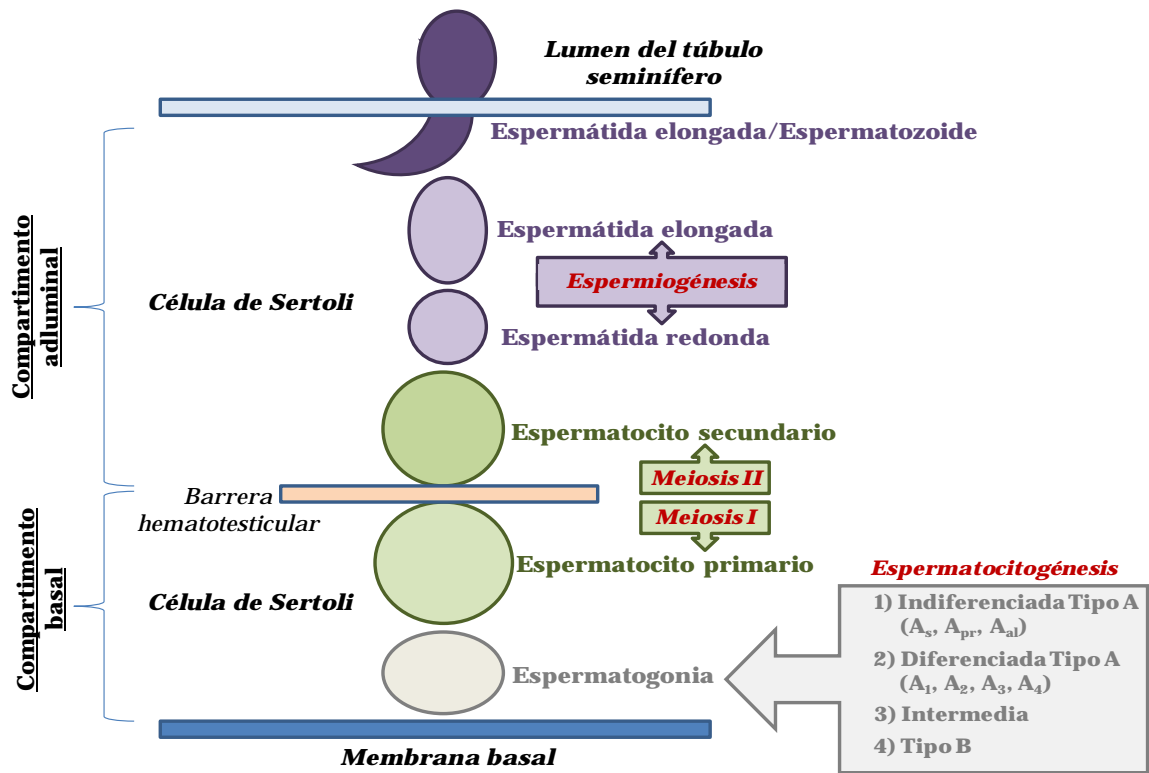


Figura 2.1.2.1 Tipos y eventos celulares en el túbulo seminífero durante la espermatogénesis.

2.1.3 Las células de Leydig: importancia en la esteroidogénesis

El tejido intersticial está formado por tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y linfáticos, fibrocitos, células mononucleares y células intersticiales (de Leydig) (Wrobel y Dellman, 1993). El volumen total del compartimento que conforman las células de Leydig es muy particular en la especie porcina ya que llegan a ocupar hasta una tercera parte del volumen testicular de un animal adulto; esto puede deberse a la importancia que tienen en la eficiencia reproductiva ya que estas células son las encargadas de secretar esteroides y feromonas indispensables para diversas funciones reproductivas en el macho, tales como la conducta sexual y el mantenimiento de la función del tracto reproductivo y las glándulas accesorias (Almeida *et al.*, 2006). Dicha actividad esteroidogénica generalmente no es homogénea; por ejemplo, la zona media que se encuentra entre el mediastino y la adyacente a la túnica albugínea presenta una mayor actividad. (Klobucar *et al.*, 2003; Avelar *et al.*, 2010).

Así mismo, el volumen celular es muy alto y es ampliamente correlacionado a la cantidad de receptores a andrógenos, cantidad de organelos y niveles de estradiol y testosterona en sangre (Peyrat *et al.*, 1981; Lunstra *et al.*, 1986). Así, 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 endocrinas 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 lo tanto, no se aprecia morfológicamente (Wrobel y Dellman, 1993; Blanco y García, 2004).

El cerdo es el único mamífero cuyas células de Leydig son específicas para la actividad de la aromatasas (enzima de la familia del citocromo P450 que aromatiza los andrógenos para producir estrógenos) y así, libera altas cantidades de estrógenos que tienen actividad sinérgica con los andrógenos para la función de las glándulas accesorias, presentación de

libido y conducta sexual así como el potencial anabólico (indirectamente por estímulo al sistema GH-IGF1) (Bauer *et al.*, 2008).

Las células de Leydig presentan tres fases de proliferación en el cerdo: la primera durante el desarrollo fetal entre los 30 y 60 días de gestación; posteriormente en la vida postnatal que finaliza alrededor de las 5 semanas de edad en donde las células de Leydig comienzan a sufrir regresión; y la última alrededor de los 3-4 meses de vida, previo a la pubertad. En las últimas dos fases, se pueden observar células bien diferenciadas. (Van Straaten y Wensing, 1978; Franca *et al.*, 2000).

2.2 Bases endocrinas del funcionamiento testicular

El control del desarrollo testicular se da gracias a una gran cantidad de eventos moleculares y endocrinos; así, diversas hormonas llevan a cabo importantes funciones específicas.

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 inducen el crecimiento testicular en el período neonatal. Posteriormente, en la pubertad, 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 espermatocito secundario. Los esteroides testiculares son liberados a la circulación y transportados a varios tejidos donde llevan a cabo diversas funciones (Hafez *et al.*, 2000).

La proliferación y maduración de células de Sertoli está controlada por diversas sustancias que varían en cantidad de acuerdo a la edad. Así, la FSH es considerada como el principal factor mitogénico de células de Sertoli pues ambos períodos de proliferación coinciden con altos niveles de dicha hormona (Orth, 1984; Heckert y Griswold, 2002). Sin embargo, algunos estudios no han encontrado evidencia en dicha relación en la especie porcina (Lunstra *et al.*, 2003; McCoard *et al.*, 2003).

Por otro lado, la hormona del crecimiento (GH) promueve la maduración de células de Sertoli y el comienzo de la espermatogénesis incrementando el diámetro tubular con la apariencia del lumen y aumento de células espermatogénicas (Swanlund *et al.*, 1995).

Así mismo, los estrógenos también juegan un papel importante en la proliferación y maduración de las células de Sertoli. Se ha visto que animales tratados con inhibidores de

la enzima aromatasa incrementan el número de células de Sertoli y por lo tanto, un mayor tamaño testicular después de la pubertad. Sin embargo, la espermatogénesis se retrasa, esto es, retrasan la maduración de las células. (At-taras *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2008). Por otro lado, receptores a estrógenos se han encontrado en espermatogonia A y células de Sertoli (Van Pelt *et al.*, 1999). Así, los estrógenos son indispensables en la espermatogénesis; sin embargo, los receptores en las células germinales no son indispensables mientras estén presentes en las células de Sertoli (Mahato *et al.*, 2000).

La triyodotironina (T₃) es una hormona clave en la inhibición de la proliferación tanto in vivo como in vitro en especies como la rata y el ratón; también promueve la formación del lumen y la maduración de células de Sertoli (Van Haster *et al.*, 1993; Franca *et al.*, 1995). Sin embargo, en el cerdo no está del todo clara su influencia en las células de Sertoli (Tarn *et al.*, 1998). Receptores de T₃ han sido reportados en células de Sertoli inmaduras (Palmero *et al.*, 1992) así como la estimulación de esta hormona en la síntesis de proteínas por parte de las células de Sertoli de cerdos de dos y tres semanas de edad in vitro (Palmero *et al.*, 1996), más el hipotiroidismo no afecta ni la proliferación ni la maduración de células de Sertoli (Klobucar *et al.*, 2003).

Muchas sustancias y factores de crecimiento tales como el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), el factor de células stem (SCF), ácidos retinoicos, p53, Bax y Bcl-xL, están involucrados en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las espermatogonias (De Rooij y Russell, 2000).

La proliferación y maduración de células de Leydig está principalmente relacionada con niveles altos de la hormona ICSH y Te (Vandalem *et al.*, 1986).

Además de la ICSH, muchas otras hormonas y factores de crecimiento son importantes reguladores de la proliferación y diferenciación de las células de Leydig; tales como el factor de crecimiento transformante α (TGF α), el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo A (PDGF-A), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), AMH, hormonas tiroideas, andrógenos y estrógenos. (Chamindrani Mendis-Handagama y Siril Ariyaratne, 2001).

Otra sustancia importante en el desarrollo testicular es la inhibina, hormona que participa en la retroalimentación negativa de la FSH en diversas especies (Araki *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2001); además se ha visto que la inhibina A, único tipo expresado en el período postnatal del cerdo (Ohnuma *et al.*, 2007), estimula la maduración de Leydig in vitro (Lin

et al., 1989; Lejeune *et al.*, 1997) así como ayuda a la sobrevivencia de las células espermatogénicas (Adeeko *et al.*, 1996).

2.3 Control de olor sexual y bienestar animal

El “olor sexual” es un fuerte olor y sabor a orina en la carne producto de la androstenona, esteroide testicular transportado y almacenado en las glándulas salivales para desarrollar un papel importante en la conducta sexual como feromona (Bonneau, 1982). La androstenona, junto con otras sustancias como el escatol, son los principales causantes de dicho olor al inicio de la pubertad, el cual ha sido un factor limitante en el mercado para la venta de machos enteros (no castrados) (Zamaratskaia, 2004).

La castración quirúrgica se ha convertido en la práctica de elección para dicho control por las múltiples ventajas que presenta; sin embargo, 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 (McGlone *et al.*, 1993; Carrol *et al.*, 2006).

2.3.1 Alternativas a la castración quirúrgica: inmunocastración

La inmunocastración es una técnica alternativa a la castración quirúrgica de cerdos que suprime 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 (Bonneau, 1982).

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 (Zamaratskaia *et al.*, 2008b). Es administrada dos dosis vía subcutánea, con 4 semanas de diferencia, y la segunda inyección se administra 4-6 semanas antes del sacrificio (Dunshea *et al.*, 2001).

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 (Claus *et al.*, 2007).

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; sin embargo, afecta el trabajo de rutina y el tiempo que conlleva el proceso para su aplicación (PIGCAS Sixth framework programme, 2008).

