



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EFECTO DE LA VACUNACIÓN CONTRA GnRH SOBRE EL TESTÍCULO DE CERDO MINIATURA
EN PROTOCOLOS DE CORTA Y LARGA DURACIÓN”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALAN JAIR CONTRERAS ORTIZ

TUTORA PRINCIPAL:

MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, DICIEMBRE 2022



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.

Dedicatorias

A LUIS ARTURO ESTRADA GARCÍA

Gracias por estar conmigo en todo momento y no dejarme caer en esos momentos de flaqueza, tu ayuda y apoyo incondicional han sido factores fundamentales para la conclusión de este maravilloso proyecto.

A MI MADRE

Gracias por todo ese amor y apoyo que siempre me has dado y sobre todo por siempre creer en mí y nunca dejarme caer en los momentos difíciles. ¡Gracias má!

A KARINA COSÍO

A la mejor amiga que la vida tuvo bien en poner en mi camino gracias por siempre brindarme ese apoyo incondicional y por siempre ser mi cómplice.

A LA DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

Muchas gracias Dra. Por creer en mí y por no dejarme solo durante todo este proceso a pesar de las adversidades. Usted siempre ha sido una persona invaluable en mi vida y mi modelo a seguir. ¡Muchas gracias!

A LA DRA ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

No tengo palabras suficientes para agradecer todo el tiempo y dedicación que me ha otorgado a lo largo de esta etapa, gracias por todos sus consejos y porque no también por sus “jalones de orejas” que sin ellos no estaría en este momento de mi vida profesional, ¡Dra. muchas muchas gracias!

A LA FMVZ Y A LA UNAM

Agradezco a mis amadas FMVZ y UNAM por todos estos años de educación gracias a los cuales soy el profesionista que soy hoy en día.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis, el cual lleva número de aprobación 449384.

Agradezco al programa de Programa de Apoyo a Proyectos Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con numero de autorización IN-221218 por el apoyo económico brindado para la realización de esta tesis.

Agradezco al Instituto Nacional del Pediatría que bajo el número de proyecto 2019/063-INP el apoyo brindado en la realización de esta tesis.

Agradezco al Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la UNAM, todo el apoyo otorgado para el alojamiento y cuidado de los animales mencionados en este proyecto.

Agradezco al Sr. Pedro Medina Granados por su invaluable apoyo en la parte experimental de este proyecto.

Resumen

El cerdo es una especie empleada para consumo cárnico e investigación. A través del tiempo han surgido diferentes razas, como los cerdos miniatura. Por otro lado, se ha empleado la castración inmunológica con Improvac® como alternativa a la castración quirúrgica para evitar el olor sexual en verracos. Hasta el momento se desconocen los efectos sobre el desarrollo testicular al aplicar un mayor número de dosis en los cerdos miniatura. El objetivo fue determinar el efecto supresor de la vacuna contra la hormona GnRH en diferentes protocolos de aplicación. Empleamos 33 cerdos miniatura divididos en: grupo Control, n=9; grupo Tratamiento Convencional (TC) n=9, aplicación de dos dosis de vacuna; grupo Sin Tiempo de Retiro n=9, aplicación de 4 o más dosis de vacuna y grupo Con Tiempo de Retiro n=6, con 4 o 5 dosis de vacuna más 8 semanas de descanso. Al llegar a la edad necesaria fueron castrados quirúrgicamente, se tomaron 2 muestras testiculares; la primera para inclusión en parafina, para determinación de receptores a andrógenos (RA) y Factor de proliferación celular (PCNA) por inmunohistoquímica y la segunda para ser incluida en EPON y realizar mediciones morfológicas, determinar índice de maduración e índice histopatológico. El grupo TC tuvo diferencias contra el grupo control en algunas mediciones, mientras que los otros dos grupos fueron diferentes en las mediciones realizadas. Debido a que en los grupos con más dosis la vacuna se aplicó en momentos críticos del desarrollo testicular se observaron alteraciones severas más evidentes que en el grupo TC el cual si tuvo oportunidad de tener la primera etapa, por lo que sus alteraciones presentaron diferencias comparadas con los otros dos grupos. Concluimos que la aplicación de 4 o más dosis que coincidan con etapas críticas del desarrollo testicular pueden provocar daños probablemente irreversibles al testículo de cerdo miniatura.

Palabras clave

Inmunocastración, Inmunohistoquímica, PCNA, Cerdo miniatura, Desarrollo testicular, Índice de Maduración.

Abstract

The pig is a species that is used for meat consumption and for research. Over time different breeds have emerged, among which are miniature pigs. On the other hand, immunological castration with Improvac® has been used as an alternative to surgical castration to avoid sexual odor in boars. So far, the effects on testicular development are unknown when applying a greater number of doses in minipigs. The objective was to determine the suppressive effect of the GnRH vaccine in different application protocols. We used 33 minipigs divided into: control group, n=9; TC group n=9, application of two doses of vaccine; STR group n=9, application of 4 or more doses of vaccine and CTR group n=6, with 4 or 5 doses of vaccine plus 8 weeks of rest. Upon reaching the necessary age they were castrated, 2 testicle samples were taken; the first for inclusion in paraffin, for immunohistochemistry and determination of RA and PCNA and the second to be included in EPON and perform morphological measurements and determine maturation index and histopathological index. The conventional treatment group had differences against the control group in only a few measurements, while the other two groups were different in all measurements made. Because in the groups with more doses the vaccine was applied at critical moments of testicular development, severe alterations were observed more evident than in the group with conventional treatment which did have the opportunity to have the first stage, so its alterations are less severe than in the other two groups. We conclude that the application of 4 or more doses that coincide with critical stages of testicular development can cause probably irreversible damage to the miniature pig testicle.

Key Words

Immunocastration, Immunohistochemistry, PCNA, Minipig, Testicular Development, Maturation Index.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	IMPORTANCIA DEL CERDO	1
1.1.1.	Historia del cerdo.....	1
1.1.2.	Razas de cerdos.....	1
1.1.3.	El cerdo en la actualidad.....	2
1.2.	CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DEL VERRACO	3
1.2.1.	Testículo	4
1.2.2.	Espermatogénesis.....	5
1.2.3.	Anormalidades	6
1.3.	LA CASTRACIÓN EN EL CERDO	6
1.3.1.	Por qué se castra	6
1.3.2.	El olor sexual.....	7
2.	MARCO TEÓRICO	9
2.1.	TIPOS DE CASTRACIÓN EN EL CERDO.....	9
2.1.1.	Castración quirúrgica.....	9
2.1.2.	Inmunocastración	9
2.1.3.	Efectos de la inmunocastración en el cerdo	10
2.1.4.	Actualidades acerca de inmunocastración.....	11
3.	JUSTIFICACIÓN	13
4.	HIPÓTESIS	14
5.	OBJETIVOS	15
5.1.	OBJETIVO GENERAL.....	15
5.1.1.	Objetivos específicos.....	15
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1.	ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	16
6.1.1.	Grupo Control	17
6.1.2.	Grupo con Tratamiento Convencional (TC)	17
6.1.3.	Grupo Sin Tiempo de Retiro (STR)	18
6.1.4.	Grupo Con Tiempo de Retiro (CTR)	18
6.2.	MÉTODO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	18
6.3.	ANÁLISIS MORFOLÓGICO	19

6.4.	DETERMINACIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y RECEPTORES A ANDRÓGENOS.....	20
6.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
7.	RESULTADOS	23
7.1.	POR TRATAMIENTO	23
7.1.1.	Grupo control	23
7.1.2.	Grupo TC.....	23
7.1.3.	Grupo STR	24
7.1.4.	Grupo CTR	25
7.2.	POR EDAD.....	29
7.2.1.	20 semanas de edad	29
7.2.2.	24 semanas de edad.....	29
7.2.3.	28 semanas de edad	31
8.	DISCUSIÓN	37
8.1.	GRUPO CONTROL	37
8.2.	GRUPO TC	39
8.3.	GRUPO STR.....	41
8.4.	GRUPO CRT.	43
9.	CONCLUSIONES.....	45
10.	LITERATURA CITADA.....	46
11.	ANEXOS.....	54
11.1.	ANEXO I: Índice de Johnsen.....	54
11.2.	ANEXO II: Índice Histopatológico.....	55
11.3.	ANEXO III: Controles positivos y negativos para inmunohistoquímica.	56
11.4.	ANEXO IV: Artículo Publicado	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Metodología de aplicación de Improvac® y castración.....	17
Figura 2.- Escala de cruces empleada para el análisis semicuantitativo de inmunoreactividad.....	22
Figura 3.- Túbulos seminíferos de cerdo miniatura del grupo control a las 28 semanas de edad	26
Figura 4.- Túbulos seminíferos de cerdo miniatura de 20 semanas de edad	32
Figura 5.- Túbulos seminíferos de cerdo miniatura de 24 semanas de edad	35
Figura 6.- Túbulos seminíferos de cerdo miniatura de 28 semanas de edad	36
Figura 7.- Escala para determinar el índice de daño Histopatológico (IH)	55
Figura 8.- Controles positivos y negativos para validación de inmunohistoquímica para determinación de PCNA	56
Figura 9.- Controles positivos y negativos para validación de inmunohistoquímica para determinación de RA	57

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.- Mediciones de IH, IM y área de los tubos seminíferos de los diferentes tratamientos agrupados por edad	27
Gráfica 2.- Análisis semicuantitativo de la inmunoreactividad en escala de cruces... ..	28
Gráfica 3.- Gráficas que muestran las mediciones de IH, IM y área de las diferentes edades	33
Gráfica 4.- Análisis semicuantitativo de la inmunoreactividad en escala de cruces	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DEL CERDO

1.1.1. Historia del cerdo

Todos los cerdos que conocemos actualmente provienen de la especie *Sus scrofa*, de la cual se comenzó su domesticación en Eurasia hace aproximadamente 9000 años (Larson et al., 2007; Yáñez et al., 2005) Con el paso del tiempo se describieron variantes considerando las características físicas entre los cerdos europeos y asiáticos lo cual fue confirmado gracias a un estudio de diferenciación mitocondrial donde se observó una variación entre sus secuencias de ADN, lo que llevo a que fueran clasificadas como subespecies (Giuffra et al., 2000).

Las razas de cerdo chinas han contribuido en gran medida al desarrollo de las razas con las que contamos en la actualidad. Esto gracias a la exportación de estos animales al Imperio Romano (S. III A.C.) e Inglaterra (S. XVI – XVIII DC) con la finalidad de mejorar las razas europeas debido a características relevantes con las que cuentan como su cantidad de grasa o la alta tasa de prolificidad (Yáñez et al., 2005).

1.1.2. Razas de cerdos

Durante muchos años las razas de cerdos estuvieron confinados a secciones geográficas específicas lo que les confirió una serie de cualidades propias de cada región. Anteriormente la característica más buscada en estos animales era la manteca que producían, sin embargo, en la actualidad se busca una producción más magra con un alto grado de calidad en la carne (Abraham, 2020).

Esta búsqueda por la calidad en la producción porcina ha ocasionado que se realice una selección genética muy estricta con la finalidad de satisfacer las demandas del mercado, esto ha provocado la creación de más de 355 razas de cerdos en todo el

mundo. El tipo y la conformación de los cerdos son factores muy importantes para determinar el valor de la canal, debido a esto, se está en la búsqueda constante de la mejora de estas características. (Abraham, 2020; Benítez Ortiz & Sánchez, 2004).

En la actualidad, difícilmente se trabaja con razas puras, es más común emplear animales cruzados con la finalidad de aprovechar el vigor híbrido de esta mezcla. Gracias a la selección de razas puras y su cruzamiento de manera selectiva se ha llevado a la clasificación de los cerdos de acuerdo con sus características productivas en 3 esquemas de selección y cruzamiento como son: razas exclusivamente paternas, razas fundamentalmente paternas y razas fundamentalmente maternales (Sañudo Astiz, 2011).

Al mismo tiempo también existen razas de cerdos que no son empleados con la finalidad principal de producción de carne. Este el caso de las razas de cerdos miniatura, las cuales cumplen una función principal como animales de compañía y de laboratorio. Estas tienen su origen en el sudeste asiático y pacífico (Sañudo Astiz, 2011). Los pesos promedios de estas razas pueden oscilar entre los 30 y 60 kg, sin embargo, existen variedades de menor peso y tamaño como son los minipigs, vietnamitas, Göttigen, Yucatán minipigs, y microminipigs los cuales pueden tener un peso en edad adulta menor a los 30 kg (Dang-Nguyen et al., 2010; Kangawa, Otake, Enya, Yoshida, Kangawa, et al., 2016; Svendsen, 2006)

1.1.3. El cerdo en la actualidad

Actualmente la carne de cerdo tiene una gran importancia en la economía a nivel mundial, de acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2021), hoy en día la carne de cerdo es la carne roja de mayor consumo en el planeta, su producción está distribuida internacionalmente (excepto en aquellas regiones que mantienen ciertas reservas culturales sobre el consumo de carne de cerdo) y su industria ha alcanzado un alto nivel de insumos y un elevado rendimiento gracias a la tecnología.

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2017) señala que, debido a la rápida expansión de la demanda mundial de carne roja, se proyecta un aumento del 10% en la producción mundial de carne de cerdo para 2026, la cual seguirá representando un factor importante para satisfacer la necesidad de proteína de origen animal a nivel mundial.

Por otro lado, los cerdos también han sido empleados durante muchos años como animales de laboratorio, principalmente los de raza miniatura, en diversas áreas de investigación entre las que tenemos, toxicología (Stricker-Krongrad et al., 2016), farmacología (Ren et al., 2009), virología (Pavio et al., 2017), genética (Cui et al., 2015), neurociencias (Langhout et al., 2018), optometría (Lobue et al., 2017), xenotrasplantes (Hampton, 2017), infectología (Fiebig et al., 2017) y reproducción donde se han hecho investigaciones en el área de fertilidad (Arato et al., 2018) maduración testicular (Ma et al., 2016). Debido que se ha reportado casos de cáncer testicular en cerdos (Weaver et al., 1999) también podría ser considerado un modelo animal adecuado para el estudio de esta patología.

Esta tendencia al alta, tanto en el área de producción de carne como en la investigación, nos hacen contemplar la proyección del cerdo como una especie que necesita seguir siendo investigada.

1.2. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DEL VERRACO

El semental porcino se caracteriza por ser un animal territorial que en ocasiones puede volverse agresivo debido a la libido tan alta que llega a tener en condiciones de salud adecuadas, siempre dispuesto a montar a la cerda, lo que en ocasiones puede dificultar su manejo (Córdova-Izquierdo et al., 2007; Trujillo Ortega et al., 2017).

El cerdo es una especie no estacional, esto implica que en los machos la producción espermática se mantiene constante, solo teniendo variaciones en la calidad seminal

si el individuo se encuentra en estrés calórico en ciertas épocas del año, sin embargo, esto no afecta su capacidad reproductiva (Calatayud-Márquez & Quintero-Moreno, 2021). Los niveles máximos en la producción espermática se alcanzan una vez que el individuo llega a la madurez sexual, que en el caso de las razas de producción cárnica es alrededor de los 12 a 14 meses mientras que en las miniaturas se presenta entre los 7 y 8 meses (Contreras-Ortiz et al., 2021).

1.2.1. Testículo

El testículo es un órgano par de tipo parenquimatoso que se forma durante la vida fetal del cerdo en la cresta gonadal, teniendo como sitio definitivo el saco escrotal (Trujillo Ortega et al., 2017). Se conforma de túbulos huecos denominados túbulos seminíferos, en el epitelio de estos túbulos se lleva a cabo la espermatogénesis. Esto gracias a la colaboración de las células de Sertoli, quienes son las encargadas de proveer las condiciones necesarias para que se lleve a cabo la formación de los espermatozoides. En el espacio extratubular se encuentran las células de Leydig que tienen como función principal la producción de andrógenos, las cuales son hormonas masculinas encargadas de promover las características sexuales en el animal.

Las células de Leydig tienen tres etapas de proliferación: la primera se presenta durante la vida fetal, aproximante al día 30 al 60 de gestación, la segunda, entre la semana 3 y 5 semana de vida, durante la mini pubertad y la tercera se produce al llegar a la pubertad (França et al., 2000).

Para que el testículo realice de manera adecuada sus funciones es necesario el estímulo dado por las gonadotropinas provenientes de la adenohipófisis, estas son la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH), las cuales tienen acción directa sobre las células de Sertoli y Leydig respectivamente. A su vez para que la adenohipófisis libere las gonadotropinas debe ser estimulada por un decapeptido proveniente del hipotálamo llamado Hormona liberadora de

gonadotropinas (GnRH), a este eje de comunicación se le conoce como eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo (H-H-T) (Stocco & McPhaul, 2006).

1.2.2. Espermatogénesis

La función principal del testículo es la producción de espermatozoides, para ello es necesario que dentro del epitelio seminífero se realice una serie de eventos ordenados llamada espermatogénesis. Esta comienza con la espermatogonia A, la cual es la célula germinal masculina, de ella se derivan, por medio de mitosis y meiosis sucesivas, los diferentes tipos de espermatogonias y los espermatocitos. Al culminar la meiosis II se forman las espermatidas redondas y posteriormente tienen varios cambios en su morfología hasta convertirse en espermatida elongada (Cheng & Mruk, 2010; Stocco & McPhaul, 2006). Para este punto ya están listas para salir de los túbulos seminíferos, a este se conoce como espermiación, a partir de este punto los gametos son llamados espermatozoides.

El que la espermatogénesis se lleve a cabo de manera adecuada depende de andrógenos y su duración varía dependiendo de la raza del verraco. En las razas de producción, el proceso dura 36 días (Trujillo Ortega et al., 2017) mientras que en las razas miniatura, tiene una duración de 40.9 días (Kangawa, Otake, Enya, Yoshida, Kangawa, et al., 2016).

La espermatogénesis es un proceso continuo; esto ocasiona que en un mismo momento puedan encontrarse diferentes asociaciones celulares dentro de los túbulos seminíferos, lo que da lugar a las etapas del ciclo del epitelio seminífero (SEC). La cantidad de etapas varía por especie y en el caso del cerdo también depende de la raza. En los cerdos de producción se aprecian 8, mientras que en los cerdos miniatura se puede observar hasta 11 etapas (Kangawa, Otake, Enya, Yoshida, Kangawa, et al., 2016; Trujillo Ortega et al., 2017). Estas asociaciones celulares se pueden identificar con base en las características del núcleo de las espermatidas o de acuerdo con el grado de maduración del acrosoma. Una espermatogénesis completa tiene una duración de 4.5 ciclos del epitelio seminífero;

en cerdos cada ciclo dura aproximadamente de 8.6 a 9 días para completar en su totalidad una espermatogénesis (França et al., 2005).

1.2.3. Anormalidades

La integridad del epitelio seminífero es de suma importancia para la producción adecuada de gametos, sin embargo, en ocasiones pueden encontrarse alteraciones en ciertos túbulos seminíferos sin que esto evite la reproducción del individuo, como es el caso de las razas de cerdos miniatura, entre las que tenemos a los vietnamitas, minipigs, Göttingen minipigs o Yucatán minipigs. En estos se han reportado como característica intrínseca de estas razas la presencia de anormalidades en el túbulo seminífero como pueden ser: descamación excesiva, vacuolización, plegamiento de la lámina basal, sincitios y presencia de fagosomas; en consecuencia, esto da como resultado alteraciones en la espermatogénesis. A pesar de ello estas razas tienen una muy buena producción espermática, con lo que consiguen reproducirse de manera adecuada. (Contreras-Ortiz et al., 2021; Kangawa, Otake, Enya, Yoshida, & Shibata, 2016).

1.3. LA CASTRACIÓN EN EL CERDO

1.3.1. Por qué se castra

La castración quirúrgica en los cerdos es una práctica habitual en las granjas porcinas a nivel mundial, con la finalidad de controlar el olor sexual y evitar la agresividad en los machos. Esta se realiza durante la primera semana de vida del lechón y no se emplea ningún tipo de analgesia o anestesia al momento de realizar el procedimiento. De las ventajas que conlleva realizar el procedimiento de esta manera, es que a esta edad los testículos son mucho más fáciles de remover, existe poco riesgo de hemorragia y se realiza de manera fácil y rápida por el personal de granja. Esto contribuye al control de la conducta, ya que los machos enteros pueden tornarse muy agresivos conforme se acercan a la pubertad, así como la eliminación

de olor sexual en la carne del cerdo (James Squires et al., 2020; Trujillo Ortega et al., 2017).

En cambio, se presentan desventajas que son bien conocidas desde mucho tiempo atrás al realizar la castración quirúrgica, tal es el caso de la reducción de la ganancia de peso por parte de los animales castrados comparado con los cerdos enteros a pesar de estar en igualdad de circunstancias como alimentación y manejo. Además, existen riesgos de aparición de infecciones y hernias, lo que en casos graves puede desencadenar la muerte del lechón (Prunier et al., 2006)

Del mismo modo, existe una gran crítica a esta técnica ya que no se llevan a cabo las medidas necesarias para mantener el bienestar animal. Esto debido a que no se provee una anestesia previa al procedimiento, lo que ocasiona el desagrado de muchos grupos de bienestar animal, lo que obliga a los productores a buscar alternativas para este método de castración (Poklukar et al., 2021a; Škrlep et al., 2020).

1.3.2. El olor sexual

En comparación con los machos castrados, los machos enteros aprovechan el alimento de manera más eficiente, lo que los convierte en candidatos más rentables en una explotación porcina (Claus et al., 2008). Sin embargo, el olor y sabor aportados por “el olor sexual” a la carne en el cerdo no castrado limitan su explotación (Einarsson et al., 2011; Robaire et al., 2006). Esta característica consiste en la presencia de un olor similar al de las heces u orina en la carne; esto se debe a la deposición de androstenona, escatol e indol en el tejido graso del verraco (Duarte et al., 2021)

La androstenona es un esteroide derivado de la testosterona (T) producido por las células de Leydig, la cual a su vez es regulada por la acción de la LH, y su producción depende del grado de madurez sexual que tenga el individuo (Ana et al., 2021; Robic et al., 2008).

Por otro lado, durante el metabolismo de los aminoácidos en el intestino del varraco, el triptófano se descompone debido a la acción enzimática de diferentes bacterias en el colon del animal, culminando en la formación de 3-metilindol o mejor conocido como escatol (Robic et al., 2008). De este una parte es expulsada en las heces y la otra es reabsorbida por el epitelio intestinal. Cuando esto último sucede debe pasar por el hígado donde las enzimas hepáticas lo degradan para que sea eliminado por la orina; sin embargo, cuando existe la presencia de androstenona dichas enzimas no son capaces de degradar el escatol y en vez de ser eliminado se acumula en la grasa del animal (Deslandes et al., 2001; Oskam et al., 2010; Wicks et al., 2013a).

Si bien hay estudios que demuestran que estrategias como la formulación de dietas especiales (como evitar la ingesta excesiva de triptófano) (Deslandes et al., 2001), la selección genética con base en marcadores específicos (Robic et al., 2008) y el sexado de semen son opciones potenciales para disminuir las concentraciones de escatol y androstenona en grasa. La manera más habitual, económica y efectiva sigue siendo la castración de los machos destinados a la engorda Claus et al., 2008; Wicks et al., 2013).

Es por esto que la exigencia del consumidor por tener una carne libre de olor y sabor desagradable, la presión social ejercida para el mantenimiento del bienestar animal y el interés económico por mantener la relación magro-grasa que tienen los animales no castrados, se ha encaminado al desarrollo de nuevas técnicas que permitan tener una mejor producción evitando lo más posible el dolor y sufrimiento a los animales. Debido a esto han surgido diferentes opciones buscando cumplir con dichos requisitos, una de ellas es la castración inmunológica o inmunocastración la cual es una opción viable para tales fines (Lonardi et al., 2015).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. TIPOS DE CASTRACIÓN EN EL CERDO

2.1.1. Castración quirúrgica

La castración quirúrgica es la técnica más realizada en las producciones porcinas debido a las ventajas que se mencionaron con anterioridad. Consiste en realizar una incisión con un bisturí en el escroto y en las tunicas que envuelven a alguno de los testículos, posteriormente este se expone en su totalidad, se sujeta y con un jalón debe ser retirado de una sola intención procurando haber extirpado toda la gónada junto con el epidídimo y parte del paquete testicular. Habiendo hecho esto, se procede a realizar lo mismo con el testículo restante. Una vez removidos ambos testículos se aplica un cicatrizante en la herida del escroto y se devuelve el lechón a su camada. Debido a que en este proceso no se emplea ningún tipo de sedación o anestesia se recomienda que se realice en los primeros días de vida del lechón (Quiles, 2009).

