



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EFECTO DE LA SUPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LA GnRH EN UNA ETAPA  
PREPUBERAL TEMPRANA, SOBRE EL DESARROLLO DEL EPIDÍDIMO DEL  
CERDO”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**ALAN JAIR CONTRERAS ORTIZ**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**Dra. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**COMITÉ TUTOR**

**Dr. ÓSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Dr. Ph.D. HÉCTOR JIMÉNEZ SEVERIANO**  
Maestría y Doctorado en ciencias de la salud y de la producción animal

**MÉXICO D.F. FEBRERO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, Juan Armando Contreras Torres y Gabriela Beatriz Ortiz López, ya que sin sus enseñanzas y todo el amor que hasta la fecha me han brindado no habría sido posible llegar hasta este punto de mi vida profesional.

Los amo y les estaré eternamente agradecido.

## **AGRADECIMIENTOS**

Es difícil para mí este punto porque hay muchas personas a las cuales tengo que agradecer.

Primeramente a mi alma máter La Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la que ha sido mi segunda casa todos estos años, la Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia.

A la Dra. María Elena Trujillo Ortega y al Dr. Oscar Gutiérrez Pérez por haber tenido tanta paciencia a lo largo de todo este proceso y por haberme enseñado todo lo que se de los cerdos. Muchas gracias por todo.

Al Dr. Héctor Jiménez Severiano quien también formo parte de mi comité tutorial. Muchas gracias por todo Dr.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina de la UNAM por facilitarnos sus instalaciones, así como a todo el personal que nos permitió que este proyecto se llevara a cabo.

A mis sinodales por su apoyo para la corrección de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Pediatría, específicamente al laboratorio de Biología de la Reproducción por brindarnos el apoyo para la realización de la parte de laboratorio de esta tesis.

Dentro de este marco quiero agradecer a la Dra. Rosa María Vigueras por todo el apoyo que me brindo durante la parte experimental y la escritura de la Tesis, también al Sr. Pedro quien ya que sin su ayuda todo el proceso de las muestras hubiera sido más complicado, también todos los compañeros y posteriormente amigos que conocí durante estancia en este maravilloso lugar.

De igual forma quiero agradecerle a mi familia por todo el apoyo que me han brindado, y aquí no solo a mis padres sino también a mis hermanos Christian Isaac Contreras Ortiz y Cinthya Vianey Contreras Ortiz, quienes no solo han sido mi familia si no mis cómplices en la vida, los quiero y les agradezco todo su apoyo.

A mis amigos por todos sus consejos y apoyo brindado durante este proceso. Normita aunque llevamos poco de conocernos te has vuelto una amiga invaluable y te agradezco muchísimo tu ayuda y Kary sabes lo mucho que te agradezco todos estos años que has estado a mi lado como mi mejor amiga en “all the world”,

Gabriela Castellanos por todas sus enseñanzas en este proyecto. Y a toda la gente que creyó en mí.

A todos mis amigos de Animal Care Center Barranca, especialmente a mi queridísimo amigo Mauricio Mercado, gracias por todo su apoyo.

A Bastet y a Isis, mis fieles compañeros durante esas noches en vela.

**Trabajo realizado con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIIT), DGAPA-UNAM, con número de Registro IN232211**

**De igual forma presente trabajo fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**

## RESUMEN

El epidídimo es un órgano poco estudiado sin embargo se ha visto que en él se realizan una serie de procesos que inducen la maduración espermática. Su desarrollo está ligado al testicular, el cual comienza desde la vida fetal, y concluye en la pubertad. Una práctica habitual en el cerdo es la castración quirúrgica temprana con la finalidad de inhibir el olor sexual, el cual provee un olor y sabor desagradable a la carne de cerdo. La inmunocastración es la alternativa que ofrece un mayor bienestar animal evitando este olor sexual. Consiste en la administración de una forma modificada de la GnRH para inhibir al eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Debido al período postnatal de proliferación de células testiculares presente en el cerdo, un protocolo de administración temprana es sugerido para inhibir el olor sexual. El objetivo de este estudio fue analizar los efectos de la inmunocastración temprana en cerdos sobre la histomorfología, el perfil hormonal y la proliferación celular de las 3 regiones del epitelio epididimal (cabeza, cuerpo y cola) comparada con animales inmunocastrados de manera convencional. Un total de 42 cerdos de raza híbrida terminal fueron designados en tres grupos de experimentación: control (no inmunocastrados), experimental (inmunocastración temprana, semana 3 y 11 de edad,) y convencional (semana 10 y 16 de edad). A las 4, 16, 20 y 24 semanas de edad fueron castrados para la toma de muestras de epidídimo. A las 24 semanas se encontró que el ancho epitelial de la cola y la longitud de los estereocilios de la cabeza del epidídimo del grupo experimental son mayores que las del control. A esta misma edad el grupo control tiene una mayor inmunoreactividad de células sensibles a andrógenos que el experimental pero no hay diferencia con el grupo convencional. A las 20 semanas se observó que el área epitelial del control fue más grande que las de los otros 2 grupos y a las 16 semanas encontramos que el convencional tiene una mayor cantidad de células inmunoreactivas a PCNA que los otros dos grupos. Se concluye que la aplicación temprana de la vacuna contra GnRH provoca el retraso en el desarrollo del epitelio del epidídimo de cerdo.