Diversas investigaciones se han llevado a cabo para comprobar la eficacia de la inmunocastración, ya sea basados en la medición de anticuerpos GnRH (a distintos intervalos en el período de la primera dosis al sacrificio), testosterona, escatol y/o androstenona (en sangre o grasa), diámetro y peso de testículos y glándulas bulbouretrales al sacrificio o directamente sobre la ganancia diaria de peso; con diferencias 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 (Dunshea *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2004; Claus *et al.*, 2007; Zamaratskaia *et al.*, 2008a).

2.3.2 Alteraciones del comportamiento en la pubertad

En la producción porcina, los problemas de bienestar animal son típicamente identificados mediante observación directa en granja y evaluados con base en la interacción entre animales con su ambiente así como las posibles consecuencias del manejo y el estado sanitario (Gonyou, 1994; Sondergaard *et al.*, 2011).

Así, diversos factores inducen el estrés en los animales, algunos de ellos son la privación del alimento, las variaciones de temperatura, el transporte por períodos prolongados, el ejercicio muscular y los estímulos sociales (Dantzer y Mormede, 1984). Dicho estrés puede ser cuantificado ya sea por análisis de la conducta animal o en su caso, por mediciones en los tejidos y fluidos del animal (Shaw y Tume, 1992).

Con base en esto, durante décadas se ha observado el comportamiento de los cerdos machos al llegar a la pubertad, el cual presenta alteraciones acentuadas; esto es, aparece una conducta sexual (cortejo y monta) así como agresiva lo cual repercute negativamente en el bienestar animal del grupo (Rydhmer *et al.*, 2006).

Aunado a ello, dichas conductas influyen en la alimentación y por ende, en la velocidad de crecimiento. De hecho, animales enteros tienden a crecer más lentamente que los castrados quirúrgicamente o inmunocastrados durante la última etapa de producción pues dedican tiempo a dichas conductas más que a la alimentación (Dunshea *et al.*, 2001; Zamaratskaia *et al.*, 2008a).

Por otro lado, parece ser que los cambios conductuales tienen efecto en la aparición del olor sexual ya que existe una relación directa entre la cantidad de andrógenos y el nivel de agresión (Giersing *et al.*, 2000).

Por todo lo anterior, al revisar los efectos de la castración quirúrgica sobre el bienestar animal, Tuytens (2002) concluye que “Evaluar las implicaciones de no castrar cerdos machos sobre el bienestar requiere un delicado balance entre, por un lado, evitar el sufrimiento físico de la castración quirúrgica, la preservación de la integridad animal y el potencial de una mortalidad y morbilidad menor; y por otro lado, un incremento en la conducta agresiva”.

La conducta agresiva en animales jóvenes forma parte del estrés conductual que se puede ver reflejado en diversos cambios neuroendocrinos. Así, se ha observado que encuentros agresivos entre cerdos da como resultado niveles elevados de cortisol y catecolaminas en plasma; incluso, debido al esfuerzo físico que realizan cerdos en constante pelea, la demanda de energía se incrementa y conlleva a una disminución de glicógeno muscular (Fernández *et al.*, 1994a; Fernández *et al.*, 1994b).

Diversos estudios han demostrado algunos otros cambios fisiológicos asociados al estrés que se relacionan con alteraciones en los valores sanguíneos de glucosa, lactato, insulina, ácidos grasos volátiles y hematocrito; se ha observado que con el transporte el número de neutrófilos aumenta mientras que los linfocitos, monocitos y eosinófilos disminuye, junto con un aumento del pH sanguíneo y un incremento en la hemoglobina sanguínea (Mota-Rojas D *et al.*, 2006; Becerril-Herrera *et al.*, 2010).

Así mismo, el estrés altera el metabolismo mineral pues concentraciones elevadas de calcio pueden encontrarse en el fluido intersticial a causa también de los altos niveles de catecolaminas. Este calcio intensifica considerablemente la contracción de células musculares, incluyendo las células del corazón, situación que incrementa de la misma manera los niveles de sodio (Schaefer *et al.*, 1997).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo general

Comparar los efectos de la inmunocastración en cerdos sobre la morfología del testículo y el perfil hormonal de animales inmunocastrados convencionalmente contra un protocolo de administración temprano alternativo así como su resultado en el metabolismo bioquímico.

3.2 Objetivos particulares

- Evaluar la histología de los testículos de animales inmunocastrados tempranamente después de la primera y segunda dosis, mediante la determinación del índice histopatológico, actividad espermatogénica y área del epitelio seminífero.
- Comparar el efecto a nivel celular de los testículos al sacrificio de animales inmunocastrados tempranamente contra animales inmunocastrados convencionalmente mediante la determinación del índice histopatológico, actividad espermatogénica y área del epitelio seminífero.
- Evaluar el efecto a nivel hormonal de la inmunocastración temprana mediante la determinación de niveles de testosterona y estradiol en sangre así como su relación con la histología testicular.
- Comparar el efecto de la inmunocastración temprana contra la convencional sobre la morfología macroscópica del testículo (peso y diámetro).
- Determinar niveles de hematocrito, pH, pO₂ y pCO₂, así como glucosa, lactato y electrolitos a todos los animales en dos diferentes etapas para determinar diferencias en materia de bienestar animal en cada uno de los grupos experimentales.

4. HIPÓTESIS

La inmunocastración temprana provoca un menor tamaño testicular comparada con la inmunocastración ordinaria recomendada ya que suprime la función reproductiva por la involución de la morfología testicular y por consiguiente la disminución de los niveles en los esteroides sexuales al sacrificio obteniendo los mismos beneficios productivos sin generar ningún cambio en el metabolismo.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Sujetos experimentales

El presente estudio se llevó a cabo con cerdos de raza híbrida terminal alojados en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia el cual lleva a cabo la castración quirúrgica en los primeros días de vida como práctica cotidiana y la edad de sacrificio promedio es de 23 semanas. Los cerdos utilizados se mantuvieron en las mismas condiciones que los demás animales dentro de la granja, esto es, con el alimento convencional utilizado a base de sorgo y soya, agua ad libitum y no recibieron ningún cambio ambiental o de alojamiento respecto a los animales ajenos a la experimentación ni entre grupos experimentales.

5.2 Diseño experimental

Un total de 42 cerdos machos fueron seleccionados al nacimiento para no ser castrados quirúrgicamente en los primeros días de vida; se les colocaron aretes de identificación y se designaron al azar en tres grupos experimentales:

* Grupo IO (Inmunocastración ordinaria).- Integrado por 10 cerdos que fueron inmunocastrados como lo recomienda el fabricante, esto es, se les aplicaron dos dosis de 2 ml cada una de la vacuna antiGnRH (Improvac ®) mediante una inyección subcutánea bajo la oreja. La primera aplicación se realizó a las 10 semanas de edad y la segunda a las 16 semanas de edad.

* Grupo IE (Inmunocastración experimental).- Integrado por 16 cerdos a los que se les aplicaron dos dosis de 2 ml cada una de la vacuna antiGnRH (Improvac ®) mediante una inyección subcutánea bajo la oreja. La primera aplicación se realizó a las 3 semanas de edad y la segunda a las 11 semanas de edad.

* Grupo C (Control).- Integrado por 16 cerdos los cuales no se inmunocastraron y sólo recibieron inyecciones de solución salina.

A las 4 semanas de edad, un total de 6 cerdos fueron elegidos al azar de los grupos IE y C (tres de cada uno respectivamente) y fueron castrados quirúrgicamente. Se separó el tejido adyacente a los testículos, estos se pesaron y midieron con la ayuda de un vernier. El peso y diámetro testicular fueron registrados. Así mismo, se tomaron muestras del testículo

derecho para su posterior análisis microscópico. Por otro lado, previo a la castración, muestras sanguíneas fueron tomadas de la vena cava para su análisis hormonal.

A las 16 semanas de edad, un total de 6 cerdos se eligieron nuevamente al azar de los grupos IE y C (tres de cada uno respectivamente) y también fueron castrados quirúrgicamente. El procedimiento antes mencionado se llevó a cabo de la misma forma con estos animales y sus testículos.

Todos los animales que fueron sometidos a castración quirúrgica fueron excluidos del experimento posteriormente.

Así, 30 cerdos (10 de cada grupo) permanecieron en el diseño experimental hasta la edad de sacrificio. A las 14 y 18 semanas de edad fueron sometidos a toma de muestras sanguíneas para su posterior análisis gasométrico y a las 16 semanas de edad para su posterior análisis hormonal (esta última sólo los grupos IE y C).

Por cuestiones de manejo en la granja, los cerdos fueron llevados a sacrificio en dos etapas: una a las 20 semanas de edad y otra a las 24 semanas; por lo tanto, 15 animales se sacrificaron en la primera etapa (5 de cada grupo experimental) y 13 animales en la segunda (ya que por razones ajenas al proyecto 2 animales murieron antes de la edad del sacrificio, uno del grupo IO y otro del grupo C respectivamente).

Al sacrificio, muestras sanguíneas fueron recolectadas y se obtuvieron los testículos. Se separó el tejido adyacente de estos, se pesaron y midieron con la ayuda de un vernier. El peso y diámetro testicular fueron registrados. Así mismo, se tomaron muestras del testículo derecho para su posterior análisis microscópico.

El diseño experimental se resume en el *ANEXO 1*.

Todas las prácticas realizadas fueron aprobadas por el Subcomité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (SICUAE) y se apegan a los principios éticos y de regulación especificados por éste.

5.3 Castración quirúrgica

Los cerdos fueron castrados bajo anestesia general mediante una combinación de tiletamina con zolazepam (nombre comercial: Zoletil) vía intramuscular a una dosis de 8-10 mg por cada kg de peso. Se realizó una previa sedación con una solución inyectable de azaperona (nombre comercial: Sural) vía intramuscular a una dosis de 2 mg por cada kg de peso.

El cuidado postoperatorio estuvo a cargo de los encargados de la granja mediante la limpieza y desinfección de corrales que se realiza continuamente así como la administración de antibióticos.