2.1.2. Inmunocastración

La inmunocastración consiste en vacunar a los cerdos enteros contra alguna de las hormonas sexuales para evitar la manifestación de ciertas características sexuales secundarias (Poklukar et al., 2021b). Los productos con los que actualmente se cuenta en el mercado son los siguientes:

2.1.2.1. *Improvac®*

El *Improvac®* (Zoetis EE. UU.) es la primera vacuna para inmunocastración que surgió en el mercado. Este producto resulta ser un compuesto totalmente libre de acción farmacológica u hormonal. Se compone de un péptido sintético análogo de la GnRH conjugado con toxoide de difteria y un adyuvante acuoso. El tratamiento recomendado por el fabricante del producto consiste en 2 aplicaciones de 2 ml cada

una, por vía subcutánea con intervalos de al menos 4 semanas de tal manera que la segunda dosis se aplique de 4 a 10 semanas antes del sacrificio (Zoetis, 2021).

Cuando el producto es administrado en el verraco se producen elevadas concentraciones de anticuerpos contra la GnRH endógena. Esto ocasiona la inhibición del eje H-H-T debido a que la adenohipófisis no obtiene el estímulo necesario para la producción de LH y FSH, gonadotropinas encargadas de estimular a las células de Leydig y Sertoli respectivamente (Einarsson et al., 2011; Zoetis, 2021).

2.1.2.2. *Valora®*

La segunda vacuna para inmunocastración en surgir al mercado fue Valora® (CEVA, EE. UU) la cual es una vacuna preparada a partir de péptidos sintéticos de la LH ligados a péptidos propios con una fórmula farmacéutica de emulsión agua en aceite. El tratamiento consiste en 2 aplicaciones de 1 ml cada una, por vía subcutánea. Se debe administrar la primera dosis a partir de la tercera semana de edad y la segunda dosis entre la tercera y octava semanas antes del sacrificio. Se debe considerar un intervalo de 4 semanas entre la primera y segunda aplicación. (CEVA, 2021). En este caso la administración de esta vacuna si permite la comunicación adecuada entre el hipotálamo y la adenohipófisis ocasionando la liberación de las hormonas gonadotrópicas, sin embargo, se forman anticuerpo contra la LH endógena por lo que las células de Leydig no tienen el estímulo adecuado para la producción de andrógenos (Einarsson et al., 2011).

2.1.3. Efectos de la inmunocastración en el cerdo

En el caso de ambas vacunas se obtiene una bajada considerable en la producción de T (Einarsson et al., 2011) y con ello la reducción en la producción y acumulación de hormonas esteroideas, incluyendo a la androstenona, lo cual inhibe le presencia del olor sexual, (Brunius et al., 2011; di Pasquale et al., 2019).

En cualquiera de los casos la inmunocastración se vuelve una opción viable para mantener el bienestar animal ya que evita el dolor agudo y reduce el estrés en los animales, además de que simplifica el manejo ya que la aplicación de la vacuna es de forma subcutánea. (di Pasquale et al., 2019).

Otra ventaja que tiene la inmunocastración es que los animales castrados por esta vía tienen una mejor conversión alimenticia con mayor porcentaje de carne magra en la canal que los castrados quirúrgicamente (di Pasquale et al., 2019; Lonardi et al., 2015).

En el caso de los órganos sexuales, se puede observar una reducción significativa en el tamaño y peso de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias entre un 70% aproximadamente (Brunius et al., 2011). En cuanto a la morfología testicular se puede observar una atrofia con reducción en el citoplasma de las células de Sertoli y Leydig y en los túbulos seminíferos se puede apreciar de escasa a nula actividad espermatogénica (Wicks et al., 2013a).

Más aún, al suspender el fármaco, con el tiempo el funcionamiento y tamaño testicular regresan (Einarsson et al., 2011; Oskam et al., 2010).

2.1.4. Actualidades acerca de inmunocastración

Se ha reportado que la aplicación de Improvac® siguiendo el protocolo establecido por la marca, afecta el desarrollo y funcionalidad de los órganos reproductivos de tal manera que una vacunación más temprana provoca una alteración de mayor severidad en la estructura y funcionalidad testicular del macho inmunocastrado (Brunius et al., 2011) Sin embargo, se ha demostrado que después de 9 semanas de aplicada la segunda dosis, ocurre un efecto compensatorio por parte del testículo, ocasionando una regresión a valores normales, en cuanto a tamaño, área e histopatología de los túbulos seminíferos y establecimiento de la espermatogénesis (Castellanos, 2015; Claus et al., 2008). Esto no se presenta en el epidídimo, en donde se demostró que el efecto de una vacunación temprana

provoca que a las 9 semanas de aplicada la segunda dosis aún no se alcanza una maduración completa de este órgano (Contreras Ortiz, 2016). Sin embargo, no se sabe si el efecto de esta vacuna pueda llegar a ser más prolongado con un mayor número de aplicaciones sumadas al efecto de una vacunación temprana que abarquen las dos etapas más importantes en el desarrollo de los órganos sexuales. La primera es la regeneración de las células de Leydig que se presenta a las 3 semanas de edad; y la segunda es la pubertad, que tiene lugar entre las semanas de vida 16 y 20 en los cerdos de producción cárnica y entre las 12 y 14 semanas en los cerdos miniatura (França et al., 2005; Kangawa, Otake, Enya, Yoshida, Kangawa, et al., 2016)

Con todo esto nos será más fácil conocer el mecanismo de desarrollo testicular, permitiéndonos comprender de mejor manera la forma en la que se presenta la maduración testicular. Esto gracias a la medición de los factores morfométricos, así como la presencia de receptores sensibles a receptores a andrógenos (RA) y al factor de proliferación celular (PCNA), durante tratamientos a corto y largo plazo.

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la gran importancia del testículo para la reproducción, existe poca información acerca del efecto supresor de andrógenos de la vacuna contra GnRH aplicada en momentos críticos del desarrollo testicular en protocolos de corta y larga duración, sobre el crecimiento y desarrollo testicular y la dinámica de presencia/ausencia de receptores en células sensibles a andrógenos (RA) y del factor de proliferación celular (PCNA), en razas de cerdos miniatura. Esto contribuirá al conocimiento de los mecanismos de acción de este método de inmunocastración y conocer los puntos críticos de acción en el desarrollo testicular del cerdo miniatura.

4. HIPÓTESIS

La aplicación de una vacuna a largo plazo contra GnRH, que coincida con periodos de establecimiento y diferenciación de poblaciones celulares testiculares, tendrá un efecto supresor significativo sobre el crecimiento, desarrollo testicular y la dinámica de presencia/ausencia de receptores de andrógenos y del factor de proliferación celular; comparado con un esquema de vacunación a corto plazo en razas de cerdo miniatura.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto supresor de andrógenos de la vacuna contra GnRH (Improvac®) aplicada en momentos críticos del desarrollo testicular en protocolos de corta y larga duración sobre la dinámica de desarrollo del testículo de cerdos miniatura

5.1.1. Objetivos específicos

Analizar en cerdos miniatura, el efecto supresor de andrógenos de la vacuna contra GnRH (Improvac®) aplicada en momentos críticos del desarrollo testicular en protocolos de corta y larga duración sobre:

- La morfología del epitelio seminífero como un indicador de la madurez y de daño testicular.
- El daño histológico ocasionado como un indicador de la integridad del epitelio seminífero.
- La inmunoreactividad de RA como un indicador en el índice de T en el testículo de animales con inmunocastración temprana y a largo plazo.
- La inmunoreactividad a PCNA como un indicador del índice de proliferación celular.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este estudio se emplearon 33 cerdos miniatura divididos en cuatro grupos experimentales los cuales se alojaron en condiciones de granja. El manejo se apegó a los principios éticos y de regulación recomendados por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO 1999, así como a las especificaciones del Subcomité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (SICUAE), de la FMVZ de la UNAM con número de autorización DC-2018/2-3.

El alojamiento, mantenimiento, crecimiento y tratamiento de los animales se realizó en instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y el Centro de Enseñanza Investigación y extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Universidad Nacional Autónoma de México, durante los meses de marzo a octubre de 2018 debido a que en estos meses la diferencia en el número de horas de luz es mínima. Los animales se seleccionaron al nacimiento y se mantuvieron en lactancia con la madre durante 21 días. Después se destetaron y se mantuvieron alojados en corrales dentro de edificios cerrados bajo ciclos naturales de luz/oscuridad de $12 \text{ h} \pm 1,25 \text{ h}$, una temperatura ambiente de 10 a 16°C y una humedad relativa que oscilaba entre 64 % y 84 %. Se les dio acceso *ad libitum* al agua y se les dio alimento dos veces al día con una dieta balanceada, la cual es elaborada dentro del centro de producción.

Los animales fueron agrupados de la siguiente manera:

		EDAD EN SEMANAS							
		0	3	8	12	16	20	24	28
TRATAMIENTOS	CONTROL n=9						n=3	n=3	n=3
	TC n=9				n=9	n=9	n=3 n=6	n=3 n=3	n=3
	STR n=9		n=9	n=9	n=9	n=9	n=6 n=3	n=3 n=3	n=3
	CTR n=6		n=6	n=6	n=6	n=6	n=3 n=3	n=3 n=3	n=3
	aplicación de vacuna								
castración									
periodo de descanso									

Figura 1.- Metodología de aplicación de Improvac® y castración: TC= Tratamiento convencional, STR= Sin Tiempo de Retiro, CTR = Con Tiempo de Retiro.

6.1.1. Grupo Control

Se seleccionaron 9 lechones de raza miniatura y se mantuvieron sin ser castrados. A las 20 semanas se seleccionaron al azar tres de estos para ser castrados quirúrgicamente manteniendo los restantes en las mismas condiciones, a las 24 semanas se realizó la misma selección y castración a 3 cerdos, se mantuvieron los restantes y a las 28 se castraron los últimos 3 animales.

6.1.2. Grupo con Tratamiento Convencional (TC)

Se seleccionaron 9 animales y se mantuvieron sin ser castrados quirúrgicamente, con esto animales se realizó la aplicación de Improvac® de acuerdo con la manera convencional que la marca determina que debe ser empleado el producto.

A todos los animales se les aplicaron 2 dosis, la primera a las 12 y la segunda a las 16 semanas de vida, cada una de 2 ml de manera subcutánea en el pliegue detrás de la oreja. Una vez realizada la segunda aplicación cuatro semanas después (20

semanas de vida) se seleccionaron 3 animales para ser castrados de manera quirúrgica, dejando los animales restantes. A las 24 semanas se seleccionaron nuevamente 3 animales para practicarles la orquiectomía. Y finalmente a las 28 semanas se castraron quirúrgicamente los últimos 3 animales.

6.1.3. Grupo Sin Tiempo de Retiro (STR)

Se seleccionaron 9 animales y se mantuvieron sin ser castrados quirúrgicamente. A todos los animales se les aplicaron 4 dosis de Improvac® a las 3, 8, 12 y 16 semanas de vida; a las 20 semanas se seleccionaron 3 para ser castrados quirúrgicamente a los 6 restantes se les aplicó una 5° dosis de medicamento. A las 24 semanas se seleccionaron otros 3 animales para ser castrados quirúrgicamente y a los 3 animales restantes se les aplicó una 6° dosis de Improvac® y finalmente se castraron quirúrgicamente a las 28 semanas.

6.1.4. Grupo Con Tiempo de Retiro (CTR)

Se seleccionaron 6 animales y se mantuvieron sin ser castrados quirúrgicamente. Se seleccionaron 3 cerdos a los que se les aplicaron una dosis de Improvac® a las 3, 8, 12 y 16 semanas de vida, en total 4 dosis. Se les dejaron 8 semanas de tiempo de retiro de la vacuna y se castraron quirúrgicamente a las 24 semanas de edad. Los 3 animales restantes se les aplicaron dosis de vacuna a las 3, 8, 12, 16 y 20 semanas de edad, en total 5 dosis, se les dejaron 8 semanas de retiro del medicamento y se castraron quirúrgicamente a las 28 semanas.

6.2. MÉTODO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la realización de la castración quirúrgica los animales se premedicaron con un tranquilizante (Azaperona 2.2mg/kg IM, CHINOIN) en la zona de tabla del cuello, el cual se dejó actuar por un lapso de 20 minutos. Posteriormente se procedió al lavado y rasurado de la zona lumbosacra para una posterior desinfección con solución yodada. Se procedió a la administración epidural de epinefrina al 2% (Pisa)

a razón de 3mg/kg y se dejó actuar por dos minutos, en cuanto el animal se encontraba insensibilizado se procedió a la castración. Una vez terminada la cirugía se administró antibiótico y analgésico de manera intramuscular, igualmente en la tabla del cuello durante 3 días (Dexabiopen® 1ml/10 kg).

Los testículos obtenidos fueron cortados para obtener muestras de 0.5cm³ aproximadamente que fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y de 0.3cm³ que fueron fijados en solución Karnovsky. (M.J., 1985).

6.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Las muestras fijadas en Karnovsky, se mantuvieron en este fijador durante 24 horas. Posteriormente se lavaron las muestras con solución buffer de cacodilatos (0.1 M). Para el siguiente paso se fijaron en solución de OsO₄ al 1 % (Merck, Darmstadt, Alemania) y se procesaron para su inclusión en Epon 812. Se realizaron cortes semifinos de 1 µm de ancho se hicieron con un ultramicrotomo Leica UCT (Leica, Viena, Austria), se tiñeron por flotación con azul de toluidina al 0,5% y luego se colocaron en laminillas para observación microscópica.

Los túbulos seminíferos se analizaron histológicamente con un microscopio óptico (BX51, Olympus Corp., Tokio, Japón) y el sistema de análisis de imágenes Image-Pro-Plus 5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EE. UU.). Todos los exámenes histológicos fueron realizados por un solo observador. Se seleccionaron subjetivamente diez túbulos seminíferos con secciones transversales y se observaron en un objetivo de 20x. Las áreas del epitelio seminífero se estimaron deduciendo el área del lumen del área externa de los túbulos seminíferos.

El grado de madurez del epitelio seminífero se determinó mediante el índice de maduración (IM) también llamado índice de Johnsen (Johnsen, 1970) (ANEXO I: Índice de Johnsen.), este es un sistema de puntuación para cuantificar la espermatogénesis según el grado de desarrollo de las células que se encuentran en los túbulos seminíferos. Una puntuación de 10 indica la máxima actividad de

espermatogénesis, mientras que una puntuación de 1 indica ausencia total de células. El índice histopatológico (IH) se determinó mediante la suma de los puntajes por sección de túbulo seminífero, un puntaje de 26 se consideró el puntaje más alto. Se consideraron plegamiento de la lámina basal, descamación celular, vacuolización epitelial, sincitio celular, picnosis; túbulos sin espermátidas, espermaticitos, espermatozonias o ausencia de todo tipo de células (Vigueras-Villaseñor et al., 2009) (ANEXO II: Índice Histopatológico.).

6.4. DETERMINACIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y RECEPTORES A ANDRÓGENOS

Los receptores a andrógenos y la proliferación celular se determinaron por inmunohistoquímica y se valoró mediante microscopía óptica la expresión del antígeno correspondiente.

Para ello las muestras testiculares fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y se procesaron para su inclusión parafina en un histocinético. Se obtuvieron cortes de 4 µm de espesor con un micrótopo (Leica RM 2155; Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania) y se montaron en portaobjetos cargados con geletina Fluka biochemika 70151 con sulfato doble de cromo y potasio al 0.5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Luego, se desparafinaron en una estufa a 60°C durante 30 minutos y se rehidrataron en una serie gradual de etanol, después los cortes se colocan en solución de citrato de sodio 0,01 M (Bio SB Inc., Santa Bárbara, CA, EE. UU.) en olla a presión para microondas a una temperatura de 100°C durante 5 min, se deja enfriar para poder retirar los portaobjetos, realizar un lavado con agua destilada y se dejaron secar; las secciones se delimitaron con un lápiz Dako (Dako, Glostrup, Dinamarca). Posteriormente se utilizó albúmina de suero bovino (BSA, GE Healthcare, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, Reino Unido) durante 2 h para el bloqueo de receptores inespecíficos. Luego, se incubaron durante 24 h con anticuerpo monoclonal primario hecho en ratón contra; PCNA ((PC10) sc-56, Lote #D1811 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.))

y para AR con anticuerpo primario policlonal hecho en conejo, [(N-20) sc-816, Lote #J020 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.)]. Ambos se diluyeron en una proporción de 1:50 y se incubaron en cámara húmeda durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se incubaron con anticuerpo secundario durante 2 h a temperatura ambiente; para PCNA con IgG anti-ratón biotinilado e IgG anti-conejo biotinilado para RA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.), ambos se diluyeron en una proporción de 1:200. Luego, se incubaron con complejo de avidina-biotina a temperatura ambiente durante 1 h, luego de lo cual las muestras se revelaron con diaminobencidina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.) durante 1 min y se contrastaron con hematoxilina GILL durante 1 min, se realizó un lavado con agua destilada, se dejaron secar las laminillas, se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol y posteriormente xylol, después ser montaron con Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las secciones se analizaron bajo un microscopio óptico (BX51, Olympus Corporation, Tokio, Japón) en un objetivo de 20x (Contreras-Ortiz et al., 2021).

Se realizó un análisis semicuantitativo de la inmunoreactividad dada por PCNA y RA, se seleccionaron diez túbulos seminíferos con secciones transversales seleccionadas al azar y se valoró la cantidad de células inmunoreactivas de manera observacional presentes en cada túbulo. Se le dio una valoración en una escala de 1 a 3 cruces; donde 1 significa una presencia de celulares reactivas evidentemente menor en comparación con las células presentes en el túbulo. El 2 significa una presencia equitativa entre células reactivas y no reactivas y 3 cuando se observa una proporción mayor de células reactivas que de no reactivas (Figura 2) al finalizar las observaciones se calculó el promedio por animal y por etapa.

Todos los exámenes histológicos fueron realizados por un solo observador. Para verificar la validez de la prueba, se seleccionaron marcadores positivos: muestras de intestino para PCNA y muestras de próstata para RA de ratones y cerdos. Las pruebas se realizaron sin anticuerpo primario para evitar falsos positivos con

anticuerpo secundario (ANEXO III: Controles positivos y negativos para inmunohistoquímica.).

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar las diferencias en los índices de IM, IH y áreas de los túbulos seminíferos y su desarrollo durante los tiempos analizados se utilizó un modelo de efectos mixtos (Park et al., 2009) Se planteó la mejor estructura de covarianza y para delimitar la relevancia se realizó una prueba de Tukey ajustada (Kramer, 1956). Previamente se realizó un ensayo homogéneo de varianza tipo Bartlett.

La diferencia se encontró mediante la prueba de Tukey. El análisis de datos para este documento se generó utilizando el software SAS/STAT, versión [9] para Windows. Copyright © [2014] SAS Institute Inc. SAS y todos los demás productos o nombres de servicios de SAS Institute Inc. son marcas registradas o marcas comerciales de SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.

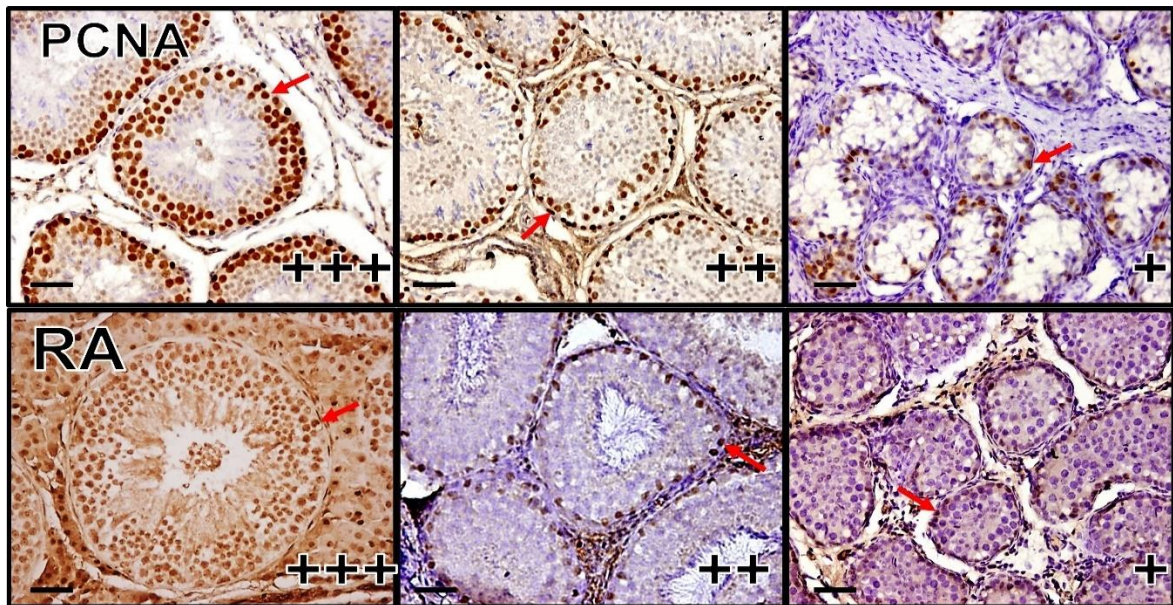


Figura 2.-Escala de cruces empleada para el análisis semicuantitativo de inmunoreactividad: Primera fila: Escala semicuantitativa de Inmunoreactividad para PCNA. Segunda fila: escala de inmunoreactividad para RA. Flecha roja indica positividad. Imagen 20x. Técnica Inmunohistoquímica. Barra de calibración = 50µm.

7. RESULTADOS

7.1. POR TRATAMIENTO

7.1.1. Grupo control

En el grupo control se apreció una espermatogénesis desde espermatogonia hasta espermatidas elongadas, culminando en espermiación en los tres grupos etarios observados (Figura 3A). De igual forma se observaron diferentes alteraciones en los túbulos seminíferos entre los que se encontraron plegamiento de la membrana basal, degeneración, descamación y vacuolización del epitelio, así como sincitios celulares (Figura 3B). Estas alteraciones se presentaron desde las 20 y hasta las 28 semanas de vida y no hubo diferencia significativa en el valor de IH a lo largo del tiempo ($p>0.05$, Gráfica 1A). En cuanto al IM, se observó que entre las 20 y 24 semanas no hubo diferencia ($p>0.05$), sin embargo, al compararlo contra el grupo de 28 semanas este fue superior en 34% al compararlo con los otros dos grupos ($p<0.05$, Gráfica 1B). Para la medición de las áreas, el grupo de las 20 semanas fue más pequeño tanto al compararlo con el grupo de 24 (reducción del 19%) como contra el de 28 semanas (reducción del 24%) ($p<0.05$), por otro lado, entre estos dos últimos grupos no hubo diferencia de tamaño ($p>0.05$, Gráfica 1C).

La semicuantificación de la inmunoreactividad para PCNA se encontró que el valor de los tres grupos fue similar entre ellos, con valores cercanos a las tres cruces (Gráfica 2A); también para la inmunoreactividad dada por RA fueron muy similares con un valor cercano a las 2.5 cruces en los tres casos (Gráfica 2B).

7.1.2. Grupo TC

En este grupo encontramos una espermatogénesis desde completa con espermiación hasta encontrar túbulos seminíferos con espermatogénesis detenida. Además, se encontró una gran cantidad de anomalías muy marcadas durante las tres edades observadas, como plegamiento de la membrana basal,

degeneración, descamación celular y vacuolización del epitelio; así como sincitios celulares y picnosis. No se presentaron diferencias significativas al comparar el grupo de 20 semanas con el de 24 semanas ($p>0.05$, Gráfica 1A) y este último a su vez al comparar con el grupo de 28 semanas ($p>0.05$). Sin embargo, al comparar el grupo de 20 semanas contra el de 28, este último tuvo un valor superior de 23% ($p<0.05$). Cuando se realizó la medición del IM entre el grupo de 20 y 24 semanas no se encontró diferencia entre ellos ($p>0.05$), mientras que el grupo de 28 semanas fue menor en 47% al compararlo con el grupo de 20 semanas y del 30% al compararlo con el de 24 semanas ($p<0.05$, Gráfica 1B). Para la medición de las áreas se observó que el grupo de 20 semanas fue más pequeño en 35% que el grupo de 24 semanas y con reducción del 38% al compararlo con el grupo de 28 semanas ($p<0.05$) mientras que en entre estos dos últimos grupos no hubo diferencia ($p>0.05$, Gráfica 1C).