**Palabras clave:** *Epidídimo, receptores a andrógenos, PCNA, olor sexual, inmunocastración, desarrollo epididimal.*

## **ABSTRACT**

The epididymis is an organ with no enough studies, nevertheless it's an area where a series of procedures takes place that leads sperm maturation. Its development is related to testicular growing, which starts since fetal life, and concludes at puberty. A current practice in the pig, is the early surgical castration with boar taint inhibition as an objective because provokes unpleasant smell and taste in pig's meat. Immunocastration is an alternative that offers better animal welfare avoiding boar taint. It consists in one administration of modified GnRH to inhibit hypothalamic-pituitary-testicular axis. Due to postnatal period of present testicular cell proliferation in pigs, is suggested a protocol of early administration to inhibit boar taint. The objective of this study was analyzing early immunocastration in pigs on histomorphology, hormonal profile and cell proliferation of three areas of epididymal epithelium (head, body and tail) compared with conventionally immunocastrated animals. A total of 42 pigs of terminal hybrid race were appointed in three experimental groups: control (no immunocastrated), experimental (early immunocastration, 3 and 11 week old) and conventional (week 10 and 16 years old). At 4, 16, 20 and 24 weeks of age were castrated for sampling epididymis. At 24th week, we found that epithelial tail width and length of the stereocilia of epididymis head from experimental group were greater than the control. At this same age we found that control group has a higher immunoreactivity of androgen-sensitive cells that experimental but there's no difference with the conventional group. At 20 weeks the epithelial control area was larger than those of the other two groups and at 16 weeks we found that the conventional has a greater amount of immunoreactive cells to PCNA than the other two groups. It is concluded that early implementation of GnRH vaccine causes developmental delay of pig epididymal epithelium.

**KEYWORDS:** *Epididymis, androgen receptors, PCNA, boar taint, immunocastration, epididymis development.*

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	1
1.1. Epidídimo	1
1.2. Desarrollo de los órganos sexuales	1
1.3. Andrógenos	6
1.4. Receptores a andrógenos	7
1.5. Factor de proliferación celular (PCNA)	8
1.6. Sabor u olor a macho no castrado	8
1.7. Tipos de castración	10
1.7.1. Orquiectomía (castración quirúrgica)	10
1.7.2. Castración inmunológica	11
<b>2. Justificación</b>	13
<b>3. Hipótesis</b>	13
<b>4. Objetivos</b>	14
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivos específicos	14
<b>5. Material y métodos</b>	14
5.1. Ubicación del estudio	14
5.2. Animales	15
5.3. Protocolo de inmunocastración temprana y formación de grupos experimentales	15
5.4. Método de castración	17
5.5. Procesamiento de las muestras	18
5.6. Detección de receptores a andrógenos (AR) y factor de proliferación celular (PCNA)	19
5.7. Método estadístico	20
<b>6. Resultados</b>	23
6.1. Mediciones histomorfológicas del epitelio epididimal	23
6.2. Determinación de receptores a andrógenos	27
6.3. Detección de receptores a PCNA	31
<b>7. Discusión</b>	32
<b>8. Conclusión</b>	35
<b>9. Literatura citada</b>	36
<b>10. Anexos</b>	43
10.1. Anexo I	43
10.2. Anexo II	44
10.3. Anexo III	45
10.4. Anexo IV	45
10.5. Anexo V	47

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.-Epidídimo**

Durante mucho tiempo el epidídimo fue un órgano poco estudiado, siendo reconocido como un reservorio de espermatozoides; sin embargo en estudios recientes se ha visto que no es su única función ya que en él se llevan a cabo una serie de procesos indispensables que le permiten al espermatozoide ser capaz de fecundar al ovocito (Hafez, 2002; Robaire, 2006).

### **1.2- Desarrollo de los órganos sexuales**

Para poder hablar del desarrollo del epidídimo es necesario primero referirse al desarrollo testicular el cual comienza en la etapa fetal una vez que se establece la diferenciación sexual debido a la activación del gen Sry, ubicado en el brazo corto del cromosoma Y, que es el lugar donde se encuentra toda la información necesaria para encaminar al producto a convertirse en macho (Swain, 2006).