5.4 Histología y morfometría microscópica

Al realizar un corte transversal al testículo, dos muestras de 4 mm³ fueron obtenidas de la sección media, esto es, entre la red testicular y el área adyacente a la túnica albugínea. Dichas muestras se fijaron en solución de Karnovsky por 24 horas. Posteriormente se postfijaron con tetróxido de osmio (OsO₄), se deshidrataron en una serie de alcoholes y se incluyeron en resina EPON para obtener cortes semifinos de 1µm de grosor que se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% (SIGMA, México) y se montaron en un portaobjetos. Mediante el uso de un microscopio óptico se analizaron 30 secciones transversales de túbulos seminíferos al azar por cada animal y así, tres variables fueron determinadas:

- a) Índice histopatológico (IH): Para el análisis de las alteraciones histológicas se obtuvo un índice mediante una escala de cuantificación que otorga un valor según el daño (modificado de Viguera-Villaseñor et al., 2009). Así, mientras mayor sea la alteración histológica mayor será el valor asignado (*Cuadro 5.4.1*) (*Figura 5.4.1*).
- b) Actividad espermatogénica (AE): Para observar el efecto del tratamiento sobre el desarrollo del epitelio germinal se evaluó la presencia de cada tipo de célula espermatogénica desde gonocitos hasta espermátidas elongadas y espermatozoides (modificado de Avelar et al., 2010). No se caracterizaron los diferentes tipos de espermatogonias (A, B e intermedias) ni de los espermatoцитos (primarios y secundarios) (*Figura 5.4.2*).
- c) Área del epitelio seminífero (AES): La determinación del área se obtuvo a través del objetivo 20X y los túbulos se midieron por medio de un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 5.1, USA).

Tipo de alteración	Valor
Vacuolización leve	1.5
Vacuolización moderada	2
Vacuolización abundante	2.5
Degeneración celular	2
Sincicio celular	2
Descamación celular	1

Cuadro 5.4.1 Valores asignados a cada tipo de alteración en el túbulo seminífero para la determinación del índice histopatológico.

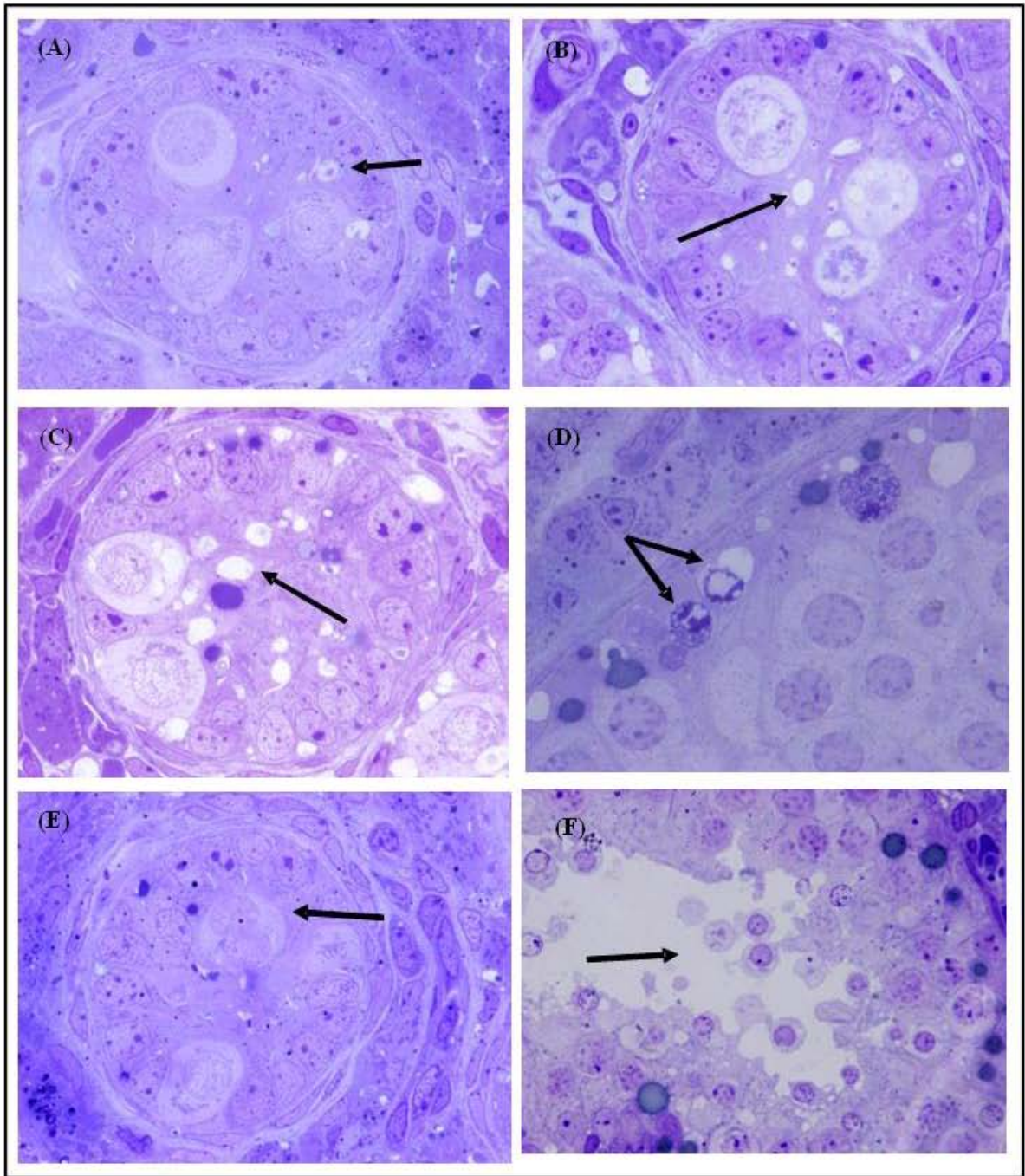


Figura 5.4.1. Parámetros para la determinación del índice histopatológico. (A) Vacuolización leve; (B) Vacuolización moderada; (C) Vacuolización abundante; (D) Degeneración celular; (E) Sincicio celular; (F) Descamación celular. Las flechas indican la alteración referida. Aumento total 1000X.

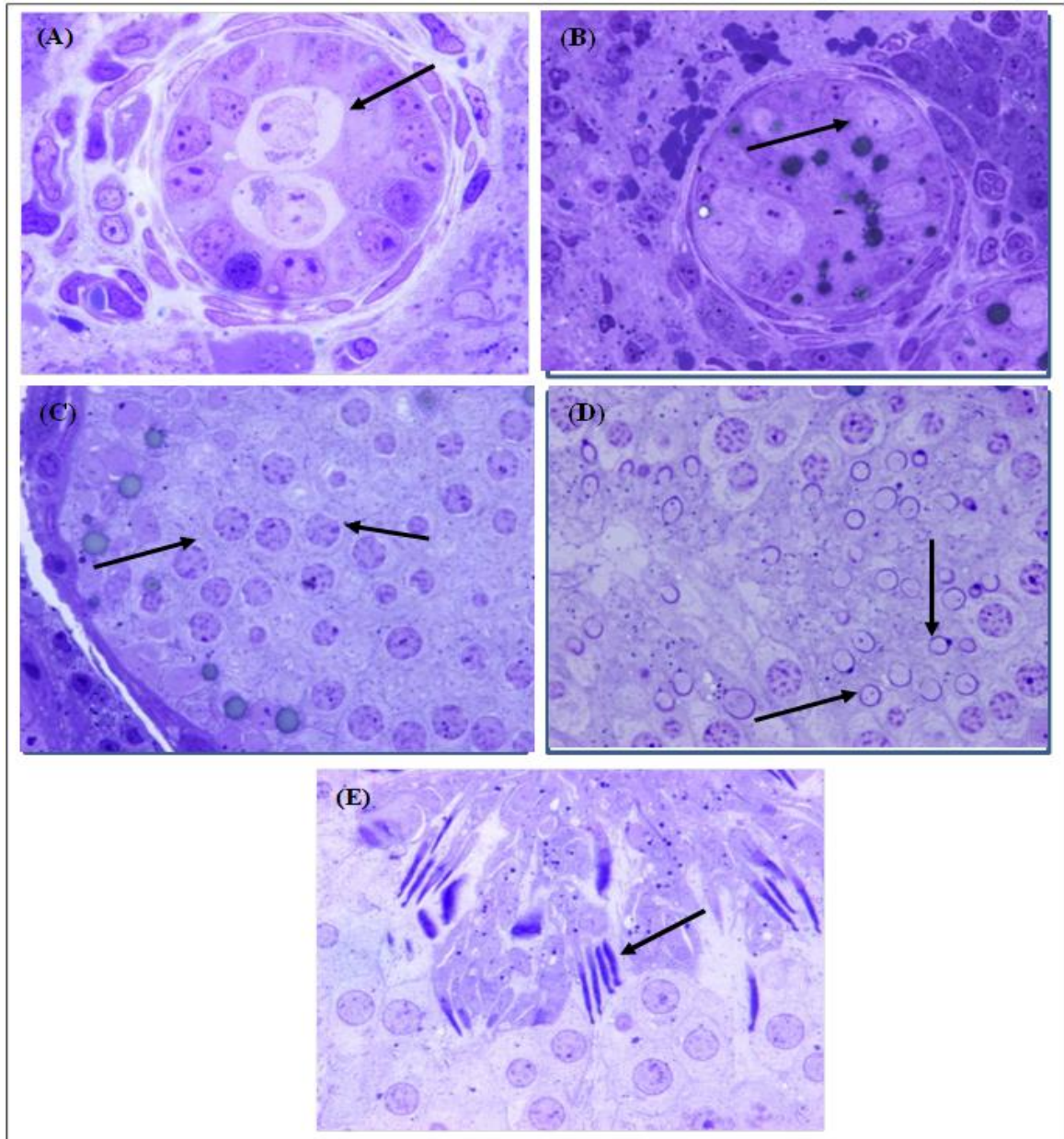


Figura 5.4.2. Presencia de los diferentes tipos de células germinales. (A) Gonocitos; (B)Espermatogonias; (C) Espermatocitos; (D)Espermátidas redondas; (E) Espermátidas elongadas y espermatozoides. Las flechas indican el tipo celular referido. Aumento total 1000X.

5.5 Análisis hormonal

Las muestras sanguíneas se colocaron en tubos vacutainer sin anticoagulante las cuales fueron centrifugadas, el suero fue obtenido y almacenado a -4°C hasta el momento del análisis. Así, niveles de estradiol (E_2) y testosterona (Te) fueron determinados mediante la técnica de inmunoensayo (Enzyme – linked Immunosorbent Assay - ELISA) con el uso de anticuerpos provenientes de la Dra. Coralie Munro (Universidad de Davis, California). Los coeficientes de variabilidad intraensayo fueron del 7% para E_2 y del 5% para Te respectivamente. Debido al número de muestras, no hubo coeficientes interensayo.

5.6 Gasometría sanguínea

Las muestras sanguíneas para gasometría se obtuvieron mediante jeringas previamente heparinizadas y se analizaron de inmediato con un analizador de parámetros críticos sanguíneos (GEM Premier 3000, Instrumentation, Laboratory Diagnostics, Estados Unidos) evaluando los siguientes parámetros: pH, hematocrito (%), glucosa (mg/dl), electrolitos [Na^+ , K^+ y Ca^{++} (mmol/L)], niveles de lactato (mg/dL), presión parcial de dióxido de carbono [pCO_2 (mmHg)] y oxígeno [pO_2 (mmHg)] (Becerril-Herrera *et al.*, 2010).