Para el análisis semicuantitativo de la inmunoreactividad dada por PCNA se encontró entre los grupos de 20 y 28 semanas una medición similar, mientras que el grupo de 24 semanas fue superior (Gráfica 2A). Para el mismo análisis, pero dado por inmunoreactividad a RA, los valores del grupo de 20 semanas se mantuvieron cercanos a 1.5 cruces, mientras que en el caso de los grupos de 24 y 28 semanas se mantuvieron en niveles por debajo de una cruz (Gráfica 2B).

7.1.3. Grupo STR

En las tres edades de este grupo encontramos una espermatogénesis incompleta la cual se observó detenida en espermatogonias y en algunos casos hasta espermatocitos. Otros tubos mostraron túbulos seminíferos con células germinales y núcleos de las células de Sertoli desplazadas hacia el centro del túbulo seminífero; con alteraciones como plegamiento de la membrana basal, descamaciones, degeneración y sincitios celulares, degeneración y vacuolización del epitelio, picnosis, y en ciertos casos ausencia de lumen tubular. Todas estas alteraciones se encontraron de forma pronunciada y muy frecuentes durante las

tres edades estudiadas. No se mostró diferencia a las 20 semanas comparado con el grupo de 24 semanas ($p>0.05$). Sin embargo, estos dos grupos tuvieron un índice superior que el grupo de 28 semanas de 41 y 48% respectivamente ($p<0.05$, Gráfica 1A). En la medición del IM se observó que no hubo una diferencia entre los grupos de 20 y 24 semanas ($p>0.05$), por otro lado, estos dos grupos fueron inferiores en un 49 y 50% que el grupo de 28 semanas ($p<0.05$, Gráfica 1B). En la medición de las áreas pudimos observar que los tres grupos se mantuvieron sin diferencia ($p>0.05$, Gráfica 1C).

Para el análisis semicuantitativo de la inmunoreactividad para PCNA se mantuvieron constantes en valores entre 0.5 y 1 cruz (Gráfica 2A) para el caso de RA se apreció que los grupos de 20 y 28 semanas se mantuvieron con niveles por debajo de una cruz mientras que el grupo de 24 semanas se vio más elevado con niveles cercanos a 1.5 cruces (Gráfica 2B).

7.1.4. Grupo CTR

En este grupo se observó tanto a las 24 como a las 28 semanas de edad que la espermatogénesis se detuvo en la fase de espermatogonias en la mayoría de los túbulos. En algunos casos se apreciaron espermatoцитos escasos y en ciertos túbulos seminíferos se encontraron células germinales y núcleos de células de Sertoli desplazados hacia el centro del túbulo. También se observaron una gran cantidad de anomalías de los túbulos seminíferos como las descritas para el grupo anterior. Esto llevó como resultado un IH elevado durante las dos edades observadas sin encontrar diferencia entre ellas ($p>0.05$, Gráfica 1A). Caso contrario al IM el cual se mantuvo en niveles bajos y sin diferencia para las dos edades ($p>0.05$, Gráfica 1B). Para la medición de las áreas de igual forma no se encontró diferencia entre los dos grupos ($p>0.05$, Gráfica 1C).

Para la semicuantificación de inmunoreactividad dada por PCNA ambos grupos se mantuvieron en mediciones similares de una cruz o menos (Gráfica 2A), esta

similitud también se apreció en la semicuantificación de RA donde estuvieron cercanos a las 0.5 cruces (Gráfica 2B).

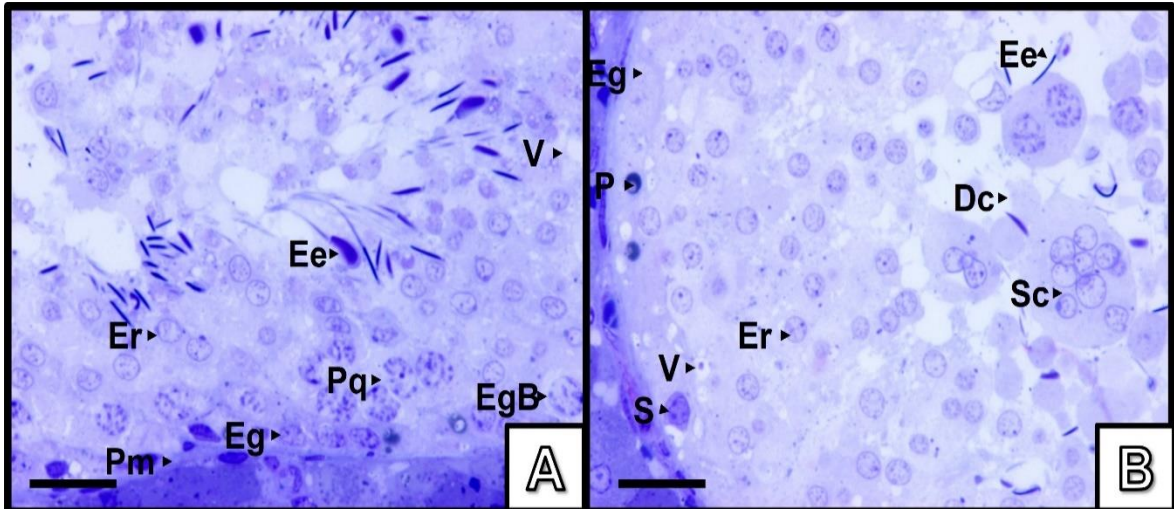
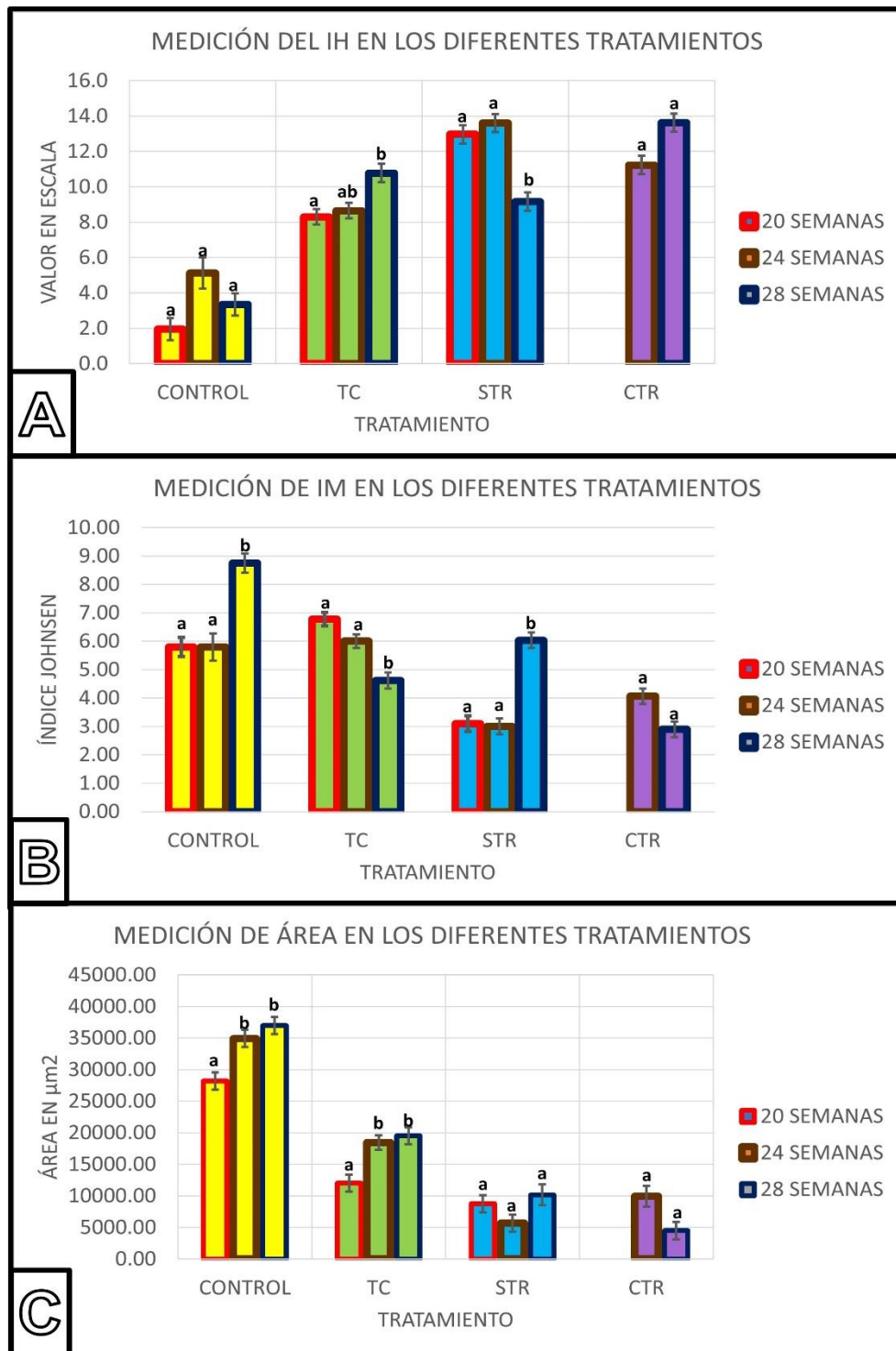
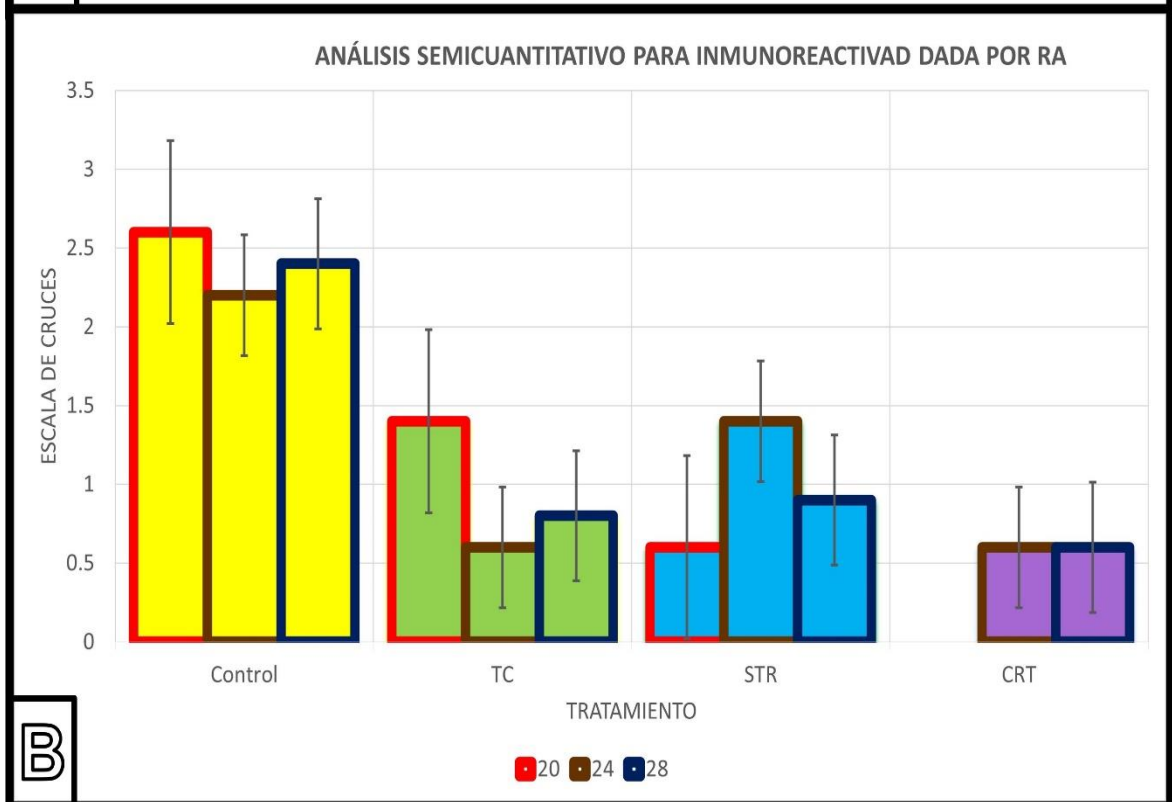
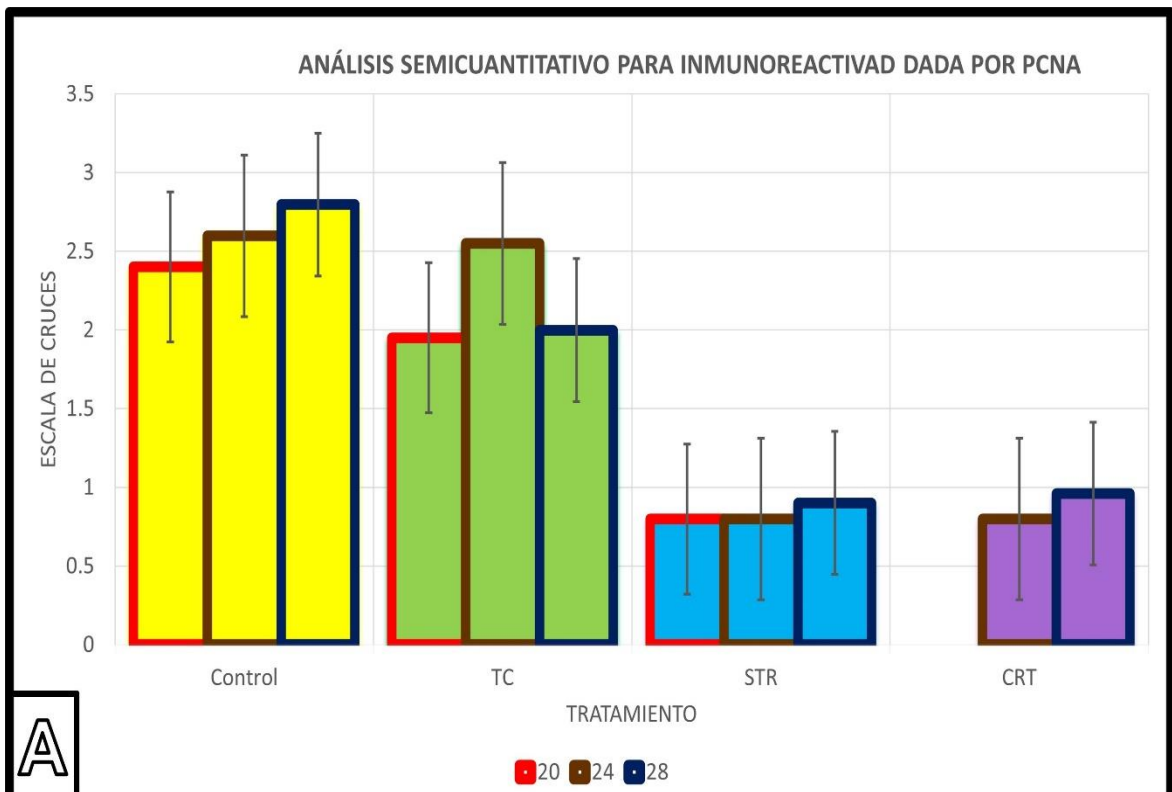


Figura 3.-Túbulos seminíferos de cerdo miniatura del grupo control a las 28 semanas de edad: A.- se aprecian las diferentes etapas de la espermatogénesis, así como algunas alteraciones en el epitelio seminífero; B.- Se aprecian las principales alteraciones encontradas en las diferentes edades y tratamientos. (S) Sertoli; (Eg) Espermatogonia; (EgB) Espermatogonia tipo B; (Pq) Espermatocitos en Paquiteno; (Er) Espermátidas redondas; (Ee) Espermátidas elongadas; (V) Vacuolización; (P) Picnosis; (Dc) Descamación; (Sc) Sincitios celulares; (Pm) Plegamiento de la membrana basal. Imagen 60x. Barra de calibración 50µm. Tinción azul de toluidina.



Gráfica 1.-Mediciones de IH, IM y área de los tubos seminíferos de los diferentes tratamientos agrupados por edad: A.- Se muestra el IH de los cuatro tratamientos; B.- Se muestra el IM de los cuatro tratamientos; C.- Se muestra el área de los cuatro tratamientos analizados agrupados por edad se observa una disminución en todos los grupos especialmente en el STR y CTR. En todos los casos diferentes literales significan diferencia entre las mediciones ($p < 0.05$).



Gráfica 2.- Análisis semicuantitativo de la inmunoreactividad en escala de cruces: Los grupos se encuentran acomodados por tratamientos. A.- inmunoreactividad para PCNA. B.- inmunoreactividad para RA

7.2. POR EDAD

7.2.1. 20 semanas de edad

Al comparar el grupo control con el grupo de TC encontramos las mismas alteraciones histológicas (Figura 3 A y B). Sin embargo, en este último, se encontraron más pronunciadas en la mayoría de los túbulos seminíferos, las cuales fueron superiores al grupo control ($p < 0.05$, Gráfica 3A). Esto ocasionó que el área se observara reducida en un 57% ($p < 0.05$, Gráfica 3C) sin que se provocaran cambios en el índice de maduración del epitelio seminífero ($p > 0.05$, Gráfica 3B). Aunque no se apreció espermiación en todos los túbulos seminíferos, se pudieron encontrar espermátidas en diferentes grados de maduración. En cuanto al grupo STR, presentaron con mayor frecuencia y de forma más pronunciada las alteraciones histológicas antes mencionadas (Figura 4C) con un IH más elevado al compararse tanto al grupo control (con un incremento de 565%) como con el grupo con TC (con un incremento de 56%) ($p < 0.05$, Gráfica 3A). Esto repercutió en el reducido índice de maduración del epitelio seminífero comparado con los otros 2 grupos ($p < 0.05$, Gráfica 3B), (reducción de 47% al compararlo con el Control y de 54% al comparar con el grupo de TC). Aunque si hubo reducción en el área al comparar con el grupo control ($p < 0.05$) no mostro diferencias con el grupo de tratamiento convencional ($p > 0.05$, Gráfica 3C).

En el caso de la semicuantificación de la proliferación celular determinada por la inmunoreactividad a PCNA se observó más intensa en el grupo de tratamiento control, seguida del grupo con tratamiento convencional y al final el grupo sin tiempo de retiro (Gráfica 4A). Este mismo comportamiento se mantuvo para la inmunoreactividad dada por receptor a andrógenos (Gráfica 4B).

7.2.2. 24 semanas de edad.

En el momento de la comparación del grupo control con el grupo TC, las alteraciones histológicas continuaron con el mismo patrón que en la edad anterior.

El grupo TC se apreció con un IH mayor ($p < 0.05$, Gráfica 3A) en un 69% y con disminución del área ($p < 0.05$) del 47% con respecto a grupo control (Gráfica 3C); esto a pesar de que en algunos de los túbulos seminíferos se apreció espermiación lo que llevó a que el IM continuara similar entre ambos grupos ($p > 0.05$, Gráfica 3B).

En el caso de grupo STR se observó un IH superior a los grupos control (266%) y TC (57%) ($p < 0.05$) y una disminución del área comparada tanto con el grupo control (84%) como con el TC (69%). (Gráfica 3A y C). Por otro lado, las marcadas alteraciones en la espermatogénesis provocaron un IM menor que los dos grupos antes mencionados ($p < 0.05$) (del 48% al comparar con el control y del 50% al comparar con TC) (Figura 5C, Gráfica 3B).

Para el grupo CTR, las fuertes alteraciones histológicas observadas en este grupo a esta edad ocasionaron un IH superior tanto al grupo control del 87% como al TC del 30% e inferior al grupo STR con una reducción del 17% ($p < 0.05$, Figura 5D; Gráfica 3A). Las áreas en este grupo fueron menores en comparación con el grupo control (72%) y TC (46%) ($p < 0.05$), mas no así con el grupo STR en donde no hubo diferencia entre sus valores ($p > 0.05$, Gráfica 3C). La espermatogénesis tan alterada que se observó ocasionó un IM menor con una reducción del 30% al comparar con el grupo control y del 32% al comparar con el grupo de TC ($p < 0.05$) y similar al grupo STR ($p > 0.05$, Gráfica 3B)

Para la semi cuantificación de la inmunoreactividad para por PCNA fue similar para los grupos control y TC además de que ambos fueron superiores a los grupos STR y CTR los cuales no fueron diferentes entre sí (Gráfica 4A). En el caso de la inmunoreactividad para RA el grupo control fue superior a todos los grupos, seguido por el grupo STR, el cual fue superior a los grupos TC y CRT los cuales no fueron diferentes entre sí (Gráfica 4B).

7.2.3. 28 semanas de edad

Al hacer la comparativa entre el grupo control y con TC se observó que este último presentó la misma clase de anomalías, sin embargo, de forma más recurrente y pronunciada que el grupo control (Figura 6A y B), lo que repercutió en un IH 222% mayor ($p < 0.05$, Gráfica 3A). En cuanto a la espermatogénesis reportada para el grupo TC, resultó en un IM (47%) y área (47%) inferiores a las del que el grupo control (Gráfica 3B y C).

Para el grupo STR se encontraron anormalidades histológicas similares que en el grupo TC por lo tanto entre sus niveles de IH no hubo diferencia ($p > 0.05$, Figura 6C, Gráfica 3A). caso contrario al grupo control, el cual se observó en un rango inferior (174%) ($p < 0.05$). En el análisis de la espermatogénesis se observaron las mismas líneas celulares que en el grupo TC lo que repercutió en que no hubiera diferencia entre sus valores de IM ($p > 0.05$, Gráfica 3B). sin embargo, cuando se comparó en el grupo control con el grupo STR, este último resultó inferior en un 31% ($p < 0.05$). Para el valor de las áreas se observó que el grupo SRT fue inferior tanto al grupo control (73%) como al grupo TC (48%) ($p < 0.05$, Gráfica 3C).

En el caso del grupo CTR el IH fue mayor que en cualquiera de los otros tres grupos (control 307%, TC 26%, y STR 49%) ($p < 0.05$; Gráfica 3A); sin embargo, presentó las mismas líneas celulares que los grupos TC y SRT por lo que no se encontró diferencia en el IM de estos 3 grupos ($p < 0.05$). mas no así al compararlo con el grupo control en donde este fue superior en un 67% ($p < 0.05$, Figura 6D, Gráfica 3B). En cuanto a la medición de las áreas el grupo CTR no tuvo diferencia al compáralo con grupo SRT ($p > 0.05$) mas no así contra los grupos TC y control, donde resulto inferior a ambos en un 77 y 88% respectivamente ($p < 0.05$, Gráfica 3C).

Para el caso de la semicuantificación de la inmunoreactividad para PCNA el grupo control fue superior a todos los grupos seguido del grupo con TC el cuál fue más alto al compararlo con SRT y CTR los cuales fueron iguales entre sí (Gráfica 4A).

Mientras que la semicuantificación para la inmunoreactividad a RA la de grupo control fue mayor, mientras que los otros 3 grupos se mantuvieron un nivel bajo sin diferencia entre ellos (Gráfica 4B).