Desde el alantoides migran las células primordiales hacia la cresta genital donde se encuentran las células somáticas, las cuales provienen del mesonefros, el conjunto de estos dos tipos celulares darán como resultado la formación de la gónada, en este caso el testículo (Swain, 2006). Las primeras en diferenciarse son las células de Sertoli, que en la situación particular del cerdo es alrededor de los 26 días de gestación (McCoard, 2000), dichas células tienen un papel fundamental durante la diferenciación testicular ya que durante la etapa temprana del desarrollo estas se encargan de secretar la hormona anti-Mülleriana (AHM) la cual tiene como objetivo suprimir a los conductos femeninos, mejor conocidos como conductos de Müller, permitiendo el desarrollo de los conductos masculinos, que también son conocidos como mesonéfricos o de Wolff (Hafez, 2002).

El epidídimo se desarrolla a partir de estos últimos los cuales se originan del mesoderma intermedio (Franca, 2005). El desarrollo de estos conductos está dividido en dos fases, la primera es cuando se mantienen los conductos Wolff y se

eliminan los de Müller, y la segunda consiste en la elongación de los túbulos así como su diferenciación, tanto morfológica como histológica, entre lo que serán el epidídimo y el conducto deferente; creando un cordón de células para culminar en la formación de un túbulo; el cual posteriormente se comienza a enrollar con dobleces de 180° para quedar en su acomodo final. Para que todos estos procesos se realicen es necesaria la presencia de andrógenos (principalmente de la testosterona) los cuales provienen de las células de Leydig del testículo fetal (Robaire, 2006; Shaw, 2014).

El desarrollo postnatal de los órganos reproductivos del cerdo, a nivel testicular, está regulado por la acción hormonal que ejercen principalmente las células de Leydig, en las que se han detectado tres periodos de desarrollo: el primero se da aún en la etapa fetal en la cual ayuda al desarrollo del tracto reproductor masculino alrededor de los 30 a 60 días de gestación, la segunda tiene lugar en el periodo postnatal en donde se ve un recambio total de las células de Leydig en el testículo de cerdo alrededor de la 4° a 5° semana de vida, y la tercera se presenta previo a la pubertad aproximadamente entre las 12 y 16 semanas en donde se encargan del desarrollo y mantenimiento de la funcionalidad de los órganos sexuales masculinos; durante las tres etapas hay un aumento considerable tanto en los receptores a la hormona luteinizante (LH) como en la cantidad de células de Leydig (Straaten, 1978; Franc, 2000).

Otro tipo celular indispensable en el testículo son las células de Sertoli, la cuales son las encargadas de mantener la espermatogénesis una vez comenzada la pubertad, estas tienen dos fases de proliferación: la primera tiene lugar desde el desarrollo fetal, alrededor de los 100 días de gestación y hasta aproximadamente un mes después del nacimiento cuando su número, por gramo de testículo, aumenta hasta siete veces y la segunda se da entre las 13 y 16 semanas de edad, periodo que coincide con un aumento en la hormona folículo estimulante (FSH) a nivel sanguíneo y un aumento de hasta seis veces en el largo de los túbulos seminíferos (McCoard, 2000; Franca, 2005).

Después del nacimiento el desarrollo del epidídimo es regulado por la testosterona secretada durante el desarrollo testicular, el cual como ya mencionamos se presenta tempranamente durante la etapa embrionaria; el epidídimo transcurre por tres periodos de desarrollo, el periodo indiferenciado, donde se terminan de enrollar los túbulos de la cabeza y cuerpo del epidídimo, aproximadamente a las cuatro semanas de edad; el de diferenciación que es cuando se distinguen los tipos celulares que conforman el epitelio epididimal y el de expansión, que consiste en completar su crecimiento así como el establecimiento de la funcionalidad de la barrera hematoepididimal con lo que el este órgano concreta su maduración, siendo esto hasta la pubertad que tiene lugar alrededor de las 20-24 semanas (Hafez, 2002; Robaire, 2006).

Anatómicamente el epidídimo se encuentra cubierto por dos túnicas, la vaginal y la albugínea. Posee una cabeza formada por 13 a 20 túbulos ondulados que se agrupan en lóbulos. Los túbulos de un lóbulo se unen para formar un simple tubo y de la unión de varios lóbulos se origina el conducto del epidídimo el cual concluye en la unión con el conducto deferente (Shaw, 2014). El epidídimo está formado por diversas regiones altamente especializadas y con microambientes muy específicos a lo largo de todo su lumen, se divide en tres macrorregiones que son: cabeza, cuerpo y cola; las cuales a su vez se encuentran subdivididas, la cabeza en cuatro, el cuerpo en tres y cola en dos regiones, teniendo entre la cola y el cuerpo una válvula que no permite retroceder a los espermatozoides (Robaire, 2006). La principal función de la cabeza y el cuerpo es la de proporcionar un ambiente adecuado para la maduración espermática, mientras que la cola se encarga del almacenamiento de los espermatozoides maduros.

En el cerdo la localización del epidídimo es en el borde testicular de manera cráneo-dorsal y una vez desplegados los lóbulos tiene una longitud de 17 a 18 m, aunque si se extiende toda la red tubular se pueden llegar a alcanzar hasta los 50 a 100 m de largo (Franca, 2005).