5.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos referentes a la histología y morfometría microscópica así como los niveles hormonales fueron sometidos a la prueba de Saphiro-Wilk para comprobar normalidad en los datos así como homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Si dichos supuestos se cumplían, un análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey fue llevado a cabo; de no ser así, se realizó prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Así mismo, un análisis de chi-cuadrada fue utilizado para comparar la proporción de células germinales y alteraciones histopatológicas.

Análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey fue llevado a cabo con el mismo criterio para los resultados obtenidos de la gasometría sanguínea; excepto para la variable pH, la cual se evaluó estrictamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

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 $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 *Peso y diámetro testicular*

A las 4 semanas de edad, la morfología testicular macroscópica de los cerdos con tratamiento experimental muestra un comportamiento similar a los controles; sin embargo, a las 16 semanas, el grupo IE tiende a crecer a una menor velocidad que el control.

A las 20 semanas de edad, se puede observar un marcado retraso en el crecimiento testicular en los animales que recibieron la vacuna a temprana edad, comparado con aquellos vacunados de manera ordinaria los cuales; sin embargo, reflejan un menor crecimiento que los controles.

Los animales con tratamiento experimental reflejan un notable crecimiento a las 24 semanas de edad, llegando a ser similares a los controles. Por otro lado, los animales vacunados de manera ordinaria mantienen su crecimiento por debajo de los controles (*Gráfica 6.1.1 y 6.1.2*).

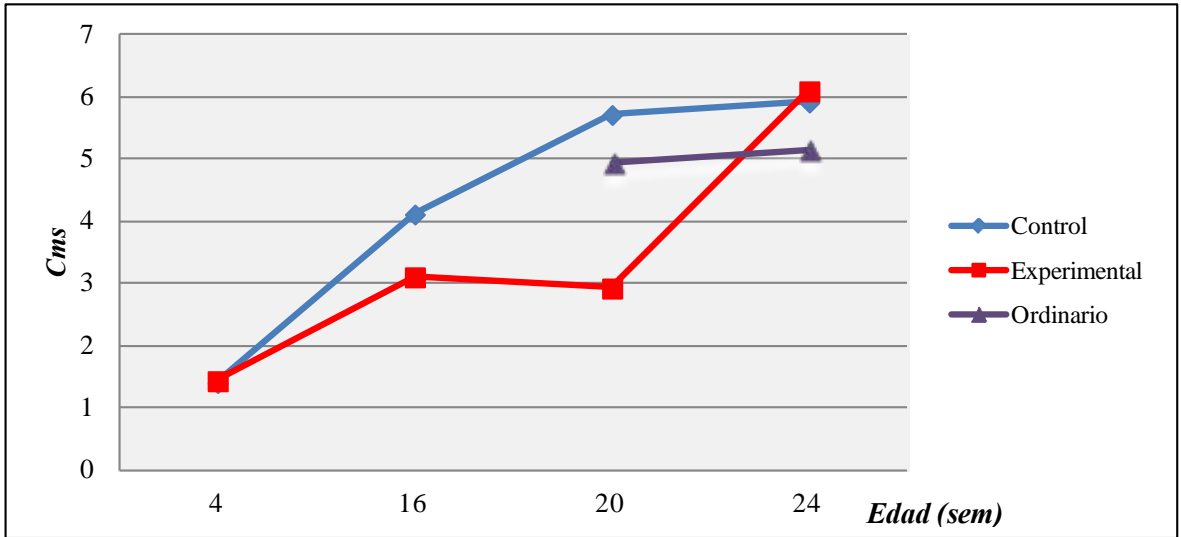
6.2 *Área del epitelio seminífero*

El área del epitelio seminífero del tratamiento experimental a las 4 semanas no muestra diferencia estadísticamente significativa respecto a los controles ($P > 0.05$). Más adelante, la variación es significativa entre tratamientos ($P < 0.05$) (*Gráfica 6.2.1*).

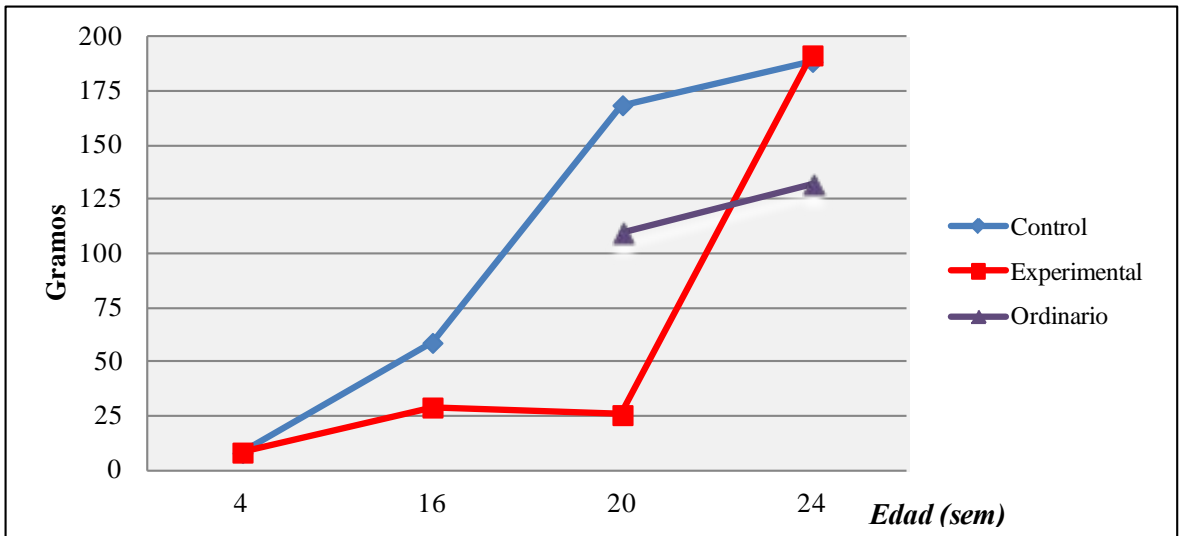
Así, a las 16 semanas, el área es menor en los animales con el tratamiento experimental y lo sigue siendo a las 20 semanas; posteriormente, dicho grupo tiende a presentar mayor área de epitelio seminífero sobre los demás grupos más no llega a haber diferencia estadísticamente significativa.

Por otro lado, los animales con el tratamiento ordinario presentan menor área epitelial que los controles en ambas edades registradas.

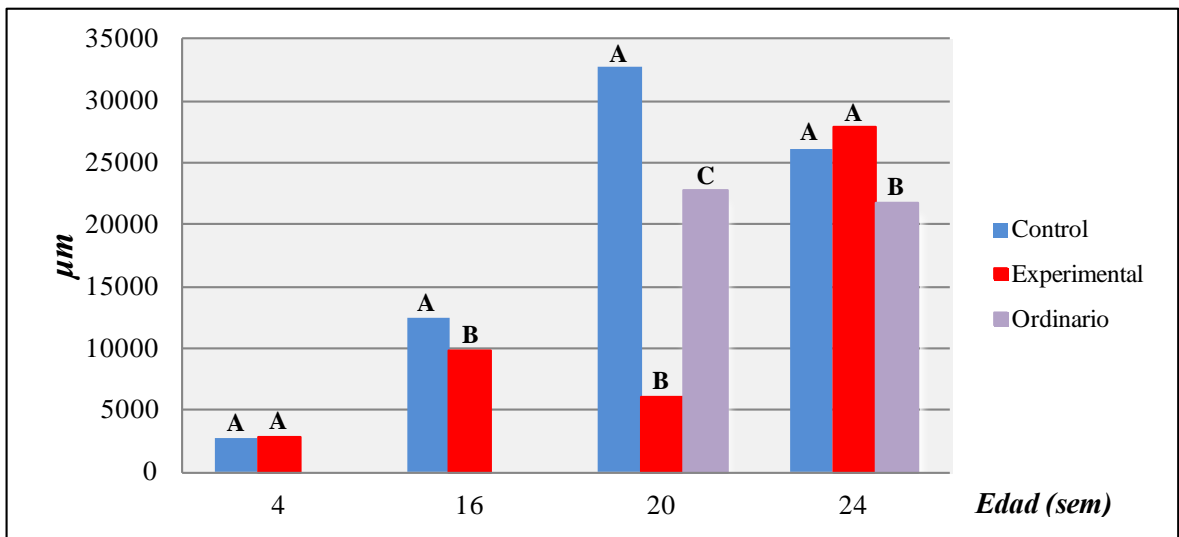
Los animales control presentan un constante incremento que tiende a disminuir a las 24 semanas de edad.



Gráfica 6.1.1. Diámetro testicular a las diferentes edades en los tratamientos durante todo el período experimental.



Gráfica 6.1.2. Peso testicular a las diferentes edades en los tratamientos durante todo el período experimental.



Gráfica 6.2.1. Área del epitelio seminífero durante el período experimental. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de la misma edad ($P < 0.05$).

6.3 Establecimiento de la espermatogénesis

A las 4 semanas de edad, las células germinales presentes en los túbulos seminíferos fueron únicamente gonocitos en ambos grupos experimentales.

A las 16 semanas de edad, el 65% de los animales ya presentaban espermatogénesis desarrollada en ambos grupos experimentales; sin embargo, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al tipo celular presente. Así, en el grupo con el tratamiento experimental presentó más cantidad de espermátidas redondas con escasa presencia de espermátidas elongadas y espermatozoides, las cuales estaban en mayor cantidad en el grupo control. (*Gráfica 6.3.1A*).

Las espermátidas redondas, elongadas y espermatozoides fueron el tipo celular predominante tanto en el grupo control como en aquellos animales con el tratamiento ordinario a las 20 semanas de edad, así mismo, no se observaron gonocitos ni túbulos sin células germinales. Por otro lado, no presentaron diferencia significativa entre la proporción de células germinales ($P > 0.05$) entre ellos; sin embargo, de los animales con el tratamiento experimental, el 60% no mostró espermatogénesis desarrollada y sólo pudieron observarse túbulos sin células germinales o con gonocitos. (*Gráfica 6.3.1B*).

A las 24 semanas de edad, no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tres grupos experimentales y la espermatogénesis estaba completamente desarrollada en el 100% de los animales. (*Gráfica 6.3.1C*).