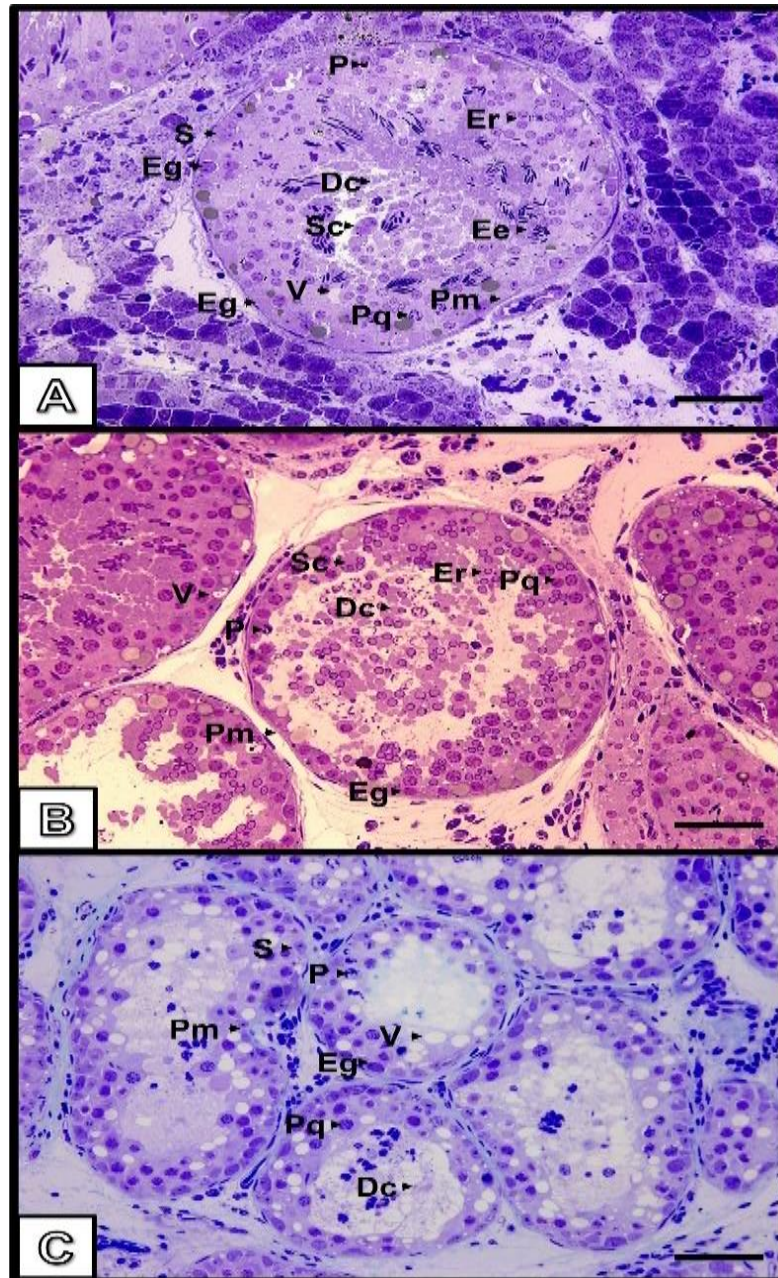
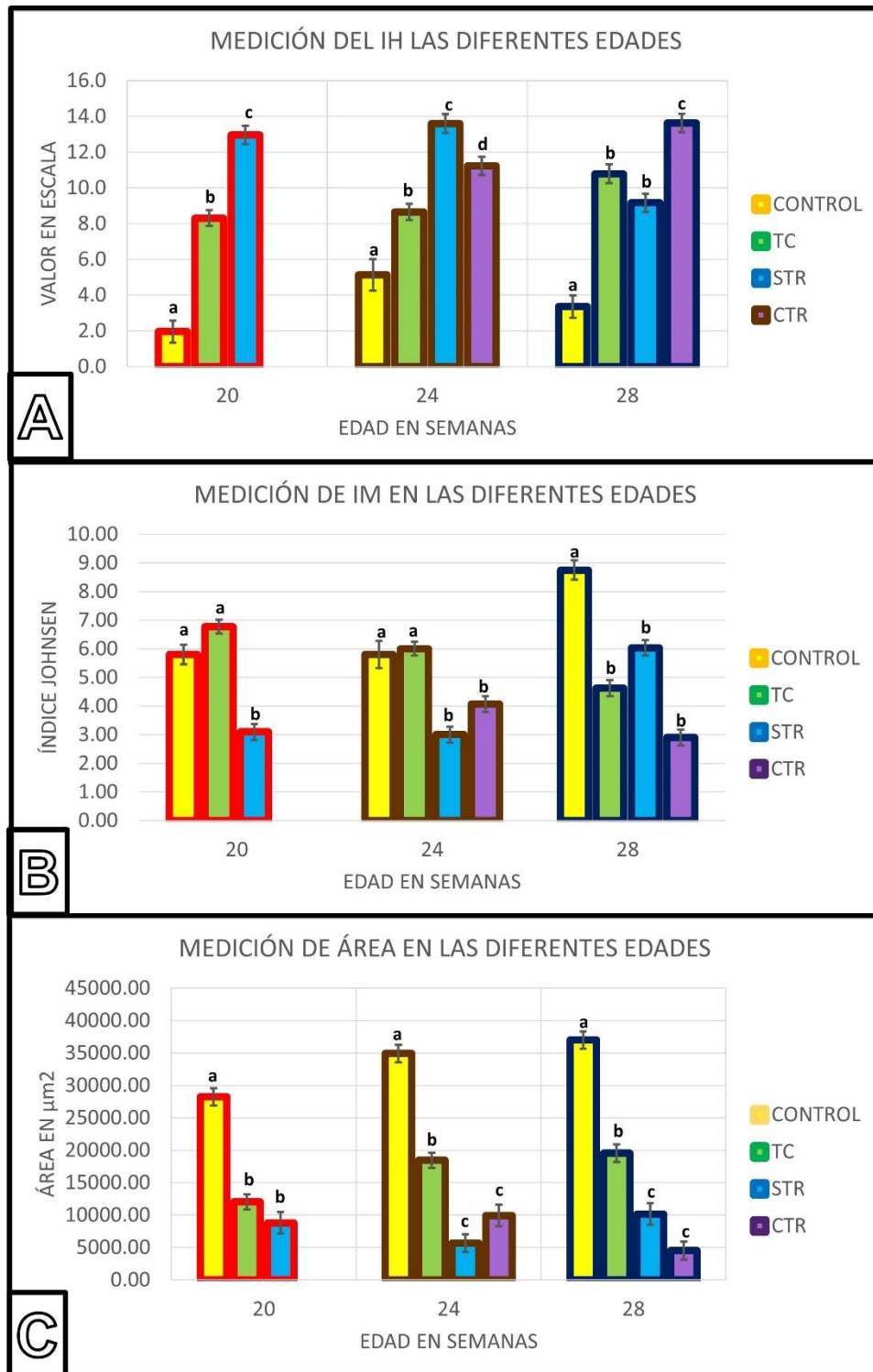
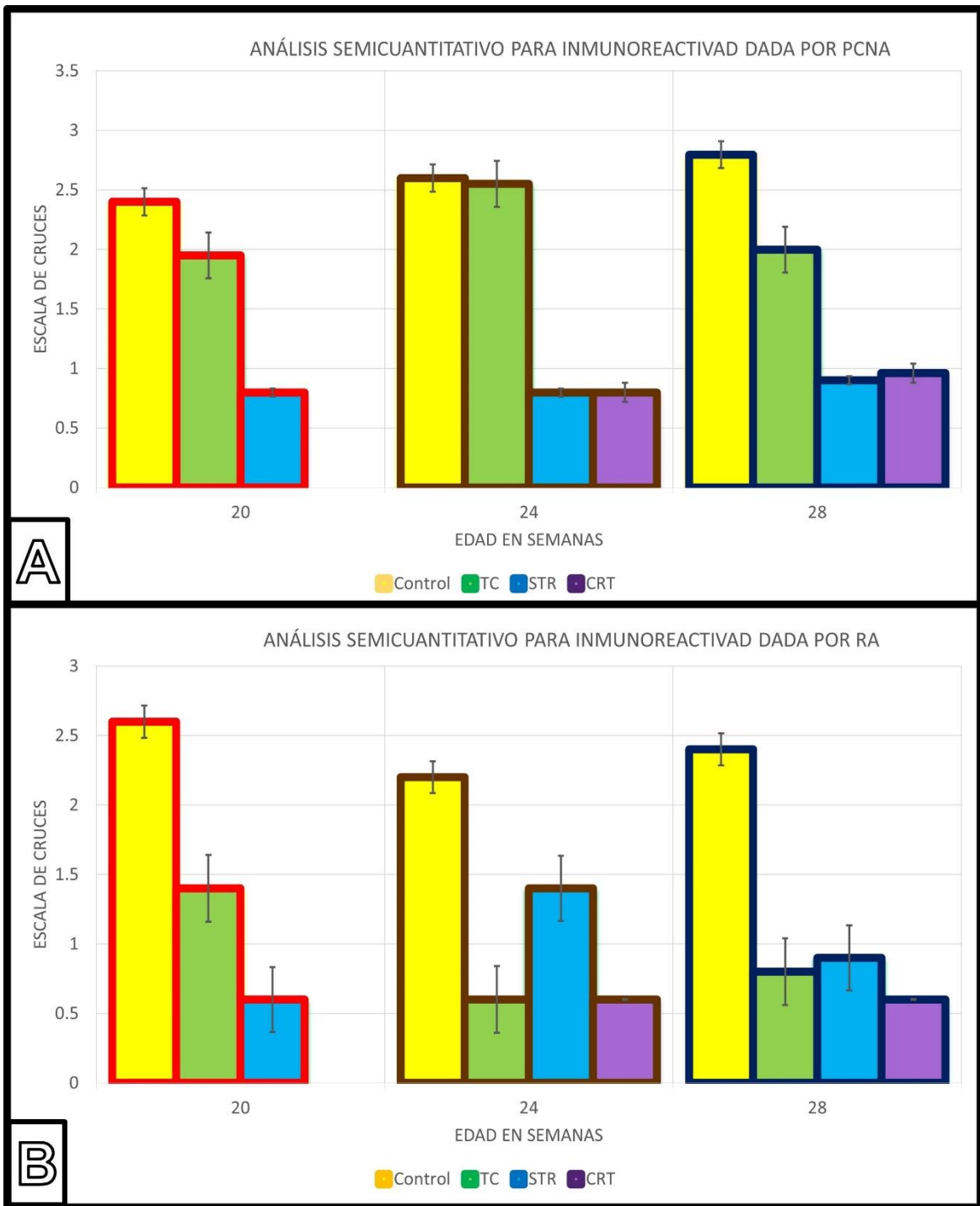


Figura 4.-Túbulos seminíferos de cerdo miniatura de 20 semanas de edad: A.- Grupo Control; B.- Grupo TC; C.-Grupo STR. Las alteraciones encontradas fueron: (V) Vacuolización; (P) Pycnosis; (Dc) Descamación; (Sc) Sincitios celulares; (Pm) Plegamiento de la membrana basal. Células reportadas: (S) Sertoli; (Eg) Espermatogonia; (EgB) Espermatogonia tipo B; (Pq) Espermatocitos en Paquiteno; (Er) Espermátidas redondas; (Ee) Espermátidas elongadas Imagen 20x. tinción azul de toluidina. Barra de calibración= 50µm.



Gráfica 3.- Mediciones de IH, IM y área de los tubos seminíferos de los diferentes tratamientos agrupados por edad: A.- Se muestra el IH de los cuatro tratamientos; B.- Se muestra el IM de los cuatro tratamientos; C.- Se muestra el área de los cuatro tratamientos analizados agrupados por edad se observa una disminución en todos los grupos especialmente en el STR y CTR. En todos los casos diferentes literales significan diferencia entre las mediciones ($p < 0.05$).



Gráfica 4.- Análisis semicuantitativo de la inmunoreactividad en escala de cruces: Los grupos se encuentran acomodados por tratamientos. A.- inmunoreactividad para PCNA. B.- Inmunoreactividad para RA.

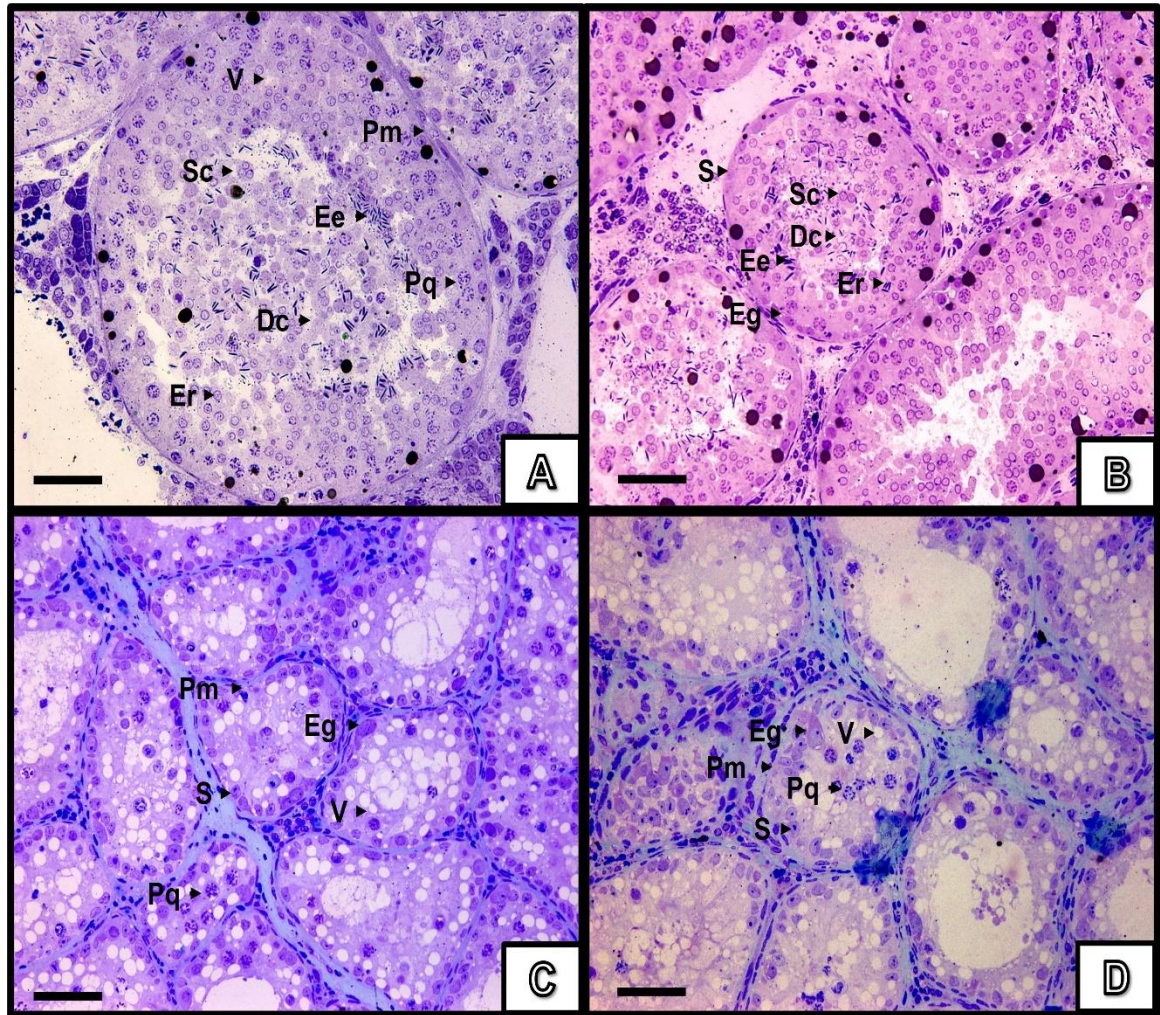


Figura 5.-Túbulos seminíferos de cerdo miniatura de 24 semanas de edad: A.- Grupo Control; B.- Grupo TC; C.-Grupo STR. Las alteraciones encontradas fueron: (V) Vacuolización; (Dc) Descamación; (Sc) Sincitios celulares; (Pm) Plegamiento de la membrana basal. Células reportadas: (S) Sertoli; (Eg) Espermatogonia; (Pq) Espermatocitos en Paquiteno; (Er) Espermátidas redondas; (Ee) Espermátidas elongadas Imagen 20x. tinción azul de toluidina. Barra de calibración= 50µm

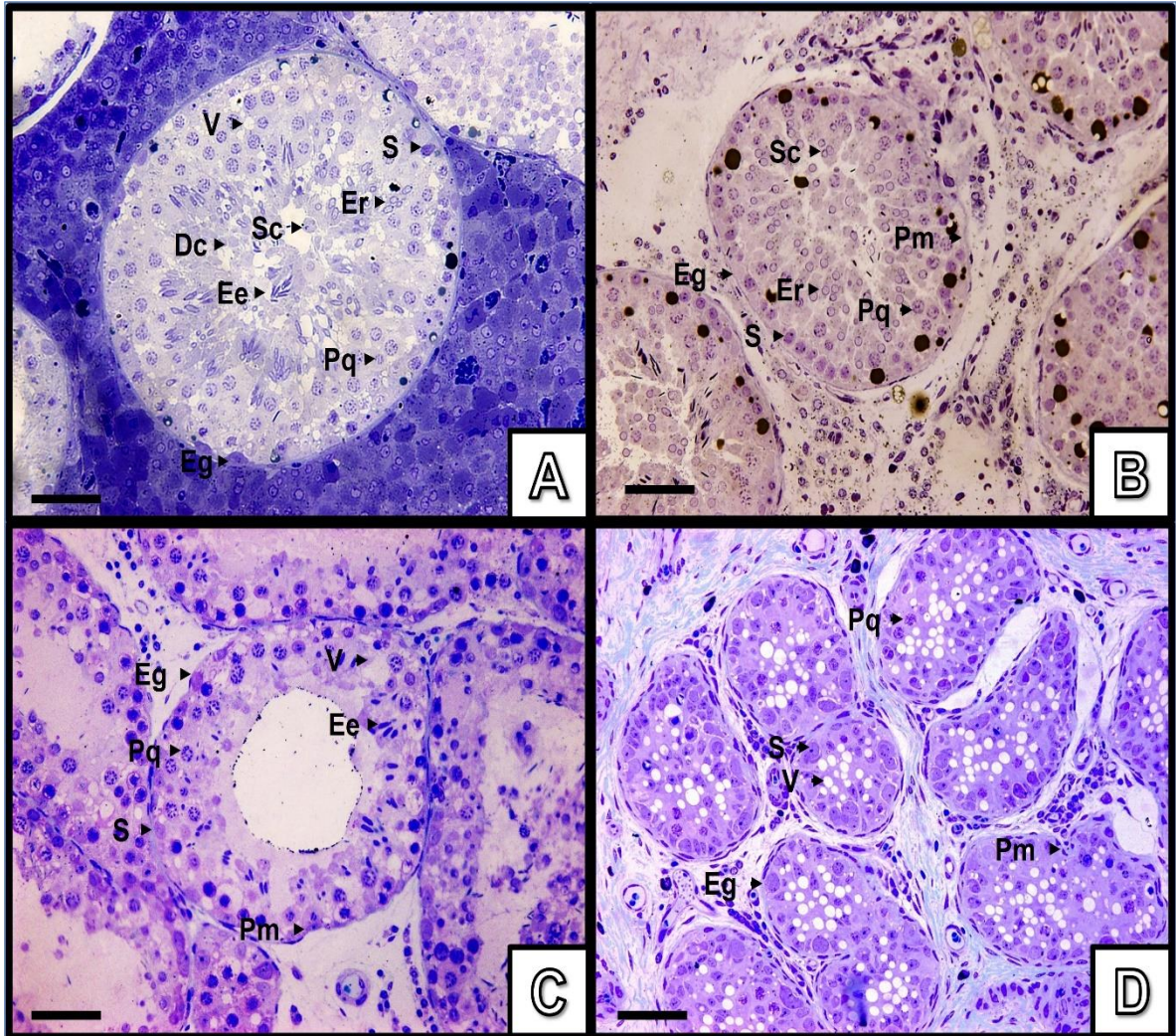


Figura 6.-Túbulos seminíferos de cerdo miniatura de 28 semanas de edad: A.- Grupo Control; B.- Grupo TC; C.-Grupo STR. Las alteraciones encontradas fueron: (V) Vacuolización; (Dc) Descamación; (Sc) Sincitios celulares; (Pm) Plegamiento de la membrana basal. Células reportadas: (S) Sertoli; (Eg) Espermatogonia; (Pq) Espermatocitos en Paquiteno; (Er) Espermátidas redondas; (Ee) Espermátidas elongadas Imagen 20x. tinción azul de toluidina. Barra de calibración= 50µm

8. DISCUSIÓN

8.1. GRUPO CONTROL

El grupo control a lo largo de las edades estudiadas presentó una espermatogénesis completa con una adecuada espermiación en la mayoría de los túbulos seminíferos, lo cual se apega a lo reportado en la literatura donde se menciona que el comienzo de la pubertad en cerdos miniatura se establece entre las 10 y 12 semanas de edad con la primera espermiación a las 14 semanas aproximadamente (Contreras-Ortiz et al., 2021). Mientras que en animales que se emplean en la producción cárnica como los Landrace x Duroc, estos procesos los vemos entre las 20 y 24 semanas de edad. Es por lo que en nuestros animales a las 20 semanas ya pudimos apreciar una espermatogénesis completa; además de mantener sin diferencia significativa, la misma área del epitelio seminífero hasta las 24 semanas con un aumento del IM a las 28. Esto nos hace inferir que se encuentra llegando al punto de madurez sexual, el cual en este tipo de razas se presenta entre las 28 y 32 semanas (Contreras-Ortiz et al., 2021), mientras que para cerdos de producción cárnica se presenta hasta las 56 semanas de edad aproximadamente (Allrich et al., 1983; França et al., 2000).

En cuanto a las alteraciones histopatológicas encontradas en el epitelio seminífero coinciden con lo mencionado para razas de cerdos miniatura como los de Göttingen, Yucatán y microminipigs (Helke et al., 2016; Kangawa, et al., 2016), así como para otras especies, como perros beagle y conejos chinchilla (Morton, 1988; Rehm, 2000; Viguera-Villaseñor et al., 2013). En dichos casos, no se menciona el origen de las alteraciones; sin embargo, en todos los estudios infieren que estas aparecen durante la pubertad (Viguera-Villaseñor et al., 2009). Esta observación podría explicar en nuestro estudio el valor observado de IH e IM, que se refieren a un daño epitelial leve a moderado sin afectar la capacidad reproductiva (Gráfica 1A y B). Esto nos permite suponer que en los cerdos miniatura estas alteraciones son intrínsecas a esta raza. Es importante considerar esta característica en estudios

experimentales que analicen la integridad del epitelio seminífero. Morton (1988) propone que, al considerar estas alteraciones como no específicas, es necesario aumentar el tamaño de la muestra para detectar los efectos en el epitelio seminífero asociados a la manipulación experimental.

En cuanto a las inmunohistoquímicas, los valores constantes de PCNA (Gráfica 2 A) y del área del epitelio (Gráfica 1C) seminífero para animales de las 3 edades coincide con lo reportado para otras razas de cerdo como la Piau (França et al., 2000); en la que se reporta la proliferación de células de Sertoli únicamente en la etapa anterior a la formación de la barrera hematotesticular; ya que después solo proliferan las células germinales. Por lo que en nuestro estudio podemos inferir que la estabilidad en la inmunoreactividad para PCNA se deben únicamente a la proliferación de las células germinales ya que en este punto las células de Sertoli ya no proliferan.

Un caso similar podemos apreciar con los valores RA en donde se puede observar una tendencia a estabilizarse (Gráfica 2B), esto es similar a lo reportado para el testículo humano, donde se aprecia una constancia en los conteos de RA posterior a la pubertad (Boukari et al., 2009; Chemes et al., 2008).

Al relacionar los dos valores semicuantitativos podemos inferir que la proliferación celular de las células germinales es dependiente de andrógenos para su mantenimiento lo cual corresponde con lo reportado en la literatura (Trujillo Ortega et al., 2017; Viguera-Villaseñor et al., 2013) y se complementa con lo antes mencionado, para el establecimiento de la madurez sexual en este tipo de raza.

Estas características testiculares del cerdo miniatura lo asemejan más al testículo humano que al de otros animales que normalmente se emplean como modelos de estudio como por ejemplo los murinos (Bruning et al., 1993; Holstein, 1986), lo cual apoya el uso del cerdo miniatura como modelo para estudiar patologías testiculares humanas.