Todo este desarrollo tiene la finalidad de crear las condiciones adecuadas que permitan la maduración espermática, la cual no finaliza con la espermiación (culminación de la espermatogénesis), sino que requiere toda una serie de procesos que se realizan a través del tránsito epididimal (Avenel, 2010).

Los principales cambios fisiológicos del espermatozoide durante su paso por el epidídimo son:

- Aumento en la concentración espermática por pérdida de agua
- Pérdida de la gota citoplasmática
- Adquisición de motilidad independiente
- Adquisición de capacidad fecundante.
- Condensación nuclear
- Maduración del acrosoma.

Al mismo tiempo el epidídimo servirá para el transporte, protección y almacenamiento de los espermatozoides hasta su eyaculación (Bassols, 2005; Fàbrega, 2011).

La función epididimal se encuentra regulada principalmente por los andrógenos, aunque se tiene evidencia de que elementos como algunos factores de crecimiento, los estrógenos y otras sustancias provenientes directamente del testículo participan de manera específica en algunos procesos de secreción activa, así como absorción de agua, iones y solutos orgánicos (Pearl, 2007; Murashima, 2015).

La falta de andrógenos (debida orquiectomía de manera experimental) induce una oleada apoptótica que comienza en el segmento inicial llegando a las células de la cauda algunos días después y parece ser que esta cascada es regulada a través de la vía Fas ligando. En esta vía están involucrados el receptor Fas o también llamado Apo-1, este es un miembro de la superfamilia de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF). Cuando el antígeno de membrana Fas se une con su ligando y

con anticuerpos antagonistas se produce la señal para el desencadenamiento de la apoptosis (Arango, 1997).

También se reportan cambios morfológicos a nivel epitelial como una disminución en el diámetro luminal y en el epitelio celular del ducto epididimal con un incremento en el estroma; además se reporta pérdida de estereocilios, desaparición de retículo endoplásmico, acumulación de lisosomas, vacuolización y desaparición de gránulos de secreción en las células principales que son el tipo celular del epitelio epididimal más afectado por la privación de andrógenos inducida por orquiectomía (Bassols, 2005).

El epitelio epididimal cuenta con varios tipos celulares a lo largo de todo su trayecto los cuales son:

➤ Células principales: son las más abundantes y cuentan con una maquinaria endocítica y excretora muy desarrollada, presentando estereocilios que aumentan su superficie de contacto y un núcleo alineado en su parte basal (Figura 1 A).

➤ Células apicales: se encuentran desde el segmento inicial hasta la parte intermedia del cuerpo. Su núcleo es esférico y no

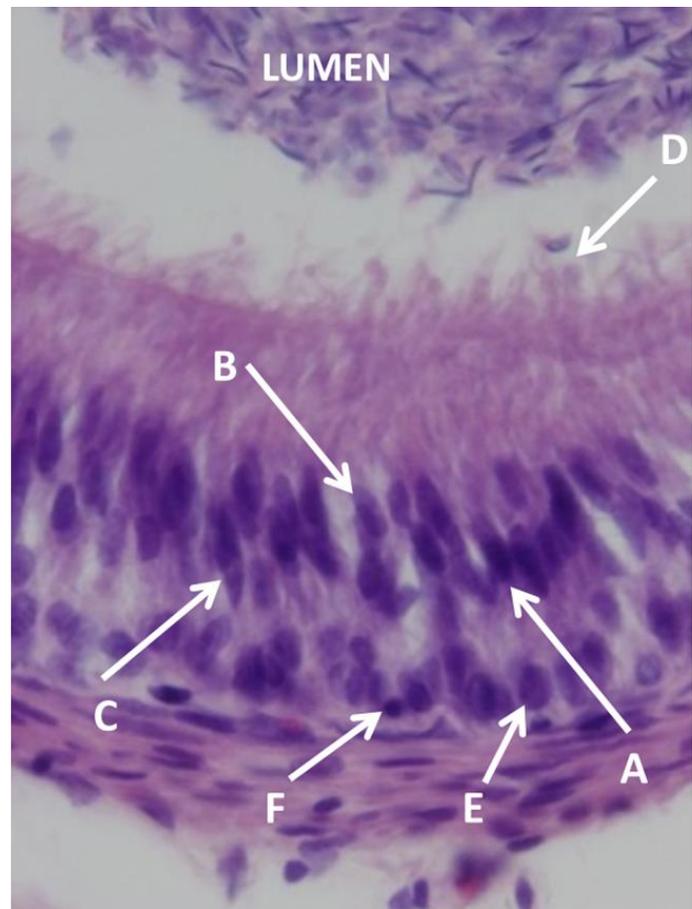


Figura 1.- Corte histológico de cabeza de epidídimo de cerdo teñido en H-E de 24 semanas de edad con objetivo de 60x A).- Células principales, B) .- Células apicales, C).- Células Alargadas, D).- Gránulos de secreción de células claras, E).- Células Basales, F).- Células Halo (Contreras-Ortiz, 2016)

están en contacto con la membrana basal, son endocíticas y poseen gran variedad de enzimas proteolíticas (Figura 1 B).