6.4 Histopatología de túbulos seminíferos

A las 4 semanas de edad, no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales respecto al tipo de alteración que presentaron los túbulos seminíferos así como el IH ($P > 0.05$). En ambos grupos, más del 50% de los túbulos observados mostraron túbulos sin alteraciones evidentes o con leve vacuolización. (*Gráfica 6.4.1A*).

A las 16 semanas de edad, de igual forma, el IH de los animales con el tratamiento experimental no es diferente a los controles ($P > 0.05$); sin embargo, el tipo de alteraciones que presentan difiere de los controles ($P < 0.05$) ya que los animales del grupo con tratamiento experimental presenta mayor cantidad de túbulos con degeneración celular (*Gráfica 6.4.1B*).

Diferencias significativas respecto al IH y el tipo de alteraciones pueden observarse a las 20 semanas de edad ($P > 0.05$). El grupo tratado de manera ordinaria muestra descamación celular similar a los controles pero la proporción de degeneración celular, sincicios celulares y leve vacuolización es mayor. Así mismo, los animales del grupo con el tratamiento experimental tienen una mayor proporción de degeneración celular que los controles más los túbulos que no presentaron alteraciones conforman un 56% del total, por lo que predominan en este grupo (*Gráfica 6.4.1C*).

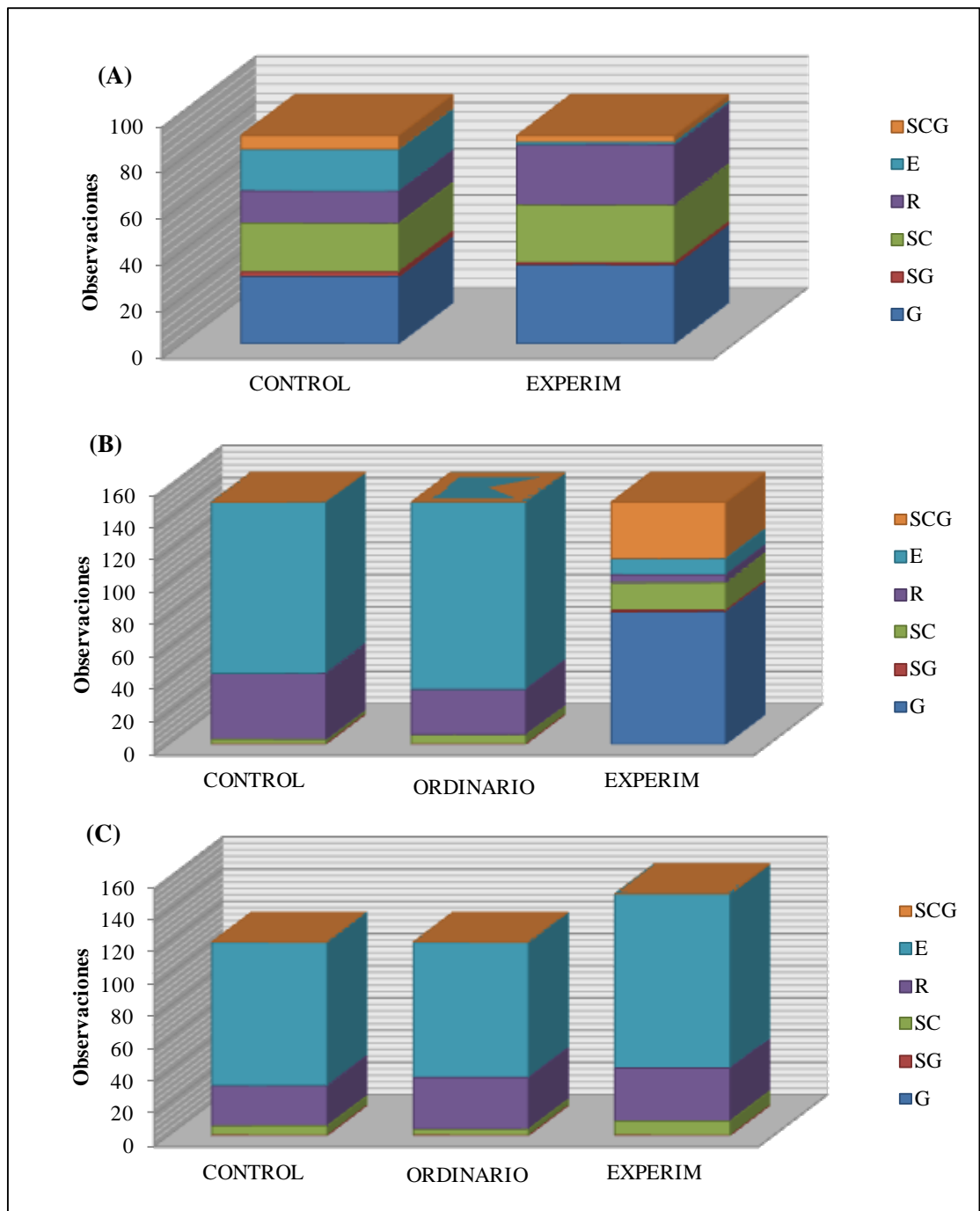
Todos los tipos de alteraciones se encuentran presentes en la misma proporción en los tres grupos experimentales a las 24 semanas de edad con IH sin diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$). La proporción de túbulos con vacuolización leve y descamación así como túbulos sin alteraciones evidentes son lo que predominan en todos los grupos experimentales (*Gráfica 6.4.1D*).

6.5 Mediciones hormonales

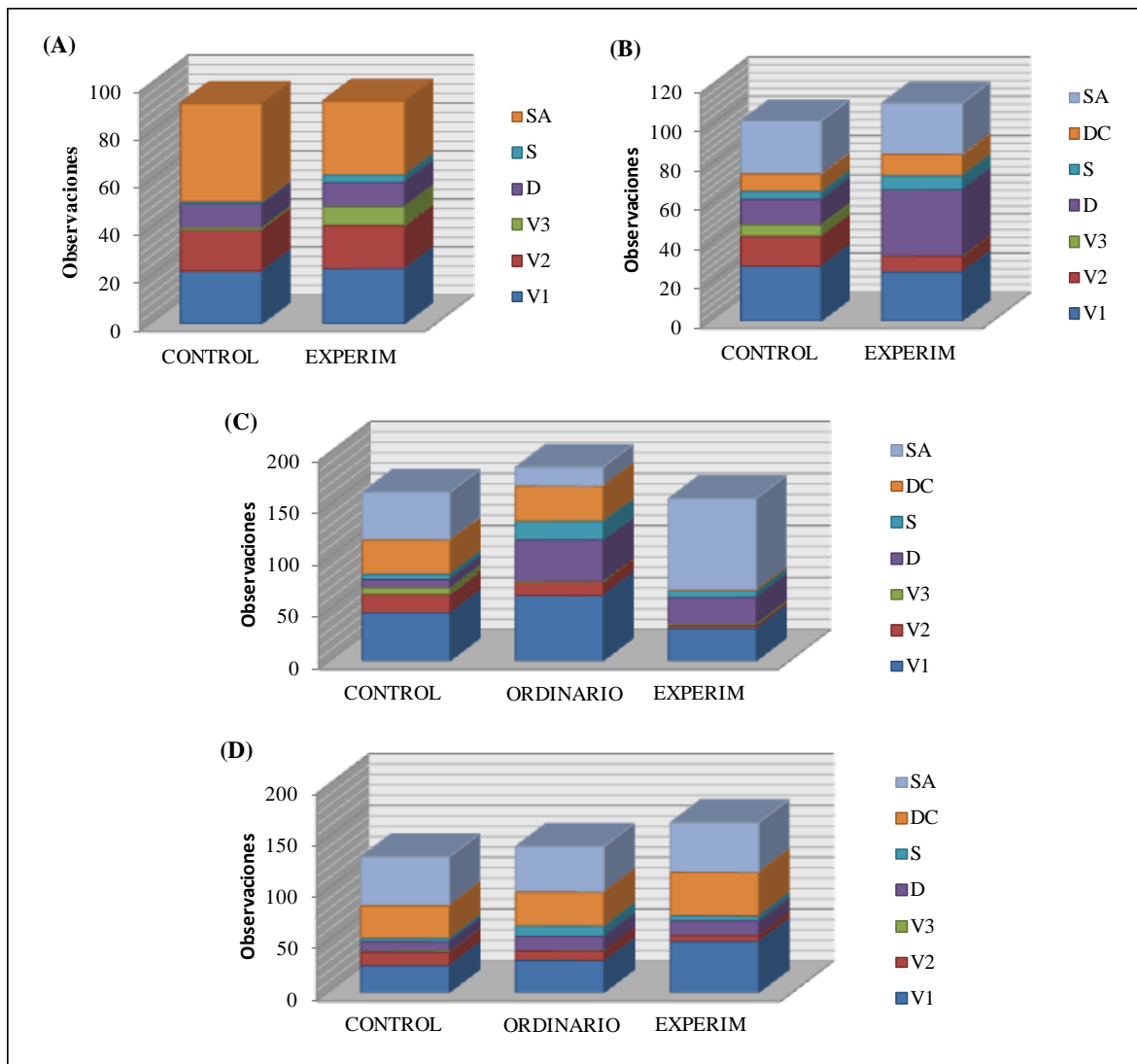
Las concentraciones hormonales en suero tanto de estradiol como de Te fueron altamente variables entre animales de cada grupo experimental por lo que análisis estadísticos no fueron llevados a cabo.

Las concentraciones de ambas hormonas se incrementaron durante todo el período experimental a diferentes niveles. Así, a las 4 semanas tanto estradiol como Te se observaron similares en ambos grupos experimentales; sin embargo, a las 16 y 20 semanas de edad ambas tuvieron concentraciones notablemente menores en los animales tratados experimentalmente que en los controles y a su vez, el grupo con el tratamiento ordinario mostró menor cantidad de esteroides que el tratado experimentalmente.