8.2. GRUPO TC

La frecuencia, dosis y cantidad de aplicaciones de Improvac® en el TC es la sugerida por la marca desde que salió el producto al mercado (Zoetis, 2021). A partir de entonces se ha realizado una gran cantidad de estudios sobre esto; sin embargo, todos ellos en cerdos destinados a la producción cárnica. En nuestro estudio se realizó la aplicación de este medicamento a las edades sugeridas (12 y 16 semanas), no obstante, en el caso de los cerdos miniatura estas aplicaciones empatan con el inicio y establecimiento de la pubertad (Contreras-Ortiz et al., 2021; Kangawa, Otake, Enya, Yoshida, Kangawa, et al., 2016), situación que en los cerdos destinados a la producción se presenta a las semanas 20 a 24 de vida (Allrich et al., 1983; Trudeau et al., 1992). Esto nos hace inferir que los valores de IH encontrados a estas edades se encuentran alterados debido a la posible reducción en las concentraciones de T, sin que esto afectara los valores de IM reportados a las 20 y 24 semanas de vida (Wicks et al., 2013b) (Gráfica 1 A y B). Llama la atención que, a pesar de ello, en estas dos edades hubo de manera escasa túbulos que presentaron un proceso completo de espermatogénesis hasta espermiación, mientras que, en la mayoría, estaba detenida hasta espermatidas en proceso de diferenciación. Esto se puede deber a que los túbulos seminíferos responden de manera diferencial, probablemente a la producción hormonal generada por las células de Leydig asociadas a esos túbulos (Trujillo Ortega et al., 2017; van Straaten & Wensing, 1978). En cambio, a las 28 semanas la cantidad de túbulos hasta espermiación fue menor que a las edades anteriores y la mayoría se encontraban arrestados hasta espermatocitos (Gráfica 1B).

Muy probablemente todo esto se deba a que al aplicar la primera dosis en un momento en que ya estaba presente la pubertad, las líneas celulares que ya se encontraban establecidas en ese momento lograron continuar su proceso, aunque de manera disminuida, pudiendo mantener la espermatogénesis que ya había comenzado previamente. Por otro lado, la siguiente aplicación del medicamento afectó la producción de nuevas generaciones celulares, ocasionando que en la

mayoría de los túbulos solo se observaran pocos espermatoцитos probablemente debido a que estos requieren de T para continuar con su proceso de diferenciación (Regadera & Martínez, 2001), todo esto en conjunto ocasionó que los niveles de IH aumentaran y los de IM disminuyeran a las 28 semanas (Gráfica 1 A y B).

En cuanto a las áreas de los túbulos seminíferos, se pudo apreciar que a las 20 semanas tuvo una medición menor que las edades posteriores (Gráfica 1C), esto a pesar de que la cantidad de anormalidades aumenta a las 28 semanas; lo cual se corrobora con las mediciones de PCNA en donde se ve un leve incremento durante las 24 semanas para después decaer a las 28 (Gráfica 2A). Esto nos hace inferir que la proliferación de células germinales se encuentra presente y puede llevarse a cabo a pesar de una probable bajada en las concentraciones de T; sin embargo, no son suficientes para poder concluir con el proceso de espermatogénesis. Esto se comprueba con la baja inmunoreactividad para RA en las tres edades (Figura 2B). Esto concuerda con lo descrito por França et. al (2005). Quien menciona que para las primeras fases de la espermatogénesis no se requieren niveles elevados de T, pero a partir de que el proceso llega hasta espermatoцитos es fundamental esta hormona para poder continuar con el proceso (Gráfica 1B).

Por otro lado, cuando comparamos el grupo TC y el control, se pudo apreciar que el primero tuvo un IH significativamente elevado en comparación con el segundo (Gráfica 3A). Esto muy probablemente debido a que el grupo TC presenta bajos niveles de T (Wicks et al., 2013b), la cual se encarga de mantener la integridad del túbulo seminífero. Esto concuerda con lo reportado en la literatura donde se menciona que las concentraciones adecuadas de T promueven una integridad adecuada en el epitelio seminífero (Smith and Walker, 2014), por lo que inferimos que al estar disminuidos durante la etapa de pubertad dañan la integridad del epitelio, el cual ya se encuentra afectado de manera normal para esta raza, elevando así las alteraciones histopatológicas. Sin embargo, el IM se mantuvo sin diferencia entre los grupos de 20 y 24 semanas, lo cual implica que estos daños no afectaron la maduración epitelial a estas edades, pero si a las 28 semanas donde

el IM y las áreas del TC fueron muy inferiores a lo reportado para el grupo control (Gráfica 3 A-C). Por lo tanto, a pesar de que se pudo mantener una espermatogénesis adecuada a las 20 y 24 semanas de edad (Gráfica 3 A y B) la cantidad de epitelio seminífero disponible para la producción de espermatozoides fue menor y aunque aparenta un incremento para edades más avanzadas no parece que pueda ser capaz de llegar a niveles convencionales para esta raza, a pesar de que los valores semicuantitativos de PCNA fueron similares para ambos grupos durante las 20 y 24 semanas (Gráfica 3C, Gráfica 4A). Sin embargo, a las 28 semanas el grupo TC se observó con un valor inferior, caso similar a los valores semicuantitativos de RA, donde el grupo control fue claramente mayor en las tres edades reportadas (Gráfica 4B).

8.3. GRUPO STR

Este grupo tiene como característica principal que a partir de la primera aplicación de Improvac® a las tres semanas de edad no deja de tener efecto antigénico contra GnRH y por lo que podemos asumir, de acuerdo con lo reportado en la literatura (Wicks et al., 2013b; Zoetis, 2021), que las concentraciones de T sérica se mantienen bajas constantemente. Esto se vio reflejado en los altos niveles de IH y bajos de IM a las 20 y 24 semanas (Gráfica 1 A y B), lo cual son valores esperados ya que las probablemente bajas concentraciones de T ocasionaron que la espermatogénesis no pudiera llevarse a cabo de manera correcta. Por lo tanto, no se realizó una adecuada diferenciación celular y las únicas células germinales que encontramos en esta etapa fueron las espermatogonias (Regadera and Martínez, 2001). Esto ocasionó un reducido IM y que no se pudiera mantener una citoarquitectura del túbulo seminífero adecuada (Smith and Walker, 2014).

Por otro lado, tenemos los animales de 28 semanas, los cuales presentaron una disminución en el nivel de IH y aumento en el IM (Gráfica 1 A y B), esto posiblemente se debió al leve incremento en RA ocurrido a las 24 semanas (Gráfica 2B). Este hecho probablemente permitió un aumento en la maduración del túbulo

seminífero, permitiendo que la espermatogénesis avanzara hasta espermatocitos con pocas espermátidas, lo cual también se reflejó en un leve incremento en PCNA a las 28 semanas (Gráfica 2A). Este acontecimiento pudo deberse a la proliferación de células germinales; sin embargo, el área no se vio incrementada. Posteriormente, a las 28 semanas vimos que los conteos de RA retornaron a niveles similares a las 20 semanas en este mismo grupo lo cual nos hace inferir que, para edades posteriores, los niveles de IH e IM volverán a los encontrados en edades anteriores.

Al comparar al grupo STR contra los grupos control y TC se aprecia un daño mayor al epitelio seminífero con una gran cantidad de anormalidades y un índice de maduración inferior (Gráfica 3 A y B). Esto nos hace inferir que las concentraciones de T que alcanzó el grupo TC, previo al tratamiento, fueron suficientes para permitir un desarrollo del epitelio seminífero mayor en comparación con el grupo SRT, en el cual, podemos suponer, fue privado de los niveles de T a una edad muy temprana. Por otro lado, se ha visto que la minipubertad que presentan los cerdos miniatura entre las 3 y 5 semanas de vida causa un incremento en los niveles de T, lo que ocasiona que entre las 7 y 8 semanas de edad comience la diferenciación de las células germinales, las cuales darán lugar a la espermatogénesis una vez que inicie la pubertad (Contreras-Ortiz et al., 2021). Por lo tanto, en el grupo STR se vieron afectadas dos etapas principales de desarrollo testicular postnatal, la minipubertad y la pubertad, en comparación con el grupo TC, el cual solo se vio afectado durante la pubertad permitiendo una maduración adecuada de las células de Leydig a las 3 semanas (van Straaten and Wensing, 1978). Esta diferencia entre estos dos grupos se traduce en un daño mayor en el grupo STR, en todos los valores estudiados a las 20 y 24 semanas de edad (Gráfica 3 A-C).

Al hacer la comparación contra el grupo de TC a las 28 semanas, podemos observar que los niveles IH e IM son similares en ambos grupos (Gráfica 3 A y B), ya que empatan la disminución de estos valores en el grupo con TC y el aumento en el grupo STR, a pesar de ello, los valores de las áreas continuaron siendo más

bajos en este último (Gráfica 3C). Esto concuerda con la medición de PCNA, en donde a pesar del leve incremento que se tiene a las 28 semanas, se mantienen por debajo que el grupo control y grupo con TC (Gráfica 3 A).

8.4. GRUPO CRT.

Este grupo se caracterizó por la aplicación continua de Improvac® cada 4 semanas, pero con un tiempo de descanso de 8 previo a la castración, buscando que el efecto de los anticuerpos contra GnRH disminuya, y comience una regeneración testicular como lo reportado en la literatura (Brunius et al., 2011; Castellanos, 2015).

Aquí pudimos apreciar que los valores obtenidos en todos los parámetros se mantuvieron similares en las dos edades (Gráfica 1 A-C), a pesar de que el grupo de 28 semanas tenía una aplicación de vacuna más. Esto debido a que podemos inferir que por acción de la vacuna se mantuvieron valores bajos de T sérica durante la minipubertad y la pubertad lo que ocasionó estas alteraciones (Stocco and McPhaul, 2006; van Straaten and Wensing, 1978).

Al tener diferente número de aplicaciones, pero con similar resultado, nos hace deducir que es posible ocasionar un daño significativo al testículo con cuatro dosis de vacuna aplicadas en los momentos críticos de desarrollo testicular postnatal.

Al hacer la comparación con los otros grupos, pudimos apreciar que se mantuvo diferente en todo momento con las mediciones del grupo control y en casi todas con el grupo TC (Gráfica 3 A-C), en donde tuvieron un valor similar únicamente en los niveles de IM a las 28 semanas; cabe mencionar que fue el momento en que bajaron los niveles del grupo TC.

En cuanto a la comparación contra el grupo STR, los valores morfológicos se mantuvieron similares en casi todo momento, la única diferencia que pudimos apreciar fue para el IH a las 28 semanas donde CTR fue mayor, esto empata con la disminución de estos niveles en el grupo STR a esa edad (Gráfica 3 A y B). El hecho de que el grupo CTR tenga valores tan similares al grupo STR nos habla de

que a pesar de tener un periodo de descanso 8 semanas el daño es similar a cuando aún se tiene el efecto de la vacuna, lo que nos hace suponer que el testículo no se encuentra en vías de regeneración, a pesar del tiempo de descanso.

9. CONCLUSIONES

En estudios realizados con anterioridad, la aplicación de Improvac® se enfocaba únicamente en quitar el olor sexual en los cerdos destinados a producción cárnica, basando la aplicación en el momento de la eutanasia de los animales; sin tomar en cuenta los periodos en los que el testículo tiene más actividad o se encuentra en alguna fase importante de desarrollo. En nuestro estudio esta última parte fue el factor a considerar para las determinar el momento de inoculación en los animales. Además, el emplear como modelo a una raza de cerdo con un periodo más corto de desarrollo sexual, nos permitió en menos tiempo, entender que, si la vacuna se encuentra realizando su efecto en momentos críticos del desarrollo, el daño testicular puede llegar a ser más contundente.

Por lo tanto, con base en los resultados obtenidos de este estudio podemos concluir que la aplicación de por lo menos cuatro dosis de vacuna contra GnRH, que coincidan con periodos críticos del desarrollo y maduración del testículo, ocasiona un daño severo y aparentemente irreversible sobre el tejido testicular en los cerdos miniatura.

10. LITERATURA CITADA

- Abraham, J. (2020). *Swine Production and Management*. CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781003044420>
- Allrich, R. D., Christenson, R. K., Ford, J. J., & Zimmerman, D. R. (1983). Pubertal Development of the Boar: Age-Related Changes in Testicular Morphology and in Vitro Production of Testosterone and Estradiol-17 β 1,2. *Biology of Reproduction*, 28(4), 902–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.4.902>
- Ana, D., Duarte, S., Schroyen, M., Reis Mota, R., Vanderick, S., & Gengler, N. (2021). Recent genetic advances on boar taint reduction as an alternative to castration: a review. *ANIMAL GENETICS*, 62, 137–150.
<https://doi.org/10.1007/s13353-020-00598-w/Published>
- Arato, I., Luca, G., Mancuso, F., Bellucci, C., Lilli, C., Calvitti, M., Hansen, B. C., Milardi, D., Grande, G., & Calafiore, R. (2018). An in vitro prototype of a porcine biomimetic testis-like cell culture system: A novel tool for the study of reassembled Sertoli and Leydig cells. *Asian Journal of Andrology*, 20(2), 160–165. https://doi.org/10.4103/aja.aja_47_17
- Benítez Ortiz, W., & Sánchez, M. D. (2004). *Aspectos generales de la producción porcina tradicional*.
- Boukari, K., Meduri, G., Brailly-Tabard, S., Guibourdenche, J., Ciampi, M. L., Massin, N., Martinerie, L., Picard, J. Y., Rey, R., Lombès, M., & Young, J. (2009). Lack of androgen receptor expression in sertoli cells accounts for the absence of anti-Mullerian hormone repression during early human testis development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(5), 1818–1825. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1909>
- Bruning, G., Dierichs, R., Stümpel, C., & Bergmann, M. (1993). Sertoli cell nuclear changes in human testicular biopsies as revealed by three dimensional reconstruction. *Andrologia*, 25(6), 311–316. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1993.tb02732.x>
- Brunius, C., Zamaratskaia, G., Andersson, K., Chen, G., Norrby, M., Madej, A., & Lundström, K. (2011). Early immunocastration of male pigs with Improvac® - Effect on boar taint, hormones and reproductive organs. *Vaccine*, 29(51), 9514–9520. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.10.014>
- Calatayud-Márquez, D., & Quintero-Moreno, A. (2021). Seminal characteristics of boars housed in a controlled environment located in the warm tropics. *Revista*

de Investigaciones Veterinarias Del Peru, 32(4).
<https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I4.19112>

Castellanos, G. Y. (2015). *EFECTO DE LA INMUNOCASTRACIÓN TEMPRANA CON GnRH MODIFICADA EN CERDOS SOBRE LA MORFOLOGÍA TESTICULAR Y EL METABOLISMO BIOQUÍMICO*. Universidad Nacional Autónoma de México.

CEVA. (2021). *Ceva Valora*. <https://www.ceva.com.mx/especies-y-productos/listado-de-productos/ceva-valora-r>.

Chemes, H. E., Rey, R. A., Nistal, M., Regadera, J., Musse, M., González-Peramato, P., & Serrano, Á. (2008). Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in sertoli cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11), 4408–4412.
<https://doi.org/10.1210/jc.2008-0915>

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2010). The biology of spermatogenesis: The past, present and future. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 365, Issue 1546, pp. 1459–1463). Royal Society.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0024>

Claus, R., Rottner, S., & Rueckert, C. (2008). Individual return to Leydig cell function after GnRH-immunization of boars. *Vaccine*, 26(35), 4571–4578.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.085>

Contreras Ortiz, A. J. (2016). *EFECTO DE LA SUPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LA GnRH EN UNA ETAPA PREPUBERAL TEMPRANA, SOBRE EL DESARROLLO DEL EPIDÍDIMO DEL CERDO*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Contreras-Ortiz, A. J., Viguera, R. M., Mendoza-Elvira, S. E., Martínez-Castañeda, F. E., Gutiérrez-Pérez, O., & Trujillo-Ortega, M. E. (2021). Postnatal testicular development in Vietnamese pot-bellied pigs. *Acta Histochemica*, 123(5). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151741>

Córdova-Izquierdo, Córdova-Jiménez, A. ;, & Córdova-Jiménez, C. A. ; (2007). Control reproductivo del verraco. *Revista Veterinaria*, 18.

Cui, D., Li, F., Li, Q., Li, J., Zhao, Y., Hu, X., Zhang, R., & Li, N. (2015). Generation of a miniature pig disease model for human Laron syndrome. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15603>

Dang-Nguyen, T., Tich, N., Xuan Nguyen, B., Ozawa, M., Kikuchi, K., Manabe, N., Rátky, J., Kanai, Y., & Nagai, T. (2010). Introduction of Various Vietnamese

Indigenous Pig Breeds and Their Conservation by Using Assisted Reproductive Techniques. *The Journal of Reproduction and Development*, 56, 31–35. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-165K>

Deslandes, B., Gariépy, C., & Houde, A. (2001). Review of microbiological and biochemical effects of skatole on animal production. In *Livestock Production Science* (Vol. 71). www.elsevier.com/locate/livprodsci

di Pasquale, J., Nannoni, E., Sardi, L., Rubini, G., Salvatore, R., Bartoli, L., Adinolfi, F., & Martelli, G. (2019). Towards the abandonment of surgical castration in pigs: How is immunocastration perceived by Italian consumers? *Animals*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/ani9050198>

Duarte, D. A. S., Schroyen, M., Mota, R. R., Vanderick, S., & Gengler, N. (2021). Recent genetic advances on boar taint reduction as an alternative to castration: a review. *Journal of Applied Genetics*, 62(1). <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00598-w>

Einarsson, S., Brunius, C., Wallgren, M., Lundström, K., Andersson, K., Zamaratskaia, G., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Effects of early vaccination with Improvac® on the development and function of reproductive organs of male pigs. *Animal Reproduction Science*, 127(1–2), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.06.006>

FAO. (2021). *Meat Market Review: Emerging trends and outlook*. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/CB7886EN/>

Fiebig, U., Holzer, A., Ivanusic, D., Plotzki, E., Hengel, H., Neipel, F., & Denner, J. (2017). Antibody cross-reactivity between porcine cytomegalovirus (PCMV) and human herpesvirus-6 (HHV-6). *Viruses*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/v9110317>

França, L. R., Avelar, G. F., & Almeida, F. F. L. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), 300–318. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.014>

França, L. R., Silva, V. A., Chiarini-Garcia, H., Garcia, S. K., & Debeljuk, L. (2000). Cell Proliferation and Hormonal Changes During Postnatal Development of the Testis in the Pig1. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1629–1636. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1629>

Giuffra, E., Kijas, J. M. H., & Amarger, V. (2000). The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics Society of America*, 154, 1785–1791.

- Hampton, T. (2017). Gene editing could help pave the way for pig-to-human transplantations. In *Circulation* (Vol. 136, Issue 21, pp. 2083–2084). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032246>
- Helke, K. L., Nelson, K. N., Sargeant, A. M., Jacob, B., McKeag, S., Haruna, J., Vemireddi, V., Greeley, M., Brocksmith, D., Navratil, N., Stricker-Krongrad, A., & Hollinger, C. (2016). Background Pathological Changes in Minipigs. In *Toxicologic Pathology* (Vol. 44, Issue 3, pp. 325–337). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/0192623315611762>
- Holstein, A. (1986). Spermatogenesis in the aged--a borderland between normal and pathologic anatomy. *Der Urologe. Ausg. A.*, 25(3), 130–137.
- James Squires, E., Bone, C., & Cameron, J. (2020). Pork production with entire males: Directions for control of boar taint. In *Animals* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10091665>
- Johnsen, S. G. (1970). Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormone Research in Paediatrics*, 1(1), 2–25. <https://doi.org/10.1159/000178170>
- Kangawa, A., Otake, M., Enya, S., Yoshida, T., Kangawa, Y., & Shibata, M. (2016). Spermatogenesis in the Microminipig. *Toxicologic Pathology*, 44(7), 974–986. <https://doi.org/10.1177/0192623316654586>
- Kangawa, A., Otake, M., Enya, S., Yoshida, T., & Shibata, M. (2016). Histological Development of Male Reproductive Organs in Microminipigs. *Toxicologic Pathology*, 44(8), 1105–1122. <https://doi.org/10.1177/0192623316673495>
- Kramer, C. Y. (1956). Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Numbers of Replications. *Biometrics*, 12(3), 307. <https://doi.org/10.2307/3001469>
- Langhout, G. C., Bydlon, T. M., van der Voort, M., Müller, M., Kortsmid, J., Lucassen, G., Balthasar, A. J. R., van Geffen, G. J., Steinfeldt, T., Sterenberg, H. J. C. M., Hendriks, B. H. W., & Ruers, T. J. M. (2018). Nerve detection using optical spectroscopy, an evaluation in four different models: In human and swine, in-vivo, and post mortem. *Lasers in Surgery and Medicine*, 50(3), 253–261. <https://doi.org/10.1002/lsm.22755>
- Larson, G., Albarella, U., Dobney, K., Rowley-Conwy, P., Rg Schibler, J., Tresset, A., Vigne, J.-D., Edwards, C. J., Schlumbaum, A., Dinu, A., Bař, A. B., Bařlařbařlařcsescu, B., Dolman, G., Tagliacozzo, A., Manaseryan, N., Miracle, P., van Wijngaarden-Bakker, L., Masseti, M., Bradley, D. G., & Cooper, A.