- Células alargadas: sólo se encuentran entre el segmento inicial y la zona intermedia, participan en la secreción de hidrogeniones y expresan regiones proteicas específicas que contienen glutation-transferasas y enzimas lisosomales (Figura 1 C).
- Células claras: se presentan en cabeza, cuerpo y cola; se caracterizan por su región apical que contiene numerosas vesículas, endosomas, lisosomas y un número variable de gotas lipídicas cerca del núcleo el cual es basal. Su función principal es endocítica y participan en la desaparición de la gota citoplasmática del espermatozoide y en la absorción de otras proteínas. También se ha propuesto que participan en la acidificación del medio epididimal (Figura 1 D).
- Células basales: están en contacto con la membrana basal y son semiesféricas, se propone que poseen receptores endocíticos mediados que absorben sustancias secretadas por las células principales o que atraviesan la barrera hematoepididimal. Algunos autores suponen que estas participan como células inmunes y parecen tener un origen extratubular (Figura 1 E).
- Células Halo: son pequeñas, redondas con un citoplasma muy claro, presentes a todo lo largo del epitelio y son consideradas las principales células inmunes del epidídimo (Figura 1 F) (Franca, 2005; Robaire, 2006; Shih-Hsing, 2014).

### 1.3- Andrógenos

La espermatogénesis, que tiene lugar en el testículo, así como la maduración final del espermatozoide, que se lleva a cabo en el epidídimo; son procesos totalmente dependientes de andrógenos, los cuales para poder realizar su función requieren de la activación de su receptor; la cantidad existente de estos en la célula depende de la autorregulación de dicho complejo hormonal (Li-Ji, 2000).

El proceso de liberación de andrógenos comienza en el hipotálamo, el cual se encarga de producir de forma pulsátil la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), esta hormona es un decapeptido lineal que tiene como objetivo estimular a la Hipófisis, específicamente en el lóbulo anterior, para que libere a las gonadotropinas que son la LH y FSH estas hormonas son de naturaleza glicoprotéica y su principal función en el verraco es ejercer un estímulo sobre sus células blanco, FSH sobre Sertoli, y LH sobre Leydig, a esta serie de pasos se le conoce como el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo (H-H-T) (Blake, 1995; Claus, 2008; Einarsson, 2011)

Dentro de los principales andrógenos secretados por el testículo tenemos a la androstenona, dihidrotestosterona, y testosterona; esta última es el andrógeno más importante dentro de esta familia de hormonas, se producen en las células de Leydig una vez que son estimuladas por la LH, y tiene acción autocrina, paracrina y exocrina (Smitha, 2014).

#### **1.4.- Receptores a andrógenos**

La señalización de las hormonas sexuales masculinas se da a través de los receptores a andrógenos (AR) los cuales pertenecen a la súper familia de receptores nucleares (Murashima 2015), estos son los únicos receptores identificados para los andrógenos hasta el momento; se encuentran en varios órganos a nivel nuclear con un peso de 110kD (Smitha, 2014) los cuales al ser estimulados por la hormona correspondiente se encargan de mandar la señal para activar o inhibir procesos, por ejemplo en el riñón aviar aumentan los niveles de ARNm mientras que en el hígado los disminuyen, pero donde se encuentran en mayor cantidad es en las células de Sertoli, Leydig y células mioideas peritubulares del testículo así como en las células del estroma y epiteliales del epidídimo(Li-Ji, 2000; Smitha, 2014)

### **1.5.-Factor de proliferación celular (PCNA)**

El Antígeno de Proliferación celular es una proteína homotrimérica de 36 kDa que funciona como un marcador del ciclo celular, tiene participación primordial en la síntesis de ADN de los mamíferos, apareciendo durante la fase tardía de G1 y la fase S del ciclo celular por lo que se encuentra en zonas donde se está realizando la síntesis de ADN en células que se encuentran en proliferación celular activa. (Torres-Bernal, 2006)

Su conformación trimérica le da una forma de anillo lo que le permite deslizarse libremente durante la duplicación del material genético, así mismo tiene un papel importante en la maquinaria de reparación de ADN, además funciona como una plataforma móvil que ayuda a estabilizar las interacciones con una amplia gama de enzimas. Es tal su importancia que cuando el PCNA no está presente o su forma constitucional cambia, por ejemplo no formando trímeros, no consigue estimular a la ADN-polimerasa, o falla al momento de ensamblarse con el ADN, esto se traduce en el paro total del ciclo celular. (De Chiara, 2013, Evison, 2014; Hakan, 2015)

### **1.6.- Sabor u olor a macho no castrado**

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, 2008). Sin embargo el sabor aportado por “el olor sexual” o “*boar taint*” a la carne del cerdo no castrado limitan su explotación (Robaire, 2006; Einarsson, 2011).