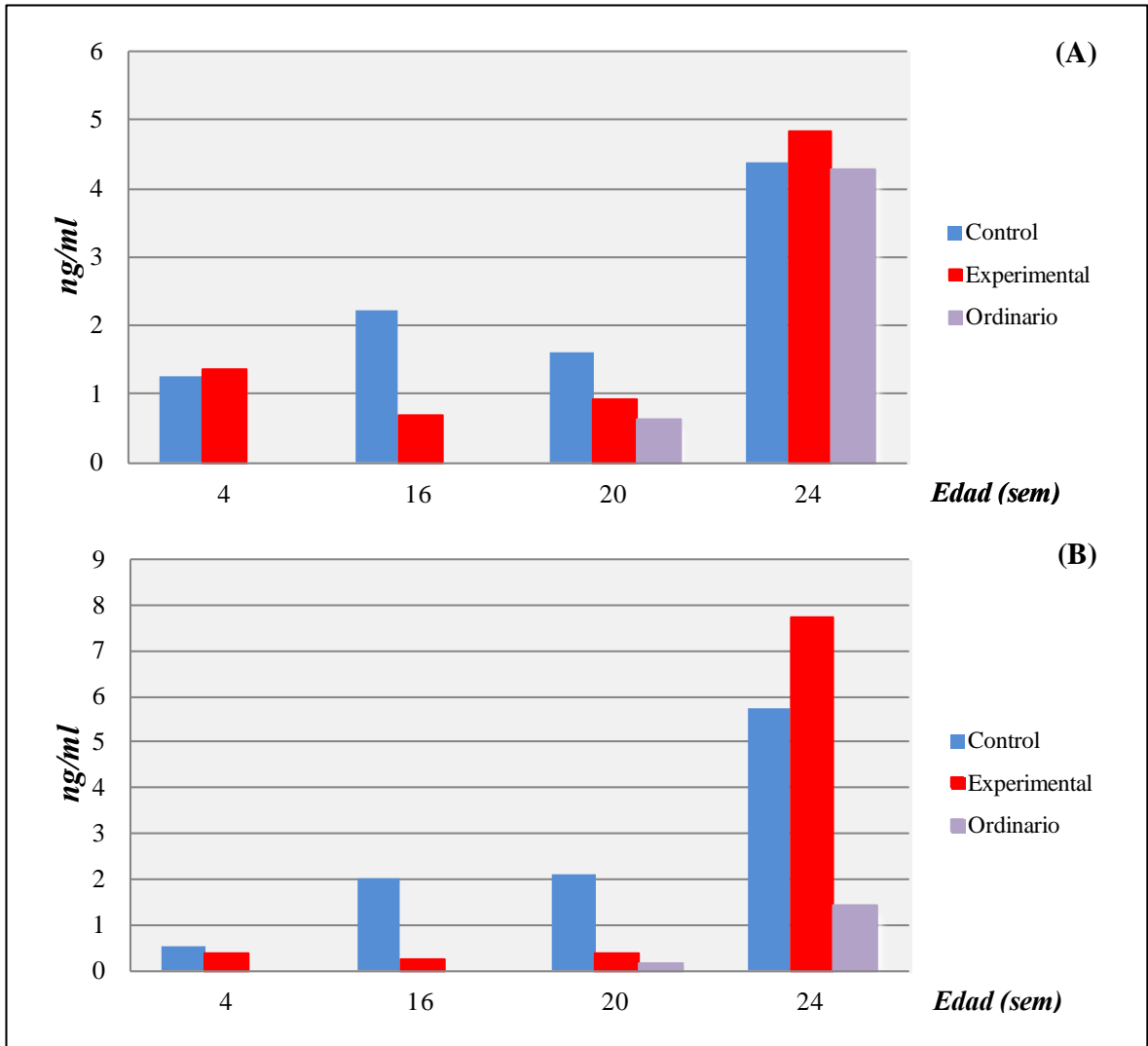
Las concentraciones en la semana 24 de edad tienden a modificarse claramente ya que el grupo con el tratamiento experimental muestra concentraciones por arriba de los otros grupos; así, el grupo con el tratamiento ordinario continúa con menores niveles de Te que el control. (*Gráfica 6.5.1*)



Gráfica 6.3.1. Tipo de células germinales presentes en los túbulos seminíferos durante el período experimental. (A) 16 semanas de edad; (B) 20 semanas de edad; (C) 24 semanas de edad. (SCG=Sin células germinales; G=Gonocitos; SG=Espermatogonia; SC=Espermatocito; R=Espermátidas redondas; E=Espermátidas elongadas y espermatozoides).



Gráfica 6.4.1. Alteraciones histopatológicas presentes en los túbulos seminíferos durante el periodo experimental. (A) 4 semanas de edad; (B) 16 semanas de edad; (C) 20 semanas de edad; (D) 24 semanas de edad. (SA=Túbulos sin alteraciones evidentes; DC=Descamación celular; S=Sincicio celular; D=Degeneración celular; V3=Vacuolización abundante; V2=Vacuolización moderada; V1=Vacuolización leve.



Gráfica 6.5.1. Concentraciones hormonales. (A) Estradiol; (B) Testosterona

6.6 Indicadores fisiometabólicos

El *cuadro 6.6.1* y *6.6.2* muestran la media y el error estándar de los diferentes parámetros fisiometabólicos, esto es, el metabolismo energético, el balance ácido-base y los gases en sangre en dos diferentes momentos del período experimental: a las 14 y 18 semanas de edad.

Así, a las 14 semanas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la mayoría de las variables; sin embargo, el grupo con el tratamiento ordinario presenta un pH más alto, menor presión parcial de CO₂ y menores niveles de lactato comparado con el grupo con el tratamiento experimental. Ambos grupos son estadísticamente iguales con el grupo control.

Posteriormente, a las 18 semanas de edad, ninguna de las variables muestra diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Variable	Tratamientos			Valor de P
	C	IO	IE	
pH	7.32 + 0.02 ^{AB}	7.36 + 0.01 ^A	7.26 + 0.02 ^B	0.029
pCO ₂ (mmHg)	60.7 + 4.17 ^{AB}	51 + 2.69 ^A	66.38 + 4.43 ^B	0.034
pO ₂ (mmHg)	31.3 + 4.01	38.77 + 4.55	31.38 + 4.58	0.394
Na ⁺ (mmol/L)	143 + 0.70	143 + 0.78	143 + 1.69	0.381
K ⁺ (mmol/L)	5.58 + 0.16	6.07 + 0.66	6.54 + 0.37	0.091
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	1.31 + 0.01	1.29 + 0.03	1.27 + 0.03	0.653
Glu (mg/dL)	99.4 + 2.83	103.56 + 4.49	100 + 2.36	0.646
Lac (mg/dL)	48.7 + 6.47 ^{AB}	38.66 + 5.05 ^A	64.25 + 5.58 ^B	0.021
Htc (%)	40.2 + 0.59	38.88 + 1.18	39.25 + 1.06	0.592

Cuadro 6.6.1. Parámetros fisiometabólicos a las 14 semanas de edad. Se presentan las medias de los valores ± error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). (Glu=Glucosa, Lac=Lactato, Htc=Hematocrito).

Variable	Tratamientos			Valor de P
	C	IO	IE	
pH	7.34 + 0.02	7.34 + 0.02	7.33 + 0.02	0.99
pCO ₂ (mmHg)	65.25 + 6.98	64.75 + 4.53	69.5 + 5.5	0.89
pO ₂ (mmHg)	19 + 4.72	21 + 3.65	21.5 + 2.5	0.913
Na ⁺ (mmol/L)	142 + 1.65	145 + 0.94	143 + 1.00	0.198
K ⁺ (mmol/L)	5.3 + 0.25	5.67 + 0.48	5.25 + 0.35	0.767
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	1.34 + 0.01	1.35 + 0.03	1.34 + 0.005	0.108
Glu (mg/dL)	90.25 + 3.22	84 + 1.77	88.5 + 2.5	0.636
Lac (mg/dL)	42.5 + 13.52	37.25 + 14.17	43.5 + 6.5	0.757
Htc (%)	50.25 + 4.85	43 + 3.39	39 + 9.00	0.23

Cuadro 6.6.2. Parámetros fisiometabólicos a las 18 semanas de edad. Se presentan las medias de los valores ± error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). (Glu=Glucosa, Lac=Lactato, Htc=Hematocrito).

7. DISCUSIÓN

Algunos 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) (Dunshea *et al.*, 2001; Claus *et al.*, 2007; Zamaratskaia *et al.*, 2008a); en este estudio los animales inmunocastrados tempranamente no mostraron ningún efecto después de la primera dosis, tanto a nivel microscópico, como macroscópico y hormonal ya que una sola dosis no es capaz de generar una alteración evidente.

Posteriormente, en las semanas 16 y 20 se observa un retraso en la espermatogénesis así como una menor área del epitelio seminífero que coincide con bajos niveles de T_e y E_2 . La ausencia de estrógenos tiene un efecto positivo significativo en la proliferación de Sertoli y un consecuente retraso en la maduración pero un mayor tamaño testicular (Berger *et al.*, 2008). Por ello, se sugiere que la ausencia de E_2 tiene un efecto positivo significativo en la proliferación y negativo en la maduración de estas células previo a la pubertad, dando lugar a un menor tamaño testicular superando a los controles en la semana 24 de edad.

Zamaratskaia *et al.*, 2008a, sugieren 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; sin embargo, este estudio demuestra que la inmunocastración temprana retrasa el crecimiento testicular comparada con un tratamiento ordinario. Posteriormente, este variable se revierte, llegando a ser incluso más grandes que los controles en la semana 24 de edad, mostrando un posible efecto reversible de la vacuna (Einarsson *et al.*, 2009).

Zamaratskaia *et al.*, 2008b, 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.

Los bajos niveles de E_2 y T_e , así como el tamaño testicular de animales inmunocastrados temprana y ordinariamente comparados con los controles en las semanas 16 y 20, demuestran el efecto significativo de la vacuna antiGnRH, que, aunque no demostramos la

ausencia de olor sexual, es una medida indirecta de medirlo (Oonk *et al.*, 1995, Turkstra *et al.*, 2002).

Además de los esteroides secretados por las células de Leydig (los cuales se encuentran en bajas concentraciones) secretan otros factores como la beta-endorfina, que quizá también está involucrada en regular la función y proliferación de Sertoli (Fabbri *et al.*, 1998; Orth y Boehm, 1990).

Para el mantenimiento de la espermatogénesis una interacción entre FSH y Te es básica. Mientras que FSH estimula la proliferación y Te influye en la espermiogénesis, la acción de ambas es indispensable para aspectos cuantitativos de la espermatogénesis (McLachlan *et al.*, 1996; Franca *et al.*, 2000). La presencia de Te puede mantener la espermatogénesis hasta la espermiación, sin la presencia de FSH (McLachlan *et al.*, 1994). Además, algunos otros estudios han demostrado que la inmunización mediante GnRH disminuye los niveles de testosterona, ICSH y estradiol pero no ocurre lo mismo para FSH, pues ésta no se altera; sin embargo, se ve afectada la espermatogénesis incluyendo la mitosis de espermatogonias (Wagner *et al.*, 2006).

Por otro lado, células multinucleadas se forman debido a aberturas de puentes intercelulares que conectan a células clones (Faridha *et al.*, 2007). Así, las uniones gap que predominan en las células testiculares están formadas por conexinas (principalmente cx43), que en ausencia de andrógenos, no se expresan. A las 16 semanas se vio un efecto significativo en el tipo de alteraciones en el tratamiento temprano, predominando la degeneración celular y los sincicios celulares probablemente por la ausencia de andrógenos producto de la inmunocastración. (Kopera *et al.*, 2011).