- (2007). *Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Lobue, S. A., Yamada, N., Choi, M. J., & Olsen, T. W. (2017). Creating a full-thickness choroidal incision: An ex vivo analysis of human and porcine tissue contraction dynamics. *Translational Vision Science and Technology*, 6(6). <https://doi.org/10.1167/tvst.6.6.5>
- Lonardi, C., Scollo, A., Normando, S., Brscic, M., & Gottardo, F. (2015). Can novel methods be useful for pain assessment of castrated piglets? *Animal*, 9(5), 871–877. <https://doi.org/10.1017/S1751731114003176>
- Ma, C., Song, H., Guan, K., Zhou, J., Xia, X., & Li, F. (2016). Characterization of swine testicular cell line as immature porcine Sertoli cell line. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 52(4), 427–433. <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9994-8>
- M.J., K. (1985). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal Cell Biology*, 27, 137–138.
- Morton, D. (1988). The use of rabbits in male reproductive toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 77, 5–9. <https://doi.org/10.1289/ehp.88775>
- OCDE/FAO (2017). (2017). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026*. OECD. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2017-es
- Oskam, I. C., Lervik, S., Tajet, H., Dahl, E., Ropstad, E., & Andresen, T. (2010). Differences in testosterone, androstenedione, and skatole levels in plasma and fat between pubertal purebred Duroc and Landrace boars in response to human chorionic gonadotrophin stimulation. *Theriogenology*, 74(6), 1088–1098. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.006>
- Park, E., Cho, M., & Ki, C. S. (2009). Correct use of repeated measures analysis of variance. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29(1), 1–9. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.1>
- Pavio, N., Doceul, V., Bagdassarian, E., & Johne, R. (2017). Recent knowledge on hepatitis e virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. In *Veterinary Research* (Vol. 48, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0483-9>
- Poklucar, K., Čandek-Potokar, M., Vrecl, M., Batorek-Lukač, N., Fazarinc, G., Kress, K., Weiler, U., Stefanski, V., & Škrlep, M. (2021a). The effect of immunocastration on adipose tissue deposition and composition in pigs. *Animal*, 15(2). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100118>

- Poklukar, K., Čandek-Potokar, M., Vrecl, M., Batorek-Lukač, N., Fazarinc, G., Kress, K., Weiler, U., Stefanski, V., & Škrlep, M. (2021b). The effect of immunocastration on adipose tissue deposition and composition in pigs. *Animal*, 15(2). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100118>
- Prunier, A., Bonneau, M., Borell, E. H., Cinotti, S., Gunn, M., Fredriksen, B., Giersing, M., Morton, D., Tuytens, F., & Velarde, A. (2006). A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *Animal Welfare*, 15.
- Quiles, A. (2009). Castración de lechones: Ventajas e inconvenientes. *Cría y Salud Porcina*, 24, 54–63.
- Regadera, J., & Martínez, F. (2001). *Androgen Receptor Expression in Sertoli Cells as a Function of Seminiferous Tubule Maturation in the Human Cryptorchid Testis**. <https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/86/1/413/2841373>
- Rehm, S. (2000). Spontaneous Testicular Lesions in Purpose-Bred Beagle Dogs. *Toxicologic Pathology*, 28(6), 782–787. <https://doi.org/10.1177/019262330002800603>
- Ren, D., Xing, Y., Lin, M., Wu, Y., Li, K., Li, W., Yang, S., Guo, T., Ren, J., Ma, J., Lan, L., & Huang, L. (2009). Evaluations of boar gonad development, spermatogenesis with regard to semen characteristics, libido and serum testosterone levels based on large White Duroc × chinese erhualian crossbred boars. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(6), 913–919. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01117.x>
- Robaire, B., Hinton, B. T., & Orgebin-Crist, M.-C. (2006). The Epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Third, Vol. 1, pp. 1071–1148). Elsevier.
- Robic, A., Larzul, C., & Bonneau, M. (2008). Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue: A review (Open Access publication). In *Genetics Selection Evolution* (Vol. 40, Issue 1, pp. 129–143). <https://doi.org/10.1051/gse:2007040>
- Sañudo Astiz, C. (2011). *Atlas mundial de etnología y zootécnica*. Servet editorial - Grupo Asís Biomedica S.L. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbsp/detail.action?docID=4909012>
- Škrlep, M., Poklukar, K., Kress, K., Vrecl, M., Fazarinc, G., Lukač, N. B., Weiler, U., Stefanski, V., & Čandek-Potokar, M. (2020). Effect of immunocastration and housing conditions on pig carcass and meat quality traits. *Translational Animal Science*, 4(2), 1224–1237. <https://doi.org/10.1093/TAS/TXAA055>

- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 30, pp. 2–13). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>
- Stocco, D. M., & McPhaul, M. J. (2006). Physiology of Testicular Steroidogenesis. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Third, pp. 977–1016). Elsevier.
- Stricker-Krongrad, A., Shoemake, C. R., Pereira, M. E., Gad, S. C., Brocksmith, D., & Bouchard, G. F. (2016). Miniature Swine Breeds in Toxicology and Drug Safety Assessments: What to Expect during Clinical and Pathology Evaluations. *Toxicologic Pathology*, *44*(3), 421–427. <https://doi.org/10.1177/0192623315613337>
- Svendsen, O. (2006). The minipig in toxicology. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *57*(5–6), 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2006.03.003>
- Trudeau, V. L., Meijer, J. C., Erkens, J. H., van de Wiel, D. F., & Wensing, C. J. (1992). Pubertal development in the male pig: effects of treatment with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist on plasma luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, *56*(2), 102–109. <https://europepmc.org/articles/PMC1263516>
- Trujillo Ortega, M. E., Contreras Ortiz, A. J., Espinoza Hernández, S., Gutierrez Pérez, O., Hernández Trujillo, E., Nava Navarrete, J. de J., Martinez Gamba, R. G., Martinez Rodriguez, R., Rojas Castañeda, J. C., Sánchez Hernández, M., Viguera Villaseñor, R. M., & Castellanos Sánchez, G. Y. (2017). *El Verraco* (Primera edición). Universidad Nacional Autónoma de Mexico.
- van Straaten, H. W. M., & Wensing, C. J. G. (1978). *Leydig Cell Development in the Testis of the Pig*.
- Viguera-Villaseñor, R. M., Molina-Ortiz, D., Reyes-Torres, G., del Ángel, D. S., Moreno-Mendoza, N. A., Cruz, M. E. G., Cuevas-Alpuche, O., & Rojas-Castañeda, J. C. (2009). Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta Histochemica*, *111*(2), 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2008.05.004>
- Viguera-Villaseñor, R. M., Montelongo-Solís, P., Chávez-Saldaña, M. D., Gutiérrez-Pérez, O., Arteaga-Silva, M., & Rojas-Castañeda, J. C. (2013). Postnatal testicular development in the Chinchilla rabbit. *Acta Histochemica*, *115*(7), 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.02.004>

- Weaver, D. M., Tyler, J. W., Miller, M. A., Shore, M. D., & Cowart, R. P. (1999). Bilateral testicular interstitial cell tumour in an aged boar. *Veterinary Record*, 146(8), 224. <https://doi.org/10.1136/vr.146.8.224>
- Wicks, N., Crouch, S., & Pearl, C. A. (2013a). Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. *Animal Reproduction Science*, 142(3–4), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.017>
- Wicks, N., Crouch, S., & Pearl, C. A. (2013b). Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. *Animal Reproduction Science*, 142(3–4), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.017>
- Yáñez, L., Trompiz, J., & Vecchionacce, H. (2005). *Introduction of hiperprolific chinese pig breeds on occidentals: a review.*
- Zoetis. (2021). *Improvac.*
<https://www.zoetis.mx/products/porcino/improvac.aspx>

11. ANEXOS

11.1. ANEXO I: Índice de Johnsen.

Tabla 1.- Escala de puntuación para determinación del índice de maduración del epitelio seminífero (Johnsen, 1970).

Puntuación	Maduración
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides.
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 por tubo).
8	No hay espermatozoides maduros, presencia de espermátidas maduras en diferenciación.
7	Gran cantidad de espermátidas sin algún signo de diferenciación.
6	Presencia de pocas espermátidas (5 por tubo).
5	Gran cantidad de espermatoцитos presentes.
4	Pocos espermatoцитos presentes (5 por tubo).
3	Presencia únicamente de espermatogónias.
2	No hay células germinales, sólo están presentes las células de Sertoli.
1	No hay células en el tubo seminífero.

11.2. ANEXO II: Índice Histopatológico.

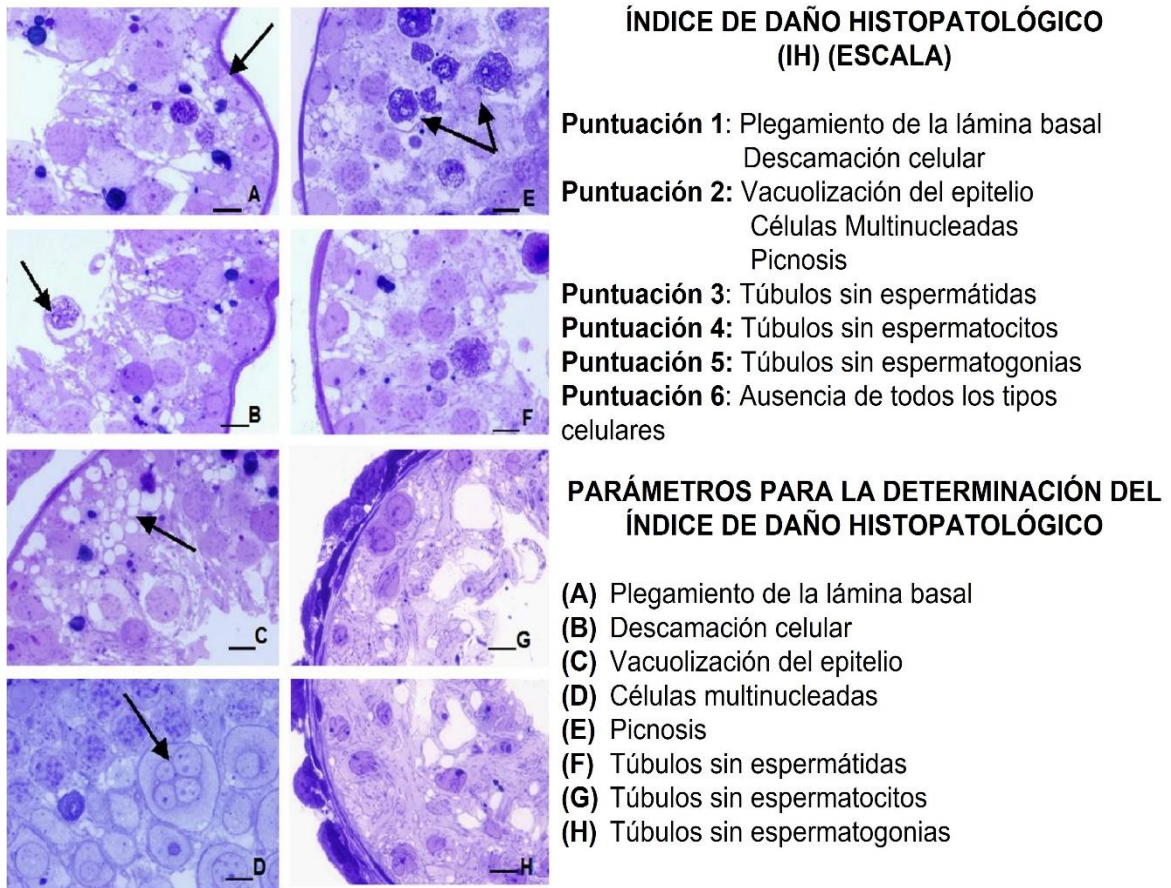


Figura 7.- Escala para determinar el índice de daño Histopatológico (IH) (Vigueras-Villaseñor et al., 2009); Para la determinación del índice de daño histopatológico es necesario sumar los puntos de acuerdo con el tipo de daño presentado en el túbulo seminífero siendo 26 el valor máximo en la escala.

11.3. ANEXO III: Controles positivos y negativos para inmunohistoquímica.

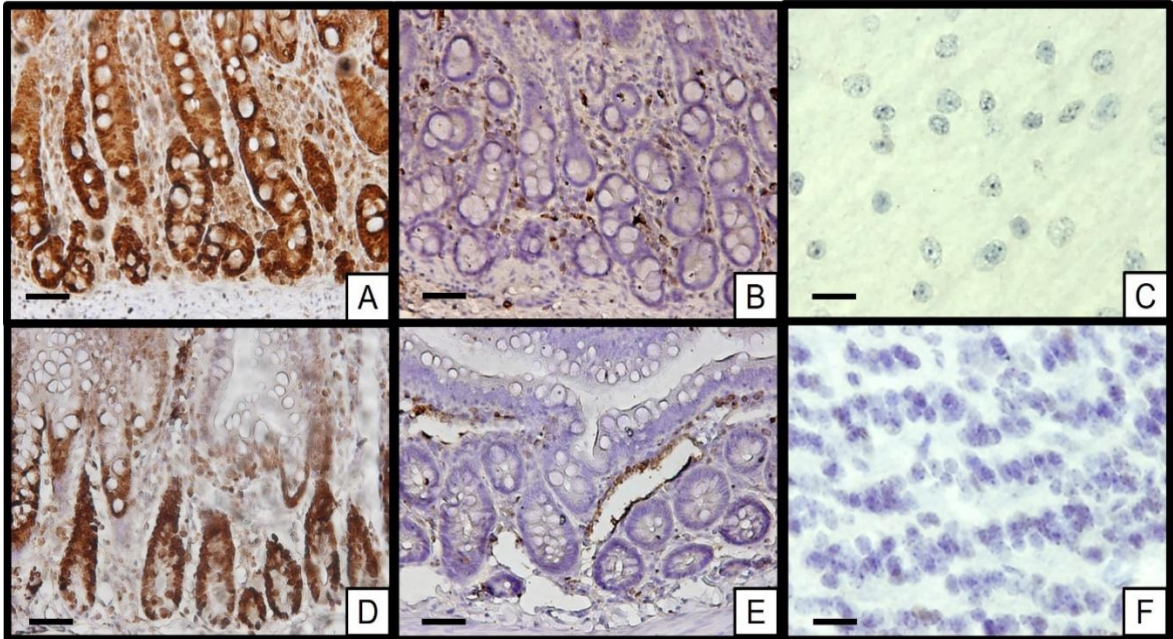


Figura 8.- Controles positivos y negativos para validación de inmunohistoquímica para determinación de PCNA: (A) intestino de cerdo con marca positiva; (B) Intestino de cerdo sin marca positiva con ausencia de anticuerpo primario; (C) Cerebro de cerdo como control negativo sin marca positiva; (D) Intestino de ratón con marca positiva como prueba de funcionamiento de anticuerpo primario; (E) Intestino de ratón sin marca positiva en ausencia de anticuerpo primario; (F) Cerebro de ratón como control negativo sin marca positiva. Técnica inmunohistoquímica 20x.

· Barra de calibración 50 μ m.

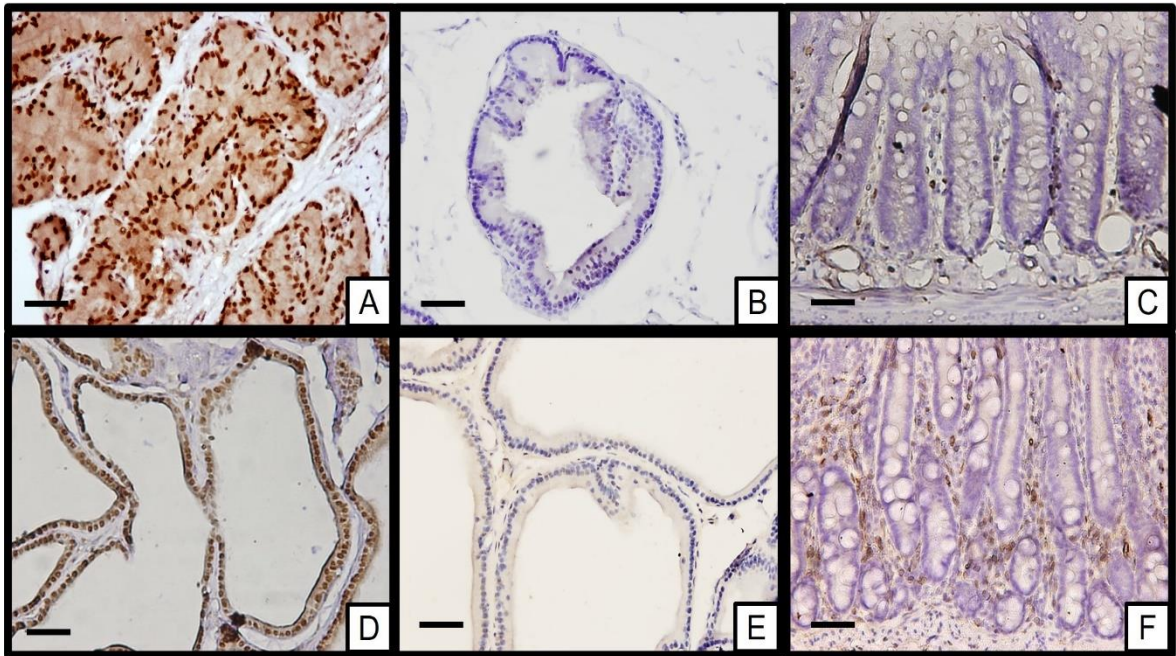


Figura 9.- Controles positivos y negativos para validación de inmunohistoquímica para determinación de RA: (A) Próstata de cerdo con marca positiva; (B) Próstata de cerdo sin marca positiva con ausencia de anticuerpo primario; (C) Intestino de cerdo como control negativo sin marca positiva; (D) Próstata de ratón con marca positiva como prueba de funcionamiento de anticuerpo primario; (E) Próstata de ratón sin marca positiva en ausencia de anticuerpo primario; (F) Intestino de ratón como control negativo sin marca positiva. Técnica inmunohistoquímica 20x. Barra de calibración 50 μ m

11.4. ANEXO IV: Artículo Publicado

Acta Histochemica 123 (2021) 151741



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Histochemica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/acthis



Postnatal testicular development in Vietnamese pot-bellied pigs

Alan Jair Contreras-Ortiz^a, Rosa María Viguera^{b,*,}, Susana Elisa Mendoza-Elvira^c,
Francisco Ernesto Martínez-Castañeda^d, Oscar Gutiérrez-Pérez^c, María Elena Trujillo-Ortega^{e,*}

^a Programa Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico

^b Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Pediatría, CDMX, C.P. 04530, Ciudad de México, Mexico

^c Laboratorio de Virología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, Mexico

^d Instituto de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, Mexico

^e Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (C.E.I.E.P.P.), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Mexico

^f Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, C.P. 04510, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Spermatogenesis
Vietnamese pot-bellied pig
Testicular development
Testicle
Androgen receptor

ABSTRACT

The Vietnamese pot-bellied pig is a breed with high investigation potential. However, at the reproductive level, its testicular characteristics are still unknown, as well as the different stages of its development. Therefore, the objective of this work is to describe the postnatal testicular development of Vietnamese pot-bellied pigs. In this study, we used pigs grouped into the neonatal stage, animals at zero weeks; prepubertal stage, animals at three and eight weeks; pubertal stage, animals at twelve and sixteen weeks; and postpubertal stage animals at twenty, twenty-four, twenty-eight and thirty-two weeks of age. The neonatal stage is characterized by gonocytes at different migration phases. In the prepubertal stage, gonocytes were differentiated into spermatogonia at 3 weeks of age, and the first spermatocytes were observed at 7 weeks of age. Puberty was determined to start at 12 weeks because seminiferous tubules are found with complete spermatogenesis and the highest peaks in positive cell counting of androgen receptors (AR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) factor that later decreased and further stabilized in the following weeks. In the postpubertal stage, an increase in seminiferous tubule areas was observed. The number of apoptotic cells ranged from low to null at all ages. Testosterone (T) and gonadotropin levels had two important peaks at 3 and 24 weeks. The seminiferous epithelium cycle was found to have 11 stages according to acrosome development. These characteristics of Vietnamese pot-bellied pig testes, which are different from rat testes and more similar to human testicles, make them a viable model to study human male reproductive biology. The postnatal testicular development of pot-bellied pigs is different from the postnatal testicular development of other breeds. Therefore, due to this difference in size and easy manipulation, the Vietnamese pig is an alternative for investigation compared to other pig breeds.

1. Introduction

Pigs have great relevance as experimental models for their biochemical, physiological and anatomical similarities to humans (Callesen et al., 2017; Svendsen, 2006). Pigs are used in different research fields, such as pharmacology (Ren et al., 2009), virology (Pavio et al., 2017), genetics (Cui et al., 2015), neurosciences (Langhout et al., 2018), optometry (Lobue et al., 2017), xenotransplantation (Hampton, 2017), infectology (Piebig et al., 2017) and reproduction. In the reproductive investigation area, they have reported works on fertility (Arato et al., 2018), testicle maturation (Ma et al., 2016) and toxicology

(Stricker-Krongrad et al., 2016). The cases reported of testicular cancer in pigs (Weaver et al., 1999) suggest that this species can be used for testicular oncology models. Among pig breeds, the White Composite and Duroc boar are the most used for investigation, which is why their testicular structure and development are well known, as well as their hormonal behavior (Zanella et al., 1999).

The minipig has the advantage of its small size. Therefore, it is easier to manipulate and results in less maintenance cost (Kangawa et al., 2016). This group consists of more than 60 breeds, among which we find the Vietnamese pot-bellied pig.

The 6-month pot-bellied pig weighs approximately 15–27.88 kg,

* Corresponding authors.

E-mail addresses: rmviguera@yahoo.com.mx (R.M. Viguera), elenam@unam.mx (M.E. Trujillo-Ortega).

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151741>

Received 18 February 2020; Received in revised form 4 June 2021; Accepted 7 June 2021

Available online 29 June 2021

0065-1281/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

while a Landrace or Duroc pigs at this age weigh 100 kg (Dang-Nguyen et al., 2010; Svendsen, 2006). This characteristic turns this breed into an option to conduct research studies. There are differences in testicular development depending on the breed. In mini pigs such as Göttingen, Hanford, Yucatan (Heller et al., 2010) and microminipigs (Kangawa et al., 2016), the precise age at which they start spermatogenesis and puberty has been set, and some studies have described abnormalities in the seminiferous tubules such as hypoplasia, atrophy, and tubular degeneration. However, all these characteristics vary according to the breed.

However, the seminiferous epithelium cycle (SEC) is defined as cellular associations in a specific area of the epithelium between two successive appearances of the same cellular association (Parrish et al., 2017). This cycle is described for different breeds, although there are still many more studies such as the Vietnamese pot-bellied pig. It is important to consider the SEC for studies where it is required to identify alterations in the seminiferous epithelium generated by a certain experimental or pathological condition. This cycle has been described in microminipigs, where 11 stages have been established (Kangawa et al., 2016), while in the White Composite or Duroc pigs, only 8 stages (França et al., 2005) are known, and until now, the SEC of other miniature breeds has not been studied.

The testicular postnatal development of pot-bellied pigs is still unknown, as well as the periods of cellular differentiation, proliferation and apoptosis periods, unspecified abnormalities, SEC constituting stages and their relationship with hormonal concentrations. Therefore, the objective of this work is to describe the testicular postnatal development of Vietnamese pot-bellied pigs and the stages constituting their SEC. This information can be used to conduct testicular investigation studies using this breed as a study model.

2. Material and methods

2.1. Animals

For this study, a total of 27 Vietnamese pot-bellied pigs were used, which were obtained and hosted from the teaching, researching and extension center of swine production (CEIEFF) of the National Autonomous University of Mexico, which is located in the 99° 31' 45" west longitude of the Greenwich Meridian. Its northern latitude is 19° 57' 13", during the months of March to October 2018 because during these months the difference in the number of light hours is minimal. The Vietnamese pot-bellied pigs were housed in pens inside enclosed buildings under natural light/dark cycles of 12 h \pm 1.25 h, an ambient temperature of 10–16 °C and a relative humidity ranging between 0.64 % and 84.05 %. They were given ad libitum water access, and food was given twice per day with a balanced diet. The 27 pigs were distributed by age in groups of 3 individuals each, these groups in turn were classified by developmental stages, remaining as follows: Neonatal stage, animals of zero-weeks; prepubertal stage, animals of three- and eight-weeks, pubertal stage, animals of twelve and sixteen weeks, and post-pubertal stage animals of twenty, twenty-four, twenty-eight- and thirty-two-weeks-old. All the practices abided with the ethical principles and regulations recommended by the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO 1999 and to the specifications of the Internal Subcommittee for the Care and Use of Experimental Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the National Autonomous University of Mexico with approval number DC-2018/2-3.

2.2. Method to obtain the samples

The animals were castrated to obtain testicular tissue by administering azaperone at 2.2 mg/kg IM (CHINOIN, Mexico) and 3 mg/kg lidocaine epidurally (FISA, Mexico, 2 %). Blood samples were taken during the procedure from the jugular vein to determine serum hormone concentrations. Finally, antibiotics and analgesics were administered for

3 days (dexabiopen/Syva, Spain, 1 mL/10 kg IM).

2.3. Morphological analysis

One testicle sample of approximately 0.3 cm³ was obtained per animal. These samples were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1965), washed with cacodylate buffer (0.1 M), postfixed in 1 % OsO₄ solution (Merck, Darmstadt, Germany), and processed for inclusion in Epon 812. Semifine cuts of 1 μ m width were made with an ultramicrotome Leica UCT (Leica, Vienna, Austria), stained by flotation with 0.5 % toluidine blue dye and then placed on plates for microscope observation.

The seminiferous tubules were analyzed histologically with a light microscope (BX51, Olympus Corp., Tokyo, Japan) and the Image-Pro Plus 5.1 image analysis system (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). All histological examinations were performed by a single observer. Ten seminiferous tubules with cross-sections were selected subjectively and observed in a 20x objective. The areas of the seminiferous epithelium were estimated by deducting the lumen area from the external area of the seminiferous tubules.

The degree of maturity of the seminiferous epithelium was determined by means of the maturation index (MI) also called the Johnsen index (Johnsen, 1970). This is scoring system for quantifying spermatogenesis according to the profile of the cells encountered in the seminiferous tubules. A score of 10 indicates maximum spermatogenesis activity, whereas a score of 1 indicates complete absence of cells. The histopathological index (HI) was determined by the sum of the scores per section of seminiferous tubule, a score of 20 is considered the highest score. Were considered folding of the basal lamina, desquamation cellular, epithelial vacuolization, cellular syncytium, pycnosis; tubules without spermatids, spermatocytes, spermatogonia or absence of all cell types (Viguera-Villasenor et al., 2009). The MI and HI were determined in ages showing complete spermatogenesis and expressed in arbitrary units (AU).

2.4. Determination of cellular proliferation (PCNA) and androgen receptors (ARs)

One testicular sample of approximately 0.5 cm³ was obtained per animal. These samples were fixed in paraformaldehyde at 4 % and processed to be immersed in paraffin. Tissue sections 4 μ m thick were obtained with a microtome (Leica RM 2155; Microsystems, Nussloch GmbH, Germany) and mounted on slides covered with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Then, they were dewaxed on a stove at 60 °C and rehydrated in a gradual ethanol series. Sections were delimited with a Dako pencil (Dako, Glostrup, Denmark), cuts were incubated in 0.01 M sodium citrate solution (Bio SB Inc., Santa Barbara, CA, USA) for 15 min. Bovine serum albumin was used (BSA, GE Healthcare, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, UK) for 2 h for unspecified blockage. Then, they were incubated for 24 h for PCNA with the monoclonal mouse antibody, PCNA (PC10) sc-50, Lot #D1811 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and for AR with rabbit polyclonal primary antibody, AR (N-20) sc-816, Lot #J020 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Both were diluted at a ratio of 1:50 and incubated for 24 h at room temperature. They were then incubated with secondary antibody for 2 h at room temperature; for PCNA with biotinylated anti-mouse IgG and biotinylated anti-rabbit IgG for AR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and both were diluted at a ratio of 1:200. Then, they were incubated with avidin-biotin complex at room temperature for 1 h, after which time the samples were revealed with diaminobenzidine (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 1 min and were contrasted with hematoxylin for 1 min, dehydrated and coverslipped with Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Sections were analyzed under a light microscope (BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) on a 20x objective.