La dieta habitual del verraco incluye al triptófano el cuál es un aminoácido esencial de tipo aromático, cuando este llega al intestino de cerdo se descompone debido a la acción enzimática de diferentes bacterias en el colon del animal, teniendo como primer paso una desaminación, lo cual da como resultado el indolpiruvato, este tiene dos vertientes: si se elimina el piruvato se convierte en indol (uno de los componentes del olor y sabor a macho), pero si ocurre una descarboxilación se

convierte en ácido indolacético; posteriormente tiene una segunda descarboxilación culminando en la formación de 3-metilindol o mejor conocido como escatol, el cual junto con la androstenona son los principales causantes del olor sexual (Figura 2) (Mogens, 1995; Zamaratskaia, 2004).

El escatol puede tener dos caminos, una parte es expulsada en las heces y la otra es reabsorbida por el epitelio intestinal, cuando esto sucede debe pasar por el hígado, aquí debe ser degradado para ser eliminado por la orina pero debido a la acción que ejerce la androstenona sobre la enzimas hepáticas este proceso no se lleva cabo y en vez de ser eliminado se acumula en la grasa (Deslandes, 2001; Oskam, 2010; Wicks, 2013)

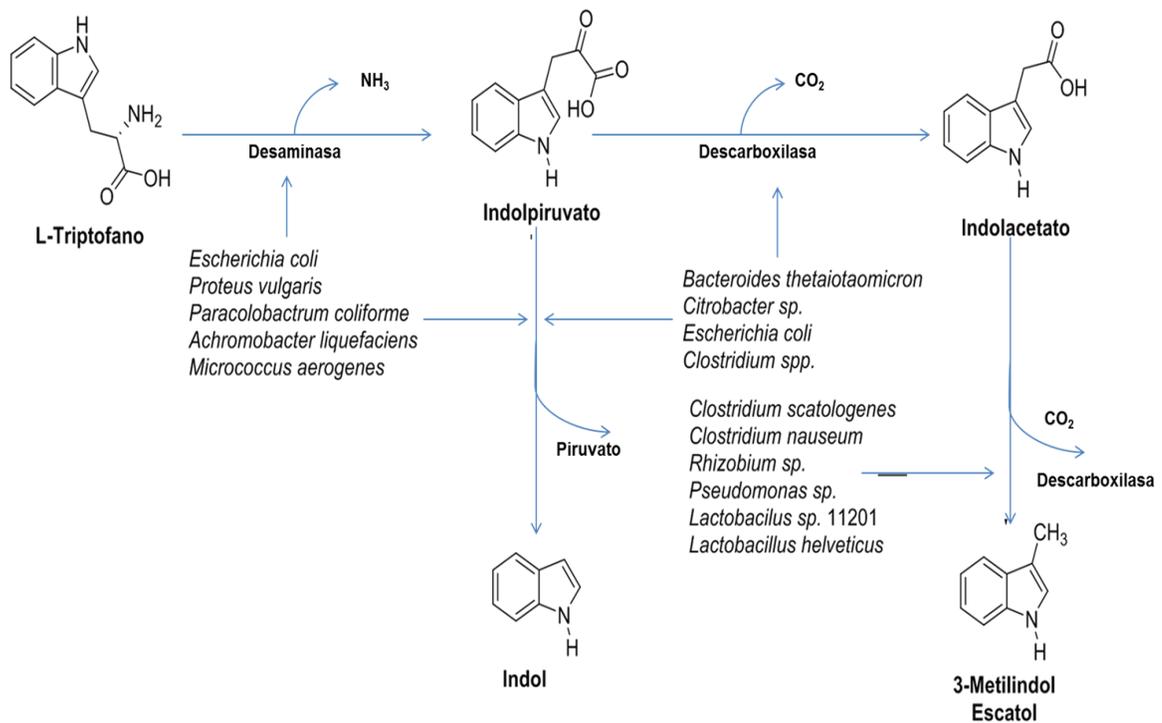


Figura 2.- Fermentación bacteriana del triptófano para formación de Indol y Escatol (Contreras-Ortiz, 2016)

Por otro lado, la androstenona es un esteroide derivado de la testosterona que tiene un papel como feromona y es producida en el testículo del cerdo, por la células intersticiales (Leydig), cuando esta hormona junto con el escatol se

acumula en la grasa del animal tenemos como resultado el *boar taint*. (Oskam, 2010; Chen G, 2015).

Si bien hay estudios que demuestran que estrategias como la formulación de dietas especiales (como evitar la ingesta excesiva de triptófano), (Deslandes, 2001) la selección genética en base a marcadores específicos (Robic, 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 quirúrgica de los machos destinados a la engorda. (Claus, 2008; Wicks, 2013).