Diversos factores de estrés, tales como el transporte, el ayuno y la baja ingesta de agua producen un aumento del hematocrito que puede ser causado por dos factores: el movimiento de fluidos fuera del compartimento vascular y la contracción esplénica, que a su vez puede ser causada por la actividad del sistema simpático, mediante las catecolaminas liberadas por el estrés de los factores antes descritos (Mittchell *et al.*, 1988). Por ello, los valores de hematocrito son un indicador indirecto de estrés pues representan una adaptación metabólica al incremento en la demanda de energía que se encuentra mediada por las catecolaminas hepáticas que inducen la glicogenolisis (Shaw *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1993; Prunier *et al.*, 2005). Así, los niveles de hematocrito de animales del grupo control a las 18 semanas de edad tienden a ser mayores; lo cual sugiere mayor actividad y por consiguiente mayor estrés.

Se sabe que la partición del glicógeno muscular, como resultado de un esfuerzo muscular extremo puede llevar a la producción de grandes cantidades de ácido láctico, los cuales serán liberados al torrente sanguíneo. Por lo tanto, concentraciones elevadas de ácido láctico en la sangre se presentan después de una actividad muscular excesiva. Adicionalmente la liberación de catecolaminas como respuesta al miedo o excitación, también puede llevar a una rápida glicogenolisis y así de este modo a una excesiva producción de lactato (Shaw y Tume, 1992; Fernández *et al.*, 1995). Así, los niveles de lactato presentaron diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos experimental y ordinario a las 14 semanas de edad; sin embargo, comparados con el control no presentan diferencia estadística. De hecho, ninguno de los tratamientos, en comparación con los controles mostraron diferencia significativa en ambas edades en todos los indicadores de estrés analizados en este estudio.

Así, de la misma forma que Guay *et al.*, 2013, se sugiere que la inmunocastración, ya sea ordinaria o temprana, puede o no mejorar situaciones de estrés. A diferencia de diversos estudios, los cuales han demostrado que la inmunocastración puede mejorar el bienestar animal, pues animales inmunocastrados presentan menor conducta agresiva que machos enteros resultando en un ambiente con menor estrés, más eficientemente, después de la aplicación de la segunda inmunización (Rydhmer *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2012).

Por otro lado, el estrés causado por conductas agresivas en la pubertad se relaciona directamente con los niveles de hormonas testiculares, ya que, machos castrados quirúrgicamente e inmunocastrados expresan una menor agresión y baja incidencia de montas comparada con machos enteros (Dunshea *et al.*, 2001; Cronin *et al.*, 2003; Velarde *et al.*, 2007; Rydhmer *et al.*, 2010). Por el contrario, Zamaratskaia *et al.*, 2005, no encontraron relación alguna entre los niveles de hormonas gonadales como la testosterona y niveles agresivos al igual que el presente estudio, en donde los niveles hormonales y las alteraciones morfológicas en las semanas 16 y 20 de edad son significativamente diferentes comparado con los controles a diferencia de los parámetros fisiometabólicos los cuales, al comportarse de manera similar en los grupos, no hay una alteración en el estrés y por lo tanto, podría sugerirse que la conducta agresiva no se diferenció entre grupos. Así, la relación entre los andrógenos y la conducta agresiva es extremadamente compleja pues existen una gran cantidad de factores involucrados tales como especie, edad, etapa de la pubertad y ambiente; que pueden influir de manera relevante (Claus *et al.*, 1994; Giersing *et al.*, 2000).

8. CONCLUSIONES

Los resultados en este estudio mostraron que un protocolo alternativo de inmunocastración temprana tiene efectos positivos sugerentes a inhibición del olor sexual considerando la segunda dosis de aplicación hasta 9 semanas previo al sacrificio. Posterior a este lapso, se observa un posible efecto reversible de la vacuna.

Así mismo, las observaciones sugieren que dicho protocolo de administración impacta en el segundo período de proliferación postnatal de células de Sertoli y Leydig y por consiguiente, en la maduración de éstas, evidenciado por el retraso en la espermatogénesis de aquellos que recibieron la vacuna a una edad temprana.

Por otro lado, la respuesta fisiometabólica no mostró ninguna diferencia en presentación de estrés entre tratamientos, por lo que se observa que la inmunocastración no tiene ningún efecto diferencial en la conducta comparada con animales enteros.

Así, se concluye que la inmunocastración temprana puede ser funcional para reducir tamaño testicular considerando una primera dosis en las primeras semanas de vida; sin embargo, resulta de importancia llevar más allá el estudio en los tiempos de la segunda aplicación, ya que de ésta depende la abolición total del olor sexual así como la reducción del tamaño testicular al llegar al sacrificio el cual puede impactar negativamente en el rendimiento de la canal.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adeeko AO, Dunne E, Mather J, Moore A, Morris ID. Testicular germ cell populations in the adult rat after continuous in-vivo testicular infusion of inhibin-A and activin-A. *Int J Androl* 1996; 19: 69-76.
- Aguilar J, Gonzalvo MC, Clavero A, Ortiz A, González E, Ortiz-Galisteo JR, Peralta L, Maza M, Castilla JA. Células madre espermatogonias. *Rev Int Androl* 2004; 2: 54-59.
- Almeida FFL, Leal MC, Franca LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol Reprod* 2006; 75: 792-799.
- Amann RP, Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci* 1983; 57: 380-403.
- Andersson K, Brunius C, Zamaratskaia G, Lundström K. Early vaccination with Improvac®: effects on performance and behaviour of male pigs. *Animal* 2012; 6: 87-95.
- Araki K, Arai KY, Watanabe G, Taya K. Involvement of inhibin in the regulation of the follicle-stimulating hormone secretion in the young adult male shiba goat. *J Androl* 2000; 21: 558-565.
- At-taras EE, Berger T, McCarthy MJ, Conley AJ, Nitta-oda BJ, Roser JF. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. *J Androl* 2006; 27: 552-559.
- Avelar GF, Oliveira CF, Soares JM, Silva IJ, Dobrinski I, Hess RA, Franca LR. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: a non - random event. *Theriogenology* 2010; 74: 11-23.
- Bauer A, Lacorn M, Danowski K, Claus R. Effects of immunization against GnRH on gonadotropins, the GH-IGF-I-axis and metabolic parameters in barrows. *Animal* 2008; 2: 1215-1222.
- Becerril-Herrera M, Alonso-Spilsbury M, Trujillo Ortega ME, Guerrero-Legarreta I, Ramírez-Necoechea R, Roldán-Santiago P, Pérez-Sato M, Soní-Guillermo E, Mota-Rojas D. Changes in blood constituents of swine transported for 8 or 16 h to an Abattoir. *Meat Sci* 2010; 86: 945-948.

- Berger T, McCarthy MJ, Pearl CA, At-taras EE, Roser JF, Conley AJ. Reducing endogenous estrogens during the neonatal and juvenile periods affects reproductive tract development and sperm production in postpuberal boars. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 218-235.
- Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci* 1977; 44: 818-833.
- Blanco A, García J. Aparato genital masculino. En: Gázquez-Ortíz A. Tratado de histología veterinaria. Barcelona: Masson, 2004: 363-380.
- Bonneau M. Compounds responsible for boar taint, with special emphasis on androstenone: a review. *Livest Prod Sci* 1982; 9: 687-707.
- 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.
- Chamindrani Mendis-Handagama SML, Siril Ariyaratne HB. Differentiation of adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 2001; 65: 660-671.
- Chubb C. Genes regulating testis size. *Biol Reprod* 1992; 47: 29-36.
- Claus R., Weiler U, Herzog A. Physiological aspects of androstenone and skatole formation in the boar—A review with experimental data. *Meat Sci* 1994; 38: 289–305.
- 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.
- 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.
- Dantzer RP, Mormede R. El estrés en la cría intensiva del ganado. España: Acribia, 1984.
- De Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl* 2000; 21: 776-798.
- 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.

- Eddy EM. Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 103-128.
- 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.
- Fabbri A, Knox G, Buczko E, Dufau ML. Beta-endorphin production by the fetal Leydig cell: regulation and implications for paracrine control of Sertoli cell function. *Endocrinology* 1988; 122: 749-755.
- Faridha A, Faisal K, Akbarsha MA. Aflatoxin treatment brings about generation of multinucleate giant spermatids (symplasts) through opening of cytoplasmic bridges: light and transmission electron microscopic study in Swiss mouse. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 403-408.
- Fernández X, Meunier-Salatin MC, Mormede P. Agonistic behavior, plasma stress hormones, and metabolites in response to dyadic encounters in domestic pigs: interrelationships and effect of dominance status. *Physiol Behav* 1994a; 56: 841-847.
- Fernández X, Meunier-Salatin MC, Ecolan P. Glycogen depletion according to muscle and fibre types in response to dyadic encounters in pigs (*Sus scrofa domestica*) – relationships with plasma epinephrine and aggressive behaviour. *Comp Biochem Physiol* 1994b; 109: 869-879.
- Fernández X, Meunier-Salatin MC, Ecolan P, Mormede P. Interactive effect of food deprivation and agonistic behavior on blood parameters and muscle glycogen in pigs. *Physiol Behav* 1995; 58: 337-345.
- Franca LR, Hesse RA, Cooke PS, Russell LD. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec* 1995; 242: 57-69.
- Franca LR, Cardoso FM. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue Cell* 1998; 30: 573-582.

- Franca LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 1998; 59: 1371-1377.
- Franca LR, Silva VA Jr, 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.
- Franca LR, Avelar GF, Almeida FFL. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63: 300-318.
- Frankenhuis MT, Kramer MF, de Rooij DG. Spermatogenesis in the boar. *Vet Q* 1982; 4: 57-61.
- Geiger TL, Khan M, Whisnant CS, Prien SD, Khan SA. Regulation of DNA synthesis in Leydig cells obtained from neonatal pig testes. *Domest Anim Endocrinol* 1999; 17: 65-75.
- Giersing M, Lundström K, Andersson A. Social effects and boar taint: significance for production of slaughter boars (*Sus scrofa*). *J Anim Sci* 2000; 78: 296–305.
- Gonyou HW. Why the study of animal behavior is associated with the animal welfare issue. *J Anim Sci* 1994; 72: 2171-2177.
- Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 411-416.
- Guay K, Salgado G, Thompson G, Backus B, Sapkota A, Chaya W, McGlone JJ. Behavior and handling of physically and immunologically castrated market pigs on farm and going to market. *J Anim Sci* 2013; 91: 5410-5417.
- 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.
- Heckert LL, Griswold MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 129-148.
- Hess RA, Cooke PS, Bunick D, Kirby JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology* 1993; 132: 2607–2613.