For the PCNA and AR index, ten seminiferous tubules with cross-sections were selected subjectively scattered per animal, and all

positive cells present in each tubule were counted. All histological examinations were performed by a single observer. To verify the validity of the test, positive markers of mice and pigs were selected for the antibodies used: intestine samples for PCNA and prostate samples for AR were used. Tests were performed with no primary antibody to avoid false positives with secondary antibody.

2.5. Determination of cellular death

Sections cut in paraffin were dewaxed, rehydrated, and delimited with a Dako pencil (Dako, Carpinteria, CA, USA). To identify the cells, we contrasted the tissue sections with DAPI staining in the following way: samples were washed with Hanks balanced solution (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and incubated with DAPI (Sigma-Aldrich) at 1 g/mL concentration followed by K proteinase incubation (20 mg/mL) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) for 30 min. Then, they were placed in 0.3 % of methanol H₂O₂ for 30 min more. Then, they were infiltrated with 0.1 % of Triton X-100 solution (Sigma-Aldrich) for 2 min and incubated in TUNEL solution (terminal deoxynucleotidyl transferase plus nucleotides, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA) for 1 h at 37 °C, then they were coverslipped with Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) for their observation under a fluorescence microscope (BX51, Olympus Corporation, Tokio, Japan). All dilutions and washings between every step were performed using PBS (phosphate-buffered saline). For the determination of the apoptotic index, the cells were identified by intense green color with absorption and emission wavelengths of 494 and 520 nm, respectively; 20 seminiferous tubules per animal were selected subjectively scattered, and all positively presented cells were counted. All histological examinations were performed by a single observer.

2.6. Hormonal determination

Testosterone (T) serum, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) levels were determined by immunoassay of automated chemiluminescent microparticles in a second-generation Architect (Abbot Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.7. Statistical analysis

To determine the differences in immunopositive cell numbers in AR, cellular proliferation (PCNA), apoptosis (TUNEL), seminiferous tubule areas, hormonal concentrations (T, FSH and LH) and their development during the analyzed times, a mixed effects model was used (Park et al., 2009). The best covariance structure was set out, and to delimit the relevance, we conducted the adjusted Tukey test (Kramer, 1956). A variance homogenous assay type Bartlett had been performed previously. The difference was found using the Tukey test. The data analysis for this paper was generated using SAS/STAT software, Version [9] for Windows. Copyright © [2014] SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. products or service names are registered trademarks or trademarks of SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

3. Results

3.1. Neonatal stage

At this age, the testis showed seminiferous cords with areas ranging from 1509.09–2762.31 μm^2 (Table 1). In all of them, gonocytes were located at the center, both during the migration phase towards the basement membrane and in contact with it. Likewise, Sertoli cells were mostly located in the periphery, and some were pyknotic. In the interstitium, Leydig and peritubular cells were found (Fig. 1A). An average of 3.71 ± 4.28 cells per cord showed AR immunoreactivity in Sertoli and germ cells (Fig. 2A), and the proliferation determined by PCNA was observed only in germ cells, with an average of 2.97 ± 4.59 (Fig. 2B). For all stages, the number of apoptotic cells was reduced to null (Table 1, Fig. 3I, J).

3.2. Prepubertal stage

At this stage, the seminiferous cords presented areas from 3529.90–21388.29 μm^2 , which was different from the neonatal stage (Table 1). In the case of 3 weeks of life, Sertoli cells and gonocytes were still found migrating to the basement membrane or in contact with it; however, the first spermatogonia were seen and identified by their smaller size and slightly flat structure, as well as peritubular cells around spermatogenic cords and Leydig cells that were both healthy and pyknotic in the interstitial space (Fig. 1B). In the case of 8-week-old animals, the lumen and the presence of pachytene spermatocytes and abnormalities in the seminiferous epithelium such as degeneration and vacuolization, cellular syncytium, basement membrane folding and cellular desquamation, were observed. (Fig. 1C). In the case of AR and PCNA, a significant increase in the number of immunoreactive cells was observed with respect to the neonatal stage in both cases (Fig. 2 C and D) ($P < 0.05$), with averages of 18.65 ± 3.94 and 19.38 ± 3.98 cells per seminiferous tubule, respectively (Fig. 4). In the apoptotic index, there was no difference from the aforementioned stage (Table 1). In the case of hormonal measurements, the averages of this stage were as follows: T = 466.59 ± 468.92 ng/dL, FSH = 0.07 ± 0.04 mIU/mL and LH = 0.15 ± 0.09 mIU/mL (Fig. 5).

3.3. Pubertal stage

Seminiferous tubule areas in the range of 12282.86 to 48900.62 μm^2 were observed, which were higher than those in the prepubertal stage ($P < 0.05$) (Table 1). Spermatogenesis was complete, with germinal cells in different developmental stages, spermatids both round and elongated and spermiogenesis in older animals (sixteen weeks old) (Fig. 1D). The abnormalities found in the seminiferous tubules were cellular desquamation with abundant cellular syncytium, basement membrane folding, excessive vacuolization and spermatogenesis alterations (Fig. 1F). All abnormalities were constant at the following ages. In these seminiferous tubules, a varied HI from 2 to 15 AU and MI variations from 3 to 10 AU were found (Table 1). For AR immunopositive cells, we observed Leydig and peritubular cells, while in the seminiferous epithelium, Sertoli and germ cells were found in all developmental stages, except elongated spermatids (Fig. 2G), representing an important increase in relation to the prepubertal stage with an average of 94.79 ± 3.73 positive cells per

Table 1
Reproductive parameters of the Vietnamese pot-bellied pig by stage.

Stage	Age(weeks)	n	Seminiferous tubule area (μm^2)	Histopathological Index	Maturation Index	Apoptotic Index
NEONATAL	0	3	2166.93 \pm 1569.71 ^a	–	–	0.13 \pm 0.05 ^a
PREPUBERTAL	03–08	6	9487.42 \pm 1413.43 ^b	–	–	0.14 \pm 0.04 ^a
PUBERTAL	12–16	6	27982.00 \pm 1128.93 ^c	3.56 \pm 0.32 ^a	7.18 \pm 0.35 ^a	0.17 \pm 0.03 ^a
POSTPUBERTAL	20–32	12	36033.00 \pm 784.86 ^d	3.14 \pm 0.32 ^b	6.98 \pm 0.35 ^a	0.14 \pm 0.03 ^a

Different literals imply difference between values ($P < 0.05$) $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

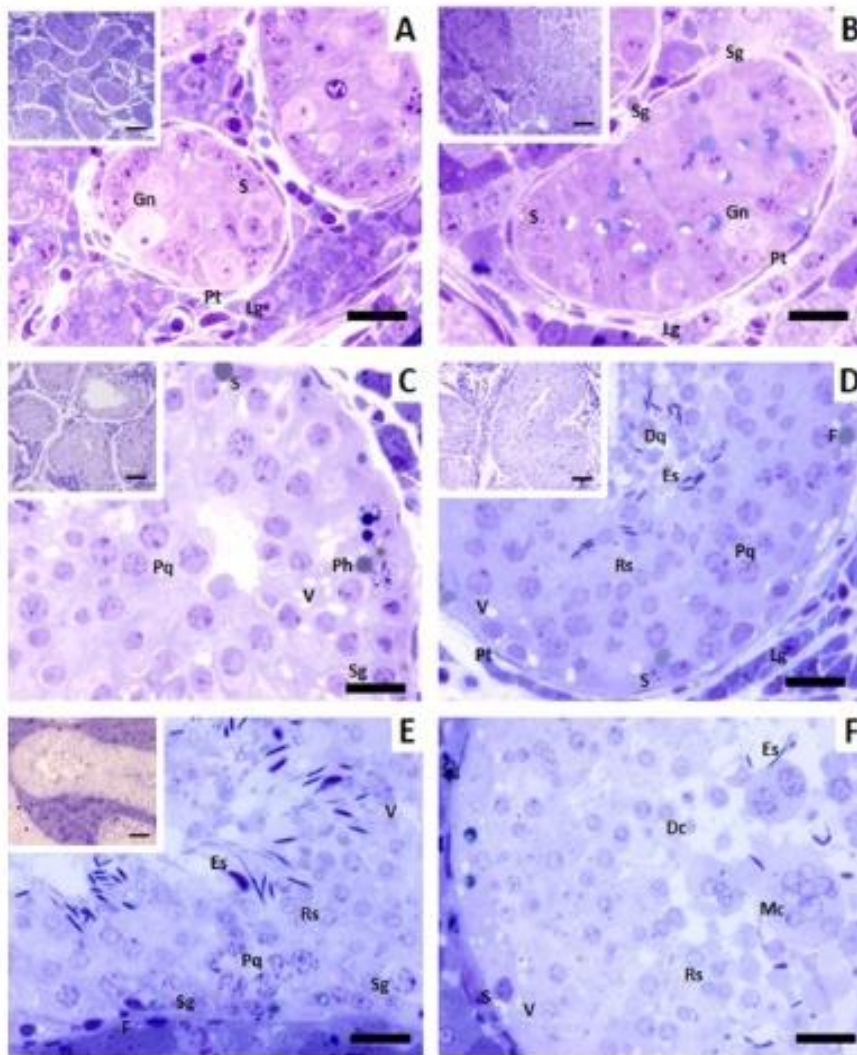


Fig. 1. Vietnamese pot-bellied pig seminiferous cords/tubules in different developmental states. Neonatal stage (A); seminiferous cords with gonocytes (Gn) and Sertoli cells (S) are observed as in migration as in contact with the basal lamina, peritubular cells (Pt) around the seminiferous tubule and Leydig cells (Lg) in the interstitial space. Prepubertal stage (three weeks of life)(B): Seminiferous cords with gonocytes (Gn) concluding their arrival to the basal lamina and Sertoli cells (S) as in migration as in contact with the basal lamina, peritubular cells (Pt) around the spermatic cord and Leydig cells in the interstitial space. Prepubertal stage (eight weeks of life)(C): seminiferous tubules and cords were observed with the presence of spermatogonia (Sg) and Sertoli cells (S), and spermatogenesis was started. Nevertheless, spermatocytes in pachytene (Pq) only were found, and the first abnormalities of the seminiferous epithelium were observed. Pubertal stage (D): spermatogonia (Sg) and Sertoli cells (S) are observed in the periphery of the seminiferous tubule, and complete spermatogenesis with round spermatids (Rs) and elongated spermatids (Es) with no spermiation, in addition to abnormalities in the seminiferous epithelium, peritubular cells (Pt) and Leydig cells (Lg) are observed in the extratubular form. Postpubertal stage (E): spermatogonia (Sg) and Sertoli cells (S) in periphery, completed spermatogenesis with evident spermiation signs and abnormalities are observed in seminiferous epithelium. Peritubular (Pt) and Leydig cells (Lg) are appreciated in the extratubular space. Abnormalities in the seminiferous epithelium (F); abnormalities occur during the prepubertal stage and are constant in the other stages. The most common abnormalities were high desquamation (Dq), folding of the basal lamina (F), phagosome presence (Ph), epithelial vacuolization (V), and multinucleated cells (Mc). Toluidine blue (60x), scale bar 20 μm . Insert (20x) scale bar 50 μm (For interpretation of the references to colour in this figure

legend, the reader is referred to the web version of this article.).

seminiferous tubule ($P < 0.05$ %; Fig. 4). In the case of PCNA, immunoreactivity was observed inside the seminiferous tubules in spermatogonia (Fig. 2H), and the immunoreactivity was found to be higher than the immunoreactivity in the prepubertal stage, with an average of 57.32 ± 3.33 positive cells per seminiferous tubule ($P < 0.05$ %) (Fig. 4). From this stage, there were no changes in the location of AR and PCNA both inside and outside these seminiferous tubule. The apoptotic index was not different between the prepubertal stage and the pubertal stage (Table 1). At the hormonal level, the following data were obtained: $T = 310.52 \pm 382.87$ ng/dL, $FSH = 0.12 \pm 0.03$ mIU/mL and $LH = 0.19 \pm 0.07$ mIU/mL (Fig. 5). No difference was found with the values of the prepubertal group.

3.4. Postpubertal stage

Compared to the pubertal stage, an increase in the seminiferous tubule areas ranged from $10,084.29$ – $72,092.78$ μm^2 ($P < 0.05$) (Table 1). The same stages of spermatogenesis were observed as in the pubertal stage (Fig. 1E). An average of 43.36 ± 2.79 AR-immunopositive cells were seen to show a significant decrease with respect to the pubertal stage ($P < 0.05$ %) (Fig. 4), while PCNA-immunopositive cells showed no difference compared to the pubertal stage, with an average of 63.67 ± 2.21 positive cells per seminiferous tubule (Fig. 4). The apoptotic index was not significant in comparison with the pubertal stage. In addition, in the HI, the pubertal group was observed to be higher than the postpubertal group. However, in the case of MI, there was no difference between these two stages (Table 1). The following averages were

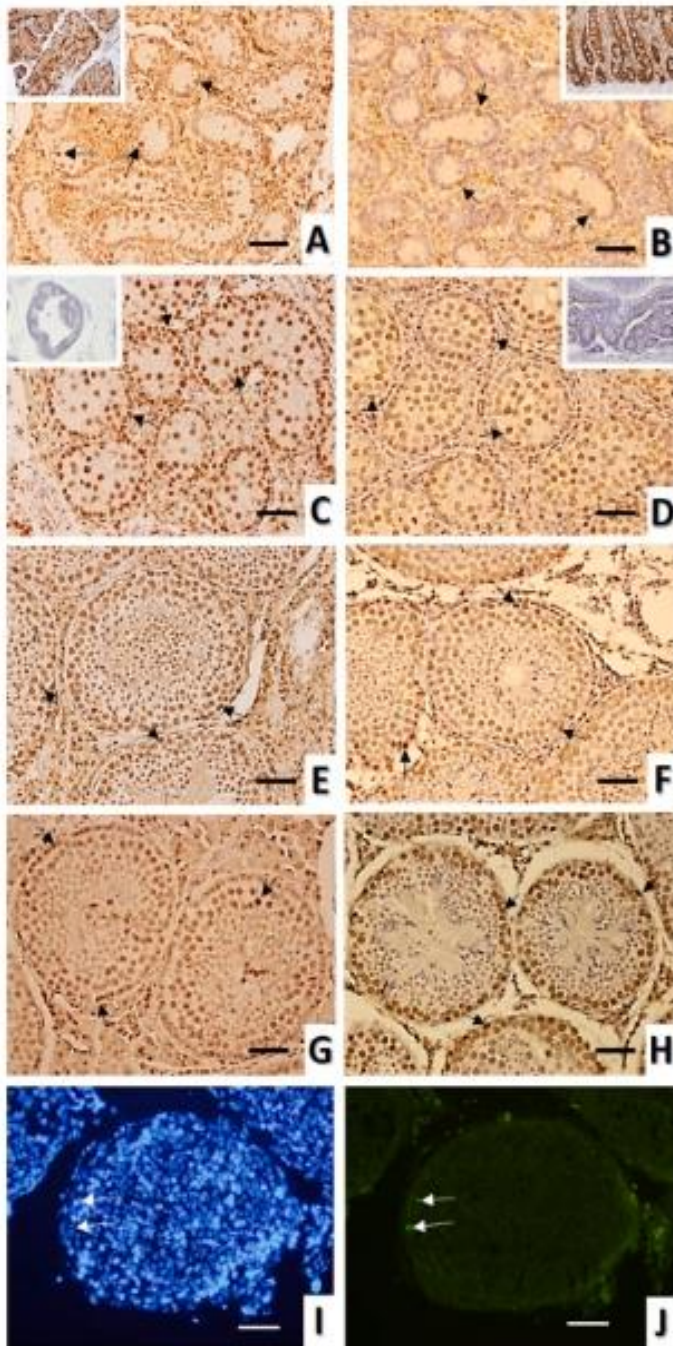


Fig. 2. Seminiferous cords/tubules of Vietnamese pot-bellied pigs with positive cells for AR (A, C, E and G) and PCNA (B, D, F and H) in different stages and seminiferous tubules with apoptosis. Neonatal stage (A and B); prepubertal stage (C and D); in the AR test, Sertoli and Leydig cells are seen with positive marks, while the PCNA test principally shows spermatocytes and gonocytes. Pubertal stage (E and F); a positive mark is observed in the case of the AR test in the following cells: Sertoli, Leydig and spermatocytes until round spermatids, while the PCNA test marks positive in the same cell types of the prepubertal stage. Postpubertal stage (G and H); in both tests, the mark was positive in the same cellular lines of pubertal stages. Insert image A, Prostate of the same pig as a positive control for AR. Insert image B, intestine of the same pig as the positive control of PCNA. The inserts in Figures C and D correspond to negative controls of the technique where the primary antibody was omitted. Immunohistochemistry (20x), scale bar 50 μ m. Cellular apoptosis (I,J): Seminiferous tubules with DAPI contrast (I) and TUNEL (J), apoptotic cells (white arrow). In all ages, a poor or null presence of apoptosis was seen in the reviewed seminiferous tubules, even in those with abnormalities. Fluorescence (20x), scale bar 50 μ m.

observed in the case of hormonal levels: T = 1499.99 ± 354.47 ng/dL, FSH = 0.12 ± 0.03 mUI/mL, and LH = 0.18 ± 0.07 mUI/mL (Fig. 5). There was no difference with the pubertal stage.

3.5. Seminiferous epithelium cycle

While checking the seminiferous tubules, we identified the different SEC stages according to the maturation that the spermatid acrosome presented, as well as the cellular associations existing during this stage,

resulting in the determination of 11 SEC stages (Fig. 3).

4. Discussion

Murine models are the ones most used in pathology studies in humans because of their reduced maintenance cost, easy manipulation, and reproductive efficiency (França et al., 2005). However, their early postnatal testicular development does not resemble the early postnatal testicular development present in humans (Koskenniemi et al., 2017).

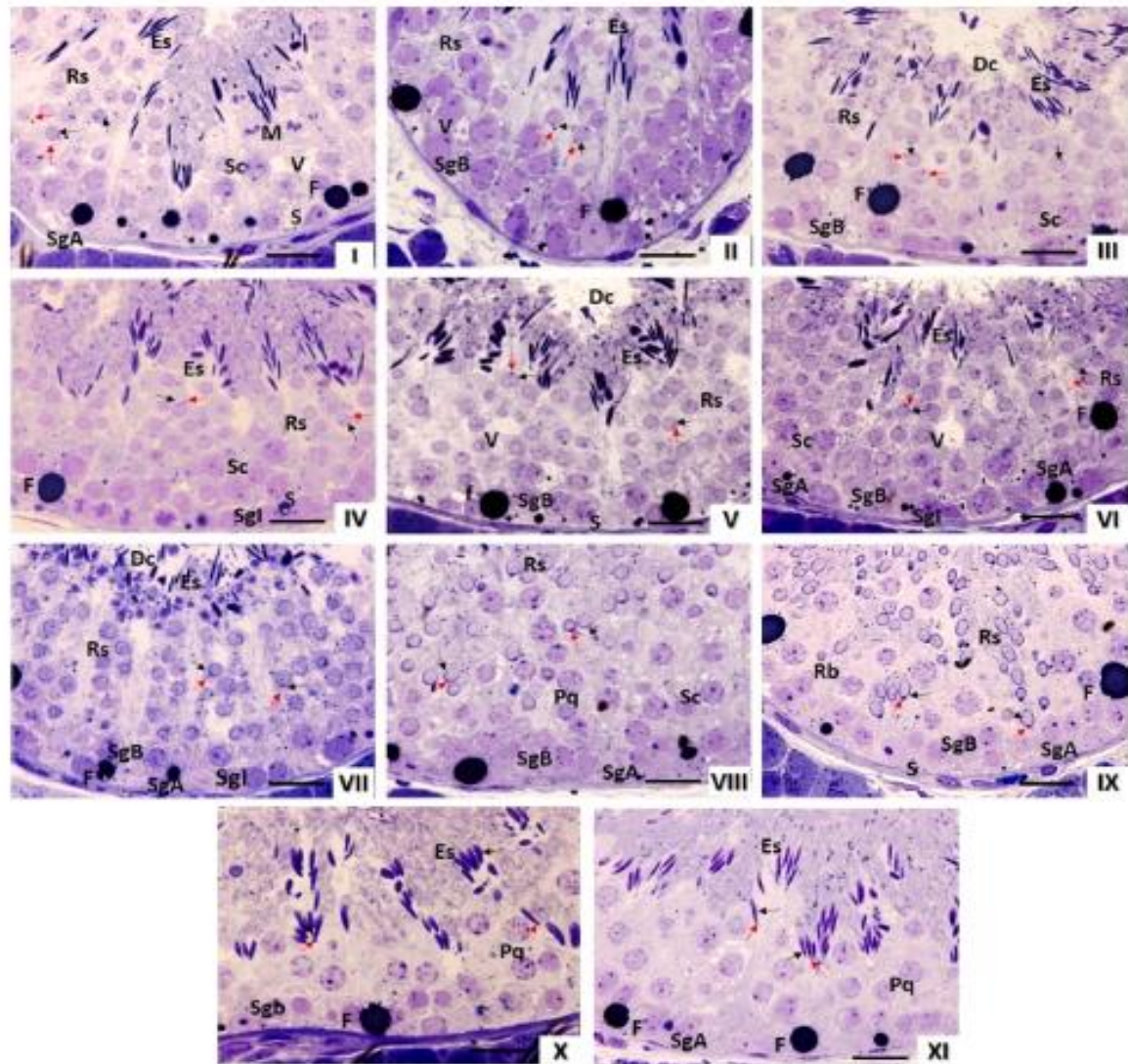


Fig. 3. Seminiferous epithelium cycle stages in Vietnamese pot-bellied pig according to classification in the development of acrosome: stages I to VI are considered early stages, and stages VII to XI are considered late stages. The arrow indicates the Golgi apparatus (black arrow), acrosomal vesicle and granule (red arrow). Spermatogonia A (SgA), Intermediate spermatogonia (SgI), Spermatogonia B (SgB), meiotic cells (M), spermatocytes (Sc) Round spermatids (Rs), elongated spermatids (Es), Sertoli cells (S), desquamation (Dq), vacuolization (V) phagosome (Ph). Toluidine blue (60x). Scale bar 20 μ m (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The pig is an excellent model because it has testicular characteristics similar to the testicular characteristics in humans and shares the same spermatid morphology, testicular structure, unspecified alterations of the seminiferous epithelium and spontaneous pathology development such as cryptorchidism (Bernal-Manas et al., 2005).

In pigs, the differentiation of gonocytes to spermatogonia occurs in scrotum testicles. In contrast, in rats, this difference finishes at 10 days postpartum (dpp) in testicles that have not yet descended and near the beginning of spermatogenesis, which is approximately 14 dpp (Moreno, 2018). In humans, the gonocyte differentiation process concludes in scrotum testicles (as in pigs) between 6 and 12 months of age and seeing the first spermatocytes between 5 and 7 years of age (Neto et al., 2016). In this work, the differentiation of gonocytes to spermatogonia occurred

at 3 weeks of life, and the first pachytene spermatocytes were seen at the prepubertal stage (8 weeks of age). Considering that in the microminipig breed, the differentiation of spermatogonia from spermatocytes takes approximately 5.24 days (Kangawa et al., 2016), we can assume that spermatogenesis in the Vietnamese pot-bellied pig started in the prepubertal stage (approximately the 7th week of life), leading us to assume that there is an infant period of approximately 4 weeks, different from the rat, where this period is reduced to 4 days. These differentiating periods in the pig abide with what has been seen in humans because the pig has wider testicular differentiating windows of time than the rat, which allows us to better manipulate the differentiating periods in the Vietnamese pot-bellied pig.