Por otro lado, 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, han encaminado al desarrollo de nuevas técnicas que permitan tener una mejor producción evitando lo más posible el dolor y sufrimiento a los animales, por lo que se han buscado diferentes técnicas que cumplan con dichos requisitos, entre estas se encuentra la castración inmunológica o inmunocastración, la cual es una opción viable para tales fines (Lonardi, 2015).

## **1.7.- Tipos de castración**

Actualmente se cuentan con dos métodos de castración en cerdos, una es la castración quirúrgica u orquiectomía y la segunda es la castración inmunológica para la cual se emplean productos como Improvac®

### **1.7.1.-Orquiectomía (Castración quirúrgica)**

Esta es la técnica que consiste en la extirpación total de los testículos y se realiza en el cerdo por dos razones principalmente, una es tener un animal más dócil y la más importante, para evitar el “olor sexual” consiguiendo con esto una mejor calidad en la carne (Lonardi, 2015).

La cirugía se puede realizar a cualquier edad, aunque cuando son animales para engorda se recomienda que sea lo más jóvenes posible, siendo esto los primeros días de vida con una previa anestesia local. Cuando esta técnica se realiza a una edad mayor es necesaria la aplicación de un sedante y preferentemente de un anestésico de corta duración. El uso de estos medicamentos eleva los costos, por lo que algunos productores evitan su uso ocasionando un gran dolor y sufrimiento al animal (Hansson, 2011). Por otro lado el simple hecho de realizar un procedimiento quirúrgico conlleva ciertos riesgos como el de una posible infección debido a un mal manejo post operatorio lo que nos puede conducir, en casos muy severos, a la muerte del cerdo (Brunius, 2011).

### **1.7.2.-Castración inmunológica con Improvac®**

#### El modo de acción de la vacuna anti-GnRH

El Improvac®, es un producto comercial que actualmente se encuentra en el mercado para la inmunocastración en cerdos. Esto consiste en inmunizar a los machos enteros contra la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH); este producto contiene como sustancia activa un péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria y un adyuvante acuoso (Pfizer Animal Health).

Esta vacuna resulta ser un compuesto totalmente libre de acción farmacológica u hormonal que inhibe el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo (H-H-T) al producir elevadas concentraciones de anticuerpos contra la GnRH lo que provoca una disminución considerable en los niveles séricos de LH y FSH las cuales tienen acción sobre las células de Leydig y Sertoli respectivamente (Figura 3) (Einarsson, 2009), por lo que la aplicación de dicho producto provoca que las células de Leydig no puedan producir testosterona adecuadamente, bloqueando el desarrollo de los órganos reproductivos como lo son los testículos, epidídimos y las glándulas accesorias (Pfizer Animal Health, Brunius, 2011).

A pesar del descenso en la producción de testosterona, es posible mantener una parte considerable del potencial anabólico de los cerdos en crecimiento (Lonardi, 2015). Más aún, al suspender el fármaco, con el tiempo el funcionamiento y tamaño testicular regresan, por lo que si se pasa la fecha de sacrificio del animal el *boar taint* puede aparecer (Zamaratskaia, 2004; Oskam, 2010).

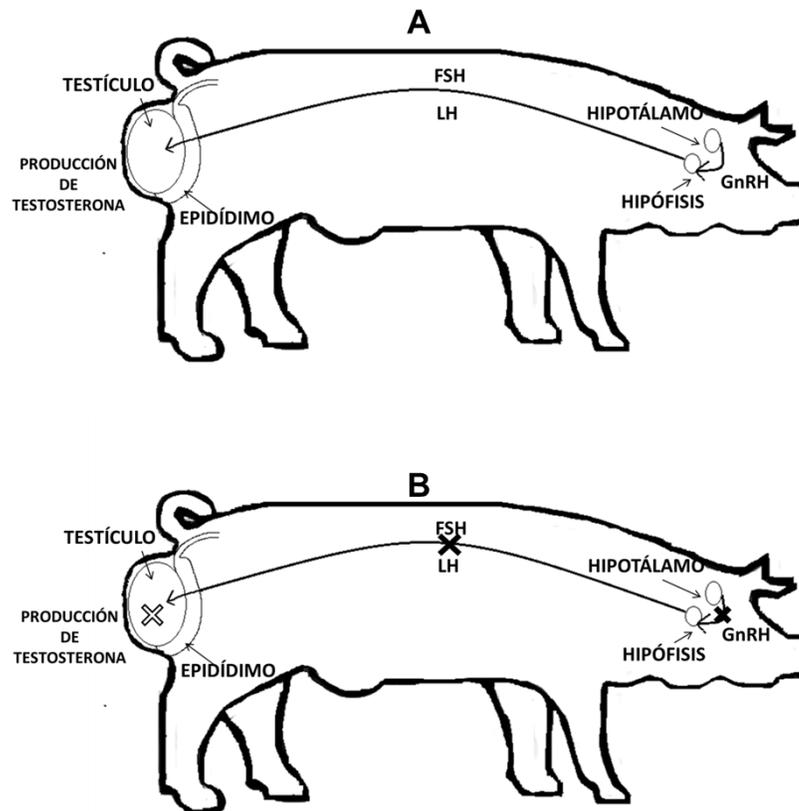


Figura 3.- Efecto de la inmunocastración  
 A).- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo sin alteración  
 B).- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo bloqueado por Improvac®  
 (Contreras-Ortiz, 2016)

La aplicación recomendada por el fabricante del producto es una primera dosis después de las 8 semanas de edad, con una segunda aplicación al menos 4 semanas posteriores y el sacrificio de los cerdos a la cuarta o quinta semana de aplicada la segunda dosis (Wicks, 2013).