- 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.
- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 471-480.
- Johnson L, Thompson DL, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci* 2008; 105: 23-51.
- Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K, Akagi S, Shimada A, Taya K, Watanabe G, Hasegawa Y. Production and endocrine role of inhibin during the early development of bull calves. *Biol Reprod* 2001; 65: 209-215.
- Klobucar I, Kosec M, Cebulj-Kadunc N, Majdic G. Postnatal hypothyroidism does not affect prepubertal testis development in boars. *Reprod Domest Anim* 2003; 38: 193-198.
- Kopera I, Durlej M, Hejmej A, Knapczyk-Stwora K, Duda M, Slomczynska M, Bilinska B. Differential expression of connexin 43 in adult pig testes during normal spermatogenic cycle and after flutamide treatment. *Reprod Dom Anim* 2011; 46: 1050-1060.
- Lee HM, Oh BC, Yang JH, Cho J, Lee G, Lee DS, Hwang WS, Lee JR. Age-dependent expression of immune-privilege and proliferation-related molecules on porcine Sertoli cells. *Xenotransplantation* 2006; 13: 69-74.
- Lejeune H, Chuzel F, Sanchez P, Durand P, Mather J, Saez J. Stimulating effect of both human recombinant inhibin A and activin A on immature porcine Leydig cell functions in vitro. *Endocrinology* 1997; 138: 4783-4791).
- Lin T, Calkins JK, Morris PL, Vale W, Bardin CW. Regulation of Leydig cell function in primary culture by inhibin and activin. *Endocrinology* 1989; 125: 2134-2140.
- 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.
- Lunstra DD, Wise TH, Ford JJ. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biol Reprod* 2003; 68: 140-150.

- Mahato D, Goulding EH, Korach KS, Eddy EM. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- α for development of function. *Endocrinology* 2000; 141: 1273-1276.
- McCoard SA, Lunstra DD, Wise TH, Ford JJ. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biol Reprod* 2001; 64: 689-695.
- McCoard SA, Wise TH, Lunstra DD, Ford JJ. Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *J Endocr* 2003; 178: 395-403.
- 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.
- McLachlan RI, Wreford NG, Tsonis NG, Kretser DM, Robertson DM. Testosterone effects on spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized rat. *Biol Reprod* 1994; 50: 271-280.
- McLachlan RI, Wreford NG, O'Donell L, Kretser DM, Robertson DM. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocr* 1996; 148: 1-9.
- Mitchell G, Hattingh J, Ganhao M. Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter. *Vet Rec* 1988; 123: 201-205.
- Mota-Rojas D, Becerril M, Lemus C, Sánchez P, González M, Olmos SA, Ramírez R, Alonso-Spilsbury M. Effects of mid-summer transport duration on pre- and post-slaughter performance and pork quality in Mexico. *Meat Science* 2006; 73: 404-412.
- Ohnuma K, Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K, Ozawa M, Hasegawa Y. Production of inhibin A and inhibin B in boars: changes in testicular and circulating levels of dimeric inhibins and characterization of inhibin forms during testis growth. *Dom Anim Endocrinol* 2007; 33:410-421.
- 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

- Orth JM. The role of FSH in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 1984; 115: 1248–1255.
- Orth JM, Boehm R. Endorphin suppresses FSH-stimulated proliferation of isolated neonatal Sertoli cells by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Anat Rec* 1990; 226: 320-327.
- Palmero S, Benahmed M, Morera AM, Trucchi P, Fugassa E. Identification of nuclear tri-iodothyronine receptors in Sertoli cells from immature piglet testes. *J Mol Endocrinol* 1992; 9: 55–59.
- Palmero S, Bardi G, Bolla F, Fugassa E. Influence of thyroid hormone on Sertoli cell protein metabolism in the prepubertal pig. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1996; 72, 163–170.
- Pelliniemi LJ. Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *Am J Anat* 1975;144: 89–111.
- Perey B, Clermont Y, Leblond CP. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat* 1961; 108: 47–77.
- Peyrat JP, Meusy-Dessolle N, Garnier J. Changes in Leydig cells and luteinizing hormone receptors in porcine testis during postnatal development. *Endocrinology* 1981; 108: 625-631.
- 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>.
- Prunier A, Mounier AM, Hay M. Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *J Anim Sci* 2005; 83: 216–22.
- Ross AJ, Amy SP, Mahar PL, Lindsten T, Knudson CM, Thompson CB, Korsmeyer SJ, MacGregor GR. BCLW mediates survival of post mitotic Sertoli cells by regulating BAX activity. *Dev Biol* 2001; 239: 295–308.
- Rydhmer L, Zamaratskaia G, Andersson HK, Algiers B, Guillemet R, Lundström K. Aggressive and sexual behaviour of pigs raised without castration. *Acta Agric Scand A Anim Sci* 2006; 56: 109–119.
- Rydhmer L, Lundström K, Andersson K. Immunocastration reduces aggressive and sexual behaviour in male pigs. *Animal* 2010; 4: 965–972.

- Schaefer AL, Jones SD, Stanley RW. The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. *J Anim Sci* 1997; 75: 258-265.
- Shaw FD, Tume RK. The assessment of pre-slaughter treatments of livestock by measurement of plasma constituents – a review of recent work. *Meat Science* 1992; 32: 311-329.
- Skjaerlund DM, Mulvaney DR, Bergen WG, Merkel RA. Skeletal muscle growth and protein turnover in neonatal boars and barrows. *J Anim Sci* 1994; 72: 315-321.
- Sondergaard LV, Dagnaes-Hansen F, Herskin MS. Welfare assessment in porcine biomedical research – Suggestion for an operational tool. *Res Vet Sci* 2011; 91: e1-e9.
- 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.
- Swanlund DJ, N´Diaye MR, Loseth KJ, Pryor JL, Crabo BG. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boars. *Biol Reprod* 1995; 53: 749-757.
- Tarn CY, Rosenkrans Jr CF, Apple JK, Kirby JD. Effects of 6-N-propyl-2-thiouracil on growth, hormonal profiles, carcass and reproductive traits of boars. *Anim Reprod Sci* 1998; 50: 81-94.
- Tilmann C, Capel B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Endocr Rev* 2002; 57: 1-18.
- 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.
- Tuyttens FAM. Effects of castration on the welfare and social behavior of pigs: a review. *Memorias del 36o. Congreso de la Sociedad Internacional de Etología Aplicada*; 2002 agosto 6-10; Egmond aan Zee (Holanda), 2002:41.
- Vandalem JL, McNamara M, Petit R, Hennen G. Developmental changes in gonadotrophins and testicular gonadotrophin receptors in the pig, from neonatal to adult life. *J Endocr* 1986; 111: 301-308.
- Van Haster LH, de Jong FH, Docter R, de Rooij DG. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate

tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology* 1993; 133: 755-760.

- Van Pelt AMM, De Rooij DG, Van der Burg B, Van der Saag PT, Gustafsson J, Kuiper GGJ. Ontogeny of estrogen receptor- β expression in rat testis. *Endocrinology* 1999; 140: 478-483.
- Van Straaten HW, Wensing CJ. Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in the pig. *Biol Reprod* 1977; 17: 467-472.
- Van Straaten HW, Wensing CJ. Leydig cell development in the testis of the pig. *Biol Reprod* 1978; 18: 86-93.
- Velarde A, Gispert M, Oliver MA, Soler J, Tibau J and Fabrega E. The effect of immunocastration on the behaviour of pigs. 41st International Congress of the International Society for Applied Ethology; 2007 agosto 8–12; Merida, Mexico: 117.
- Viguera-Villaseñor RM, Molina-Ortiz D, Reyes-Torres G, Santamaría del Angel D, Moreno-Mendoza NA, García Cruz ME, Cuevas-Alpuche O, Rojas-Castañeda JC. Effect of allopurinol on damaged caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta histochemica* 2009; 111: 127-137.
- Wagner A, Claus R. Involvement of glucocorticoids in testicular involution after active immunization of boars against GnRH. *Reproduction* 2004; 127: 275-283.
- Wagner A, Messe N, Bergmann M, Lekhkota O, Claus R. Effects of estradiol infusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis. *Journal of Andrology* 2006; 27: 880-889.
- Wing TY, Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 1982; 165: 13-25.
- Wrobel KH, Dellman HD. Sistema reproductor masculino. En: Dellman HD. *Histología Veterinaria*. Pennsylvania: Acribia, 1993: 245-266.
- Yamada F, Inoue S, Saitoh T, Tanaka K, Satoh S, Takamura Y. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinol* 1993; 132: 2199-2205.
- Yin ZZ, Xie L, Zeng MH, Li R, Huang YB, Zhu M, Chen G, Chen S. Sertoli cells induce xenolymphocyte apoptosis in vitro. *Transplant Proc* 2006; 38: 3309-3311.
- Zamarataskaia G. Factors involved in the development of boar taint (tesis de doctorado). Uppsala Suecia: Swedish University of Agricultural Sciences, 2004.

- Zamaratskaia G, Rydhmer L, Chen G, Madej A, Andersson K, Lundström K. Boar taint is related to endocrine and anatomical changes at puberty but not to aggressive behaviour in entire male pigs. *Reprod Dom Anim* 2005; 40: 500-506.
- 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* 2008a; 43: 351-359.
- Zamaratskaia G, Rydhmer L, Andersson HK, Chen G, Lowagie S, Andersson K, Lundström K. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac, on hormonal profile and behavior of male pigs. *Anim Reprod Sci* 2008b; 108: 37-48.

ANEXOS

Anexo 1
Diseño Experimental

Grupo	Cerdos	Semanas de edad															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
IT	1			■	■	■											
	2			■	■	■											
	3			■	■	■											
	4			■								■				■	■
	5			■								■				■	■
	6			■								■				■	■
C	7				■	■											
	8				■	■											
	9				■	■											
	10															■	■
	11															■	■
	12															■	■

Grupo	Cerdos	Semanas de edad																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
IC	13																								
	14																								
	15																								
	16																								
	17																								
	18																								
	19																								
	20																								
	21																								
	22																								
IT	23																								
	24																								
	25																								
	26																								
	27																								
	28																								
	29																								
	30																								
	31																								
	32																								
C	33																								
	34																								
	35																								
	36																								
	37																								
	38																								
	39																								
	40																								
	41																								
	42																								

- * Administración de la vacuna antiGnRH
- * Peso y diámetro testicular, toma de muestras testiculares
- * Toma de muestras sanguíneas para análisis hormonal
- * Toma de muestras sanguíneas para análisis gasométrico