In Duroc pigs and crossbreeds of Landrace and Yorkshire, gonocyte

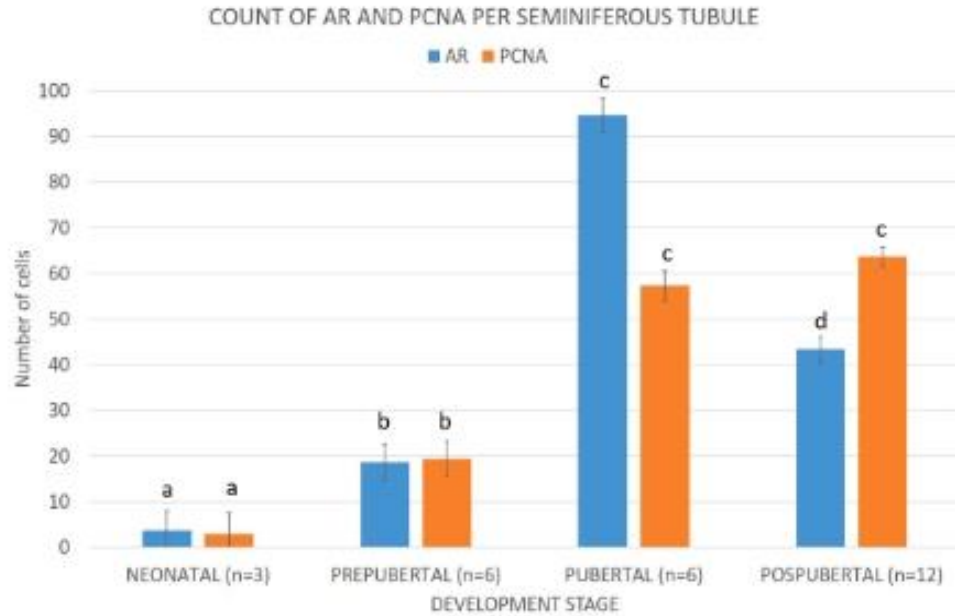


Fig. 4. Positive cell count to AR and PCNA per seminiferous tubule. Different literals imply differences between values per stage ($p < 0.05$). The results are expressed as $\bar{x} \pm SEM$.

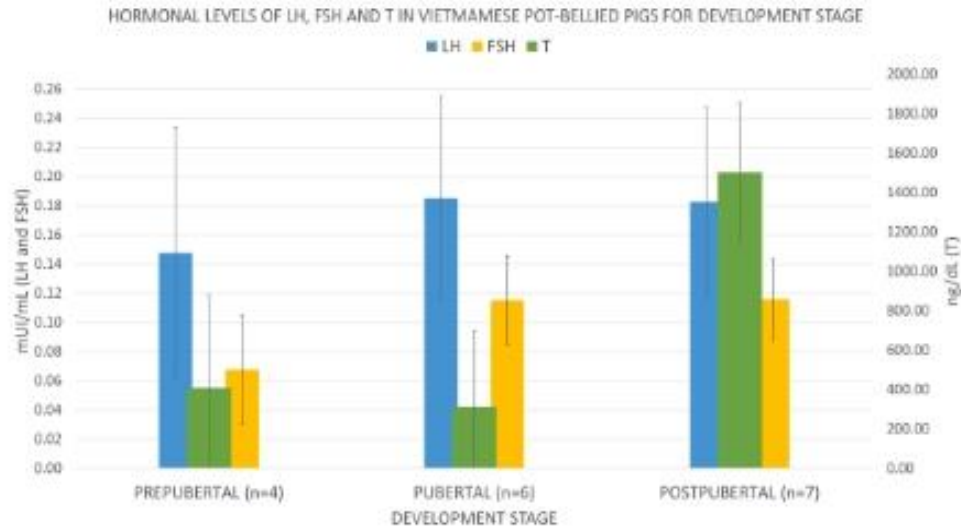


Fig. 5. Individual hormonal concentrations of T, FSH and LH from tested animals from different developmental stages of Vietnamese pot-bellied pigs. Large variability in the concentrations is seen at the same ages. The results are expressed as $\bar{x} \pm SEM$.

differentiation appears in the first 4 weeks of life (Almunia et al., 2018), while in the microminipig breed, gonocyte differentiation occurs between weeks 4 and 6 (Kangawa et al., 2016). In this work, we find that this process is observed in the early stages of the prepubertal group (in the 3rd week of life) and varies among breeds that are used for this type of study. In recent years, the lack of gonocyte differentiation has been proposed to be responsible for testicular tumor development in germinal cells of patients with cryptorchidism (Lee and Shin, 2013).

During the differentiation of gonocytes in Vietnamese pot-bellied

pigs, a high hormonal concentration of T was observed, and we call this period minipuberty. This increase matches what was reported for humans, where an increase in serum T and gonadotropin concentrations in the first months of life has been confirmed (Kohva et al., 2019). This minipuberty period has been suggested to promote the growth and development of the penis and testicles and an increase in the number of germinal Sertoli and Leydig cells. After this period, a decrease in hormonal concentrations comes and starts a quiescence that ends with the beginning of puberty (Lanciotti et al., 2018).

It is probable that this T increase participates in gonocyte differentiation (Gegenschatz-Schmid et al., 2018; Kuiru-Hänninen et al., 2014) because AR immune reactivity in Sertoli cells during the prepubertal stage was higher than that in the neonatal stage (+502 %). Sertoli cells send differentiating factors to gonocytes, and they can be produced under T influence, thus favoring germinal cell proliferation (Li et al., 2017) and matching the increase in PCNA-positive cells found at the prepubertal stage of 652 % and the increase in spermatic cord areas observed compared to the neonatal group.

The fact of seeing T-basal concentrations in the prepubertal stage can be attributed to the postminipuberty quiescence period, matching what was reported for Dutch Landrace x Large White crossbred pigs in prepuberty (Trudeau et al., 1992) and for humans after 9 months of life and just before puberty (Kuiru-Hänninen et al., 2014). The increase in AR immunoreactivity cellular counts in the pubertal stage compared to the prepubertal stage suggests that androgens are necessary in the start of spermatogenesis for the formation of the hematotesticular barrier, the formation of tubular lumen, the proliferation of germ cells, maintenance of meiosis and the production of cell adhesion proteins (Smith and Walker, 2014).

The complete spermatogenesis observed in some of the seminiferous tubules at the pubertal stage with spermiation (week 16) matches what was reported by Kangawa et al. (2016), who mentioned a spermatogenesis duration of 40.9 days in microminipigs. Therefore, in the Vietnamese pot-bellied pig, the first spermiation occurs during the pubertal stage (weeks 13–14 of age). In addition, an increase in AR and PCNA immunoreactivity and an area of seminiferous tubules in the pubertal stage associated with T serum concentrations were observed. These data suggest the beginning of puberty (Allrich et al., 1983; Taberner et al., 2016). Therefore, we infer that in the Vietnamese pot-bellied pig, puberty begins at approximately 12–14 weeks of life, differing from what was reported for Landrace x Duroc boars that are between 16 and 24 weeks of life (Allrich et al., 1983; Trudeau et al., 1992) and with some breeds, such as Meishan, which is at 10 weeks of life (Harayama et al., 1991), and for minipigs such as Göttingen, which is at 8 weeks (Taberner et al., 2016). It is important to say that the existing differences in hormonal values and cell counts are due to variability among individuals, as has been said in previous studies (Lervik et al., 2013).

The positive correlation between older pigs and the area of seminiferous tubes from the postpubertal group without changes in proliferation matches what was reported for the Piau pig, where there is a similar trend for the same age groups. In this breed, Sertoli cell proliferation is reported in a stage before the formation of the blood-testis barrier because afterwards, only germ cells proliferate (França et al., 2000). Therefore, we can infer in our study that the increase in PCNA immunopositive cell counts in the prepubertal stage is due to the proliferation of Sertoli and germ cells. However, the stability trend in PCNA immunoreactivity after the pubertal stage is likely to occur because Sertoli cells stop proliferating, although germ cells continue to proliferate, and the lumen of seminiferous tubes is formed. The latter can explain the increase in tubular areas in the postpubertal stage; AR immunopositivity decreased substantially and later tended to stabilize. This change was visible in a smaller HI and maintenance of MI, similar to what is present in crossbred pigs of Sygen L65xC24 breeds, in which a slight decrease in AR immunoreactive cell counts was reported for the same ages (Ramesh et al., 2007). In the human testicle, a similar behavior has been reported, where the AR immune reactive cell number stabilizes once puberty is reached (Boukari et al., 2009; Chemes et al., 2008). In rats, testicle AR behavior is controversial, while there are authors that report an increase in counts (Abd El-Messah et al., 2016), others report a drop, which can be due to an increase in sensitivity of these receptors that makes it unnecessary to have a high number of ARs to maintain their functions (Chemes et al., 2008; Genovesi et al., 2019). However, finding no difference in the apoptotic index between the different stages suggests that cell death in the Vietnamese pot-bellied pig takes place by a different route than apoptosis.

These values together with high T levels suggest sexual maturity (Allrich et al., 1983; França et al., 2000), which allowed us to infer that the Vietnamese pot-bellied pig reaches this stage at approximately week 32 of age.

Histopathological alterations found in the seminiferous epithelium coincide with what is mentioned for other mini pig breeds such as the Göttingen, Yucatan and microminipigs (Helke et al., 2016; Kangawa et al., 2016), as well as other species, such as beagle dogs and chinchilla rabbits (Morton, 1988; Rehm, 2000; Viguera-Villasenor et al., 2013). In said cases, the origin of the alterations is not mentioned; however, in all the studies, they infer that the alterations appear during puberty (Viguera-Villasenor et al., 2009). This observation could explain in our study the value observed in HI and MI, which refer to light to moderate epithelial damage without affecting this breed reproductive capacity, allowing us to assume that in the Vietnamese pot-bellied pig, these alterations are intrinsic to this breed. These alterations are important to consider for experimental studies that analyze the integrity of the seminiferous epithelium. Morton (1988) proposes that by considering these unspecified alterations, it is necessary to increase the sample size to detect the effects in the seminiferous epithelium associated with the experimental manipulation. The Vietnamese pot-bellied pig as an animal model differs from the almost perfect testicular cyto architecture of the rat but is very close to what appears in the human testicle (Bruning et al., 1993; Holstein, 1986). This observation supports the use of the Vietnamese pot-bellied pig as a model to study human testicular pathologies.

However, the SEC described in this work for the Vietnamese pot-bellied pig in 11 stages differs from the other breeds of pigs where 8 stages are reported (França et al., 2005) from the rat with 14 stages and the human with 6 stages (Nibi et al., 2017). The appearance of more SEC stages compared to other breeds of pigs or humans could enable researchers to conduct a more detailed study of testicular cellular processes. Therefore, we propose the Vietnamese pot-bellied pig as model to study human testicular pathologic studies because the cellular differentiating processes happen in well-demarcated temporary spaces, and unspecified histological alterations are similar to the human, greater number of SEC stages allow us to study the cellular processes in a better way. In addition, the Vietnamese pot-bellied pig has the advantage of having a smaller size and therefore less food consumption than White Composite or Duroc pigs and the cost of acquisition is less in minipigs that are normally used for research, which in developing countries is an advantage since they can be acquired more easily and even at lower cost.

5. Conclusions

In our study, we found that the postnatal testicular development characteristics of Vietnamese pot-bellied pigs differ from those of other pig breeds, as well as from those of other species such as rats and are very similar to the postnatal testicular development characteristics of humans. Likewise, we must also consider the easy manipulation and low maintenance costs. Therefore, it is worth considering Vietnamese pot-bellied pigs as a feasible option for reproductive biology studies.

Author contributions

Contreras-Ortiz AJ Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing Original Draft. **Viguera RM**: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing Original Draft, Writing Review & Editing, Project administration, Funding acquisition. **Mendoza-Elvira SE**: Validation, Writing Review & Editing. **Martínez-Castaneda FE**: Software, Formal analysis, Data Curation. **Gutiérrez-Pérez O**: Resources, Writing Review & Editing. **Trujillo-Ortega ME**: Conceptualization, Resources, Writing Original Draft, Funding acquisition.

Funding

This research was funded by Mexico's Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Project Number: 449384, Programa de Apoyo a Proyectos Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT) support number IN-221218, and Federal Funds National Institute of Pediatrics 2019/063-IMP.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgments

The authors thank Pedro Medina Granados for his invaluable support in processing the samples.

References

- Abd El-Moneem, N.A., El-Shaarawy, E.A.A., AlDomiaty, A.F., Sobhy, R.A.A., 2016. Changes in rat testis morphology and androgen receptor expression around the age of puberty. *Ann. Anat.* 205, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.01.003>.
- Altich, R.D., Christensen, R.K., Ford, J.J., Zimmerman, D.N., 1983. Pubertal development of the boar: age-related changes in testicular morphology and in vitro production of testosterone and Estradiol-17 β . *J. Biol. Reprod.* 28, 902–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.4.902>.
- Almola, J., Nakamura, K., Murakami, M., Takahashi, S., Takano, M., 2018. Characterization of domestic pig spermatogenesis using spermatogonial stem cell markers in the early months of life. *Theriogenology* 107, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.041>.
- Azato, I., Laca, G., Mancuso, F., Bellucci, C., Lilli, C., Calvitti, M., et al., 2018. An in vitro prototype of a porcine bioimaging testis-like cell culture system: a novel tool for the study of reassembled Sertoli and Leydig cells. *Asian J. Androl.* 20, 160–165. <https://doi.org/10.4103/ajs.ajs.47.17>.
- Bernal-Manaa, C.M., Morales, E., Pastor, L.M., Pinart, E., Bonet, S., la Rosa, P.D., et al., 2005. Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpubertal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. *Acta Histochem.* 107, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.actahis.2005.07.002>.
- Bookari, K., Medari, G., Brailly-Taheri, S., Goubaudencs, J., Ciampi, M.L., Mazza, N., et al., 2009. Lack of androgen receptor expression in sertoli cells accounts for the absence of anti-Müllerian hormone repression during early human testis development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1816–1825. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1909>.
- Brating, G., Dierich, B., Störkel, C., Bergmann, M., 1993. Sertoli cell nuclear changes in human testicular biopsies as revealed by three dimensional reconstruction. *Andrologia* 25, 311–316. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1993.tb02732.x>.
- Callonen, M.M., Aemadottir, S.S., Lyskjær, I., Ørskov, M.B.W., Hoyer, S., Degrass-Hansen, P., et al., 2017. A genetically inducible porcine model of intestinal cancer. *Mol. Oncol.* 11, 1616–1629. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12136>.
- Chemes, H.E., Rey, R.A., Nital, M., Negatera, J., Muñoz, M., González-Peramato, P., et al., 2008. Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in sertoli cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4408–4412. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0915>.
- Cui, D., Li, F., Li, Q., Li, J., Zhao, Y., Hu, X., et al., 2015. Generation of a miniature pig disease model for human Leontine syndrome. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep15803>.
- Dang-Nguyen, T., Tich, N., Xuan Nguyen, B., Ozawa, M., Ekuchi, K., Manabe, N., et al., 2010. Introduction of various Vietnamese indigenous pig breeds and their conservation by using assisted reproductive techniques. *J. Reprod. Dev.* 56, 31–35. <https://doi.org/10.1262/jrd.09.165K>.
- Fisbig, U., Holzer, A., Ivamic, D., Plotzki, E., Hengst, H., Netpel, F., et al., 2017. Antibody cross-reactivity between porcine cytomegalovirus (PCMV) and human herpesvirus-6 (HHV-6). *Viruses* 9. <https://doi.org/10.3390/v9110317>.
- França, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F.L., 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. Elsevier Inc., pp. 300–318. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.014>.
- França, L.R., Silva, V.A., Chárlas-García, H., García, S.K., Debeljuk, I., 2000. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the Pig. *Biol. Reprod.* 63, 1629–1636. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1629>.
- Gegenhart-Schmid, K., Verkascka, G., Demougis, F., Billas, V., Dassavictus, D., Stadler, M.B., et al., 2018. Curative GnRH treatment has an unexpected repressive effect on Sertoli cell specific genes. *Basic Clin. Androl.* 28. <https://doi.org/10.1186/s12810-018-0067-1>.
- Genovese, P., Herrera, E., Basio, V., Stelli, A., 2019. Subnutrition effects during pregnancy and lactation on mitosis, apoptosis and androgen receptor expression in the rat testis. *Reprod. Domest. Anim.* 54, 506–513. <https://doi.org/10.1111/rda.13385>.
- Hampton, T., 2017. Gene editing could help pave the way for pig-to-human transplants. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032246>.
- Harayama, H., Nanjo, I., Kanda, S., Kato, S., 1991. Testicular development in Chinese meishan boars. *Theriogenology* 36, 637–643. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90451-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90451-X).
- Helke, K.L., Nelson, K.N., Sargent, A.M., Jacob, B., McKing, S., Haruna, J., et al., 2016. Background pathological changes in minipigs. *Toxicol. Pathol.* <https://doi.org/10.1177/0192623315611792>.
- Holstein, A., 1986. Spermatogenesis in the aged-a borderland between normal and pathologic anatomy. *Der Urologe. Ausg. A* 25, 130–137.
- Johnson, S.G., 1970. Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Horm. Res. Paediatr.* 1, 2–25. <https://doi.org/10.1159/000178170>.
- Kangawa, A., Otake, M., Enya, S., Yoshida, T., Kangawa, Y., Shibata, M., 2016. Spermatogenesis in the microminipig. *Toxicol. Pathol.* 44, 974–986. <https://doi.org/10.1177/0192623316654586>.
- Korenovsky, M.L., 1985. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137–138.
- Koivya, Z., Huopio, H., Hietamäki, J., Hero, M., Miettinen, P.J., Raitva, T., 2019. Treatment of gonadotropin deficiency during the first year of life: long-term observation and outcome in five boys. *Hum. Reprod. (Oxf., Engl.)* 34, 863–871. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez040>.
- Konkoniemi, J.J., Virtanen, H.E., Toppari, J., 2017. Testicular growth and development in puberty. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* <https://doi.org/10.1097/MEU.0000000000000330>.
- Kramer, C.Y., 1956. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. *Biometrics* 12, 307. <https://doi.org/10.2307/3001468>.
- Kuiri-Hämäläinen, T., Saarikangas, U., Dunkel, L., 2014. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Horm. Res. Paediatr.* <https://doi.org/10.1159/000362414>.
- Lancietti, L., Coffini, M., Leonardi, A., Penta, L., Esposito, S., 2018. Up-to-date review about minipuberty and overview on hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation in fetal and neonatal life. *Front. Endocrinol.* <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00410>.
- Loughout, G.C., Bydton, T.M., van der Voort, M., Müller, M., Kortemüt, J., Lucasen, G., et al., 2018. Nerve detection using optical spectroscopy, an evaluation in four different models: in human and swine, in-vivo, and post mortem. *Lasers Surg. Med.* 50, 253–261. <https://doi.org/10.1002/lsm.22753>.
- Loe, S.H., Shin, C.H., 2013. Reduced male fertility in childhood cancer survivors. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 18, 168. <https://doi.org/10.6095/apem.2013.18.4.168>.
- Lorvik, S., Ostam, I., Krognas, A., Andreassen, Ø., Dahl, E., Hagen, H.A., et al., 2013. Androstenedione and testosterone levels and testicular morphology of Duroc boars related to estimated breeding value for androstenedione. *Theriogenology* 79, 986–994. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.023>.
- Li, R., Vannikamby, A., Yue, S.S.K., Handelman, D., Hatan, J., 2017. Mouse minipuberty coincides with gonocyte transformation into spermatogonial stem cells: a model for human minipuberty. *Reprod. Fert. Dev.* 29, 2430–2436. <https://doi.org/10.1071/RD17100>.
- Lobse, S.A., Yamada, N., Choi, M.J., Olson, T.W., 2017. Creating a full-thickness choroidal incision: an ex vivo analysis of human and porcine tissue excision dynamics. *Trans. Vis. Sci. Technol.* 6. <https://doi.org/10.1167/tvs.6.6.5>.
- Ma, C., Song, H., Guan, K., Zhou, J., Xia, X., Li, F., 2016. Characterization of swine testicular cell line as immature porcine Sertoli cell line. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 52, 427–433. <https://doi.org/10.1007/s11620-015-0994-0>.
- Moreno, R.D., 2018. The first wave of spermatogenesis. *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, pp. 47–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64428-8>.
- Moran, D., 1968. The use of rabbits in male reproductive toxicology. *Environ. Health Perspect.* 77, 3–9. <https://doi.org/10.1289/ehp.88775>.
- Neis, F.T.L., Bach, P.V., Najari, B.B., Li, P.S., Goldstein, M., 2016. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.059>.
- Nishi, F., Gomes, M.L.M., Carvalho, P.A.R., Reis, A.B., Marinho, R., Melo, R.C.N., et al., 2017. Revisiting the human seminiferous epithelium cycle. *Hum. Reprod.* 32, 1170–1182. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez064>.
- Park, Y., Cho, M., Ki, C.S., 2009. Correct use of repeated measures analysis of variance. *Korean J. Lab. Med.* 29, 1–9. <https://doi.org/10.3343/kjm.2009.29.1.1>.
- Parrish, J.J., Wüstenberg, K.L., Gibbs, K.M., Yagoda, K.B., Krauskrämer, M.M., Loether, T.M., et al., 2017. Scrotal insulation and sperm production in the boar. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.22841>.
- Pavio, N., Decerd, V., Bagdasarian, E., Johne, R., 2017. Recent knowledge on hepatitis e virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Vet. Res.* <https://doi.org/10.1186/s12867-017-0483-9>.
- Ramesh, R., Pearis, C.A., Al-Tars, E., Esser, J.F., Berger, T., 2007. Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: effect of reducing testicular estrogen synthesis. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.025>.
- Rehm, S., 2000. Spontaneous testicular lesions in purpose-bred beagle dogs. *Toxicol. Pathol.* 28, 782–787. <https://doi.org/10.1177/019262330028006003>.
- Ren, D., King, Y., Lin, M., Wu, Y., Li, K., Li, W., et al., 2009. Evaluation of boar grand development, spermatogenesis with regard to semen characteristics, libido and serum testosterone levels based on large White Duroc × chinese erushian crossbred boars. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 913–919. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01117.x>.
- Smith, L.B., Walker, W.H., 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>.

- Stricker-Kromgrad, A., Shoemaker, C.R., Perera, M.E., Gad, S.C., Brocksmith, D., Bouchard, G.P., 2016. Miniature swine breeds in toxicology and drug safety assessment: what to expect during clinical and pathology evaluations. *Toxicol. Pathol.* **44**, 421–427. <https://doi.org/10.1177/0128233115613327>.
- Swendsen, O., 2006. The minipig in toxicology. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57**, 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2006.03.003>.
- Taberner, E., Navratil, N., Jamin, B., Salerno, M., Grambo, B., Aithouse, G.C., 2016. Pubertal age based on testicular and epididymal histology in Göttingen minipigs. *Theriogenology* **85**, 2091–2095. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.036>.
- Trodeau, V.L., Meijer, J.C., Erkam, J.H., van de Wast, D.P., Wenning, C.J., 1982. Pubertal development in the male pig: effects of treatment with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist on plasma luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone. *Can. J. Vet. Res.* **56**, 102–108.
- Viguera-Villaverde, R.M., Molina-Ovitz, D., Reyes-Torres, G., del Ángel, D.S., Moreno-Mendoza, N.A., Cruz, M.E.G., et al., 2009. Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta Histochem.* **111**, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2008.05.004>.
- Viguera-Villaverde, R.M., Montelongo-Solis, P., Chávez-Saldana, M.D., Gutiérrez-Pérez, O., Arzaga-Silva, M., Rojas-Casasola, J.C., 2013. Postnatal testicular development in the Chinchilla rabbit. *Acta Histochem.* **115**, 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.02.004>.
- Weaver, D.M., Tyler, J.W., Miller, M.A., Shove, M.D., Cowart, K.F., 1999. Bilateral testicular interstitial cell tumour in an aged boar. *Vet. Rec.* **146**, 224. <https://doi.org/10.1136/vr.146.8.224>.
- Zemella, E., Lamtra, D., Wiss, T., Kindsler, J., Ford, J., 1996. Testicular morphology and function in boars differing in concentrations of plasma follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* **65**, 115–118. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.115>.