Se ha reportado que la aplicación de Improvac® siguiendo dicho protocolo, 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, 2011), en cuanto al epidídimo se reportan alteraciones en los espermatozoides obtenidos de la cola (Einarsson, 2011), pero no existen antecedentes de los cambios inducidos en el epitelio epididimal después de la vacunación contra GnRH y tampoco reportes del efecto de una vacunación más temprana.

Siendo el epidídimo un órgano dependiente de andrógenos, el bloqueo del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo mediante Improvac® muy probablemente inducirá alteraciones en la morfología y funcionalidad del epitelio epididimal

## **2.- JUSTIFICACIÓN**

A pesar de la gran importancia del epidídimo en la maduración espermática, existe poca información acerca de su crecimiento y desarrollo, específicamente en la dinámica de presencia/ausencia de receptores en células sensibles a andrógenos (AR) y del factor de proliferación celular (PCNA), así como el efecto de estos en la histomorfología que se manifiesta durante el tratamiento de cerdos inmunocastrados. Es por ello que este estudio pretende ampliar el conocimiento en dicha dinámica de desarrollo comparando el efecto supresor de andrógenos de la vacuna contra GnRH aplicada tempranamente contra la aplicación convencional, permitiéndonos profundizar en la estructura de los mecanismos de control y regulación de la maduración del epidídimo de cerdo.

## **3.- HIPÓTESIS**

El efecto de una vacunación temprana contra GnRH, que coincida con un periodo de establecimiento y diferenciación de poblaciones celulares testiculares, tendrá un efecto más contundente que en un esquema de vacunación convencional en el desarrollo del epidídimo de cerdo

## **4.- OBJETIVOS**

### **4.1.- Objetivo general**

Comparar el efecto en la dinámica de desarrollo del epitelio epididimal en cerdos en crecimiento con la aplicación temprana de Improvac® en comparación con un tratamiento convencional.

### **4.2.- Objetivos específicos**

- Comparar mediante mediciones histomorfológicas, si se presentan diferencias en el desarrollo del epitelio del epidídimo en muestras de ambos protocolos de inmunocastración como un criterio de daño ocasionado por la deficiencia de andrógenos.
- Comparar en ambos protocolos de inmunocastración, posibles diferencias en la inmunoreactividad a los receptores de andrógenos (AR), como un índice de deficiencia de testosterona en el epitelio epididimal.
- Comparar la inmunoreactividad al anticuerpo de proliferación celular (PCNA) presente en el epitelio epididimal bajo cada uno de los dos protocolos de inmunocastración, como indicativo de disminución en la proliferación celular.

## **5.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1.- Ubicación del estudio**

El alojamiento, mantenimiento, crecimiento y tratamiento de los animales se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en el municipio de Jilotepec, Estado de México.

Este centro utiliza la castración quirúrgica en los primeros días de vida (entre 3 y 5 días de edad) como práctica cotidiana y tiene una edad de sacrificio promedio de 20 semanas (168 días).

## **5.2.-Animales**

El presente estudio se llevó a cabo con cerdos de raza híbrida terminal y se mantuvieron en las mismas condiciones que los demás animales dentro de la granja, sin ningún cambio ambiental o de alojamiento respecto a los animales ajenos a la experimentación, o entre grupos experimentales.

## **5.3 Protocolo de inmunocastración temprana y formación de grupos experimentales**

Al nacimiento, se seleccionaron 42 cerdos machos para no ser castrados quirúrgicamente en los primeros días de vida. Cada animal fue identificado mediante arete de plástico y asignado al azar en tres grupos experimentales:

\* Grupo 1 (Inmunocastración convencional).- se formó con 10 animales a los que se les aplicó dos dosis (2 ml cada una), de la vacuna anti-GnRH (Improvac®) mediante una inyección subcutánea bajo el pabellón de la oreja. La primera aplicación se realizó a las 10 semanas y la segunda a las 16 semanas de edad.

\* Grupo 2 (Inmunocastración experimental).- se formó con 16 animales a los que se les aplicó dos dosis (2 ml cada una), de la vacuna anti GnRH (Improvac®) mediante una inyección subcutánea bajo la oreja. La primera aplicación se realizó a las 3 semanas y la segunda a las 11 semanas de edad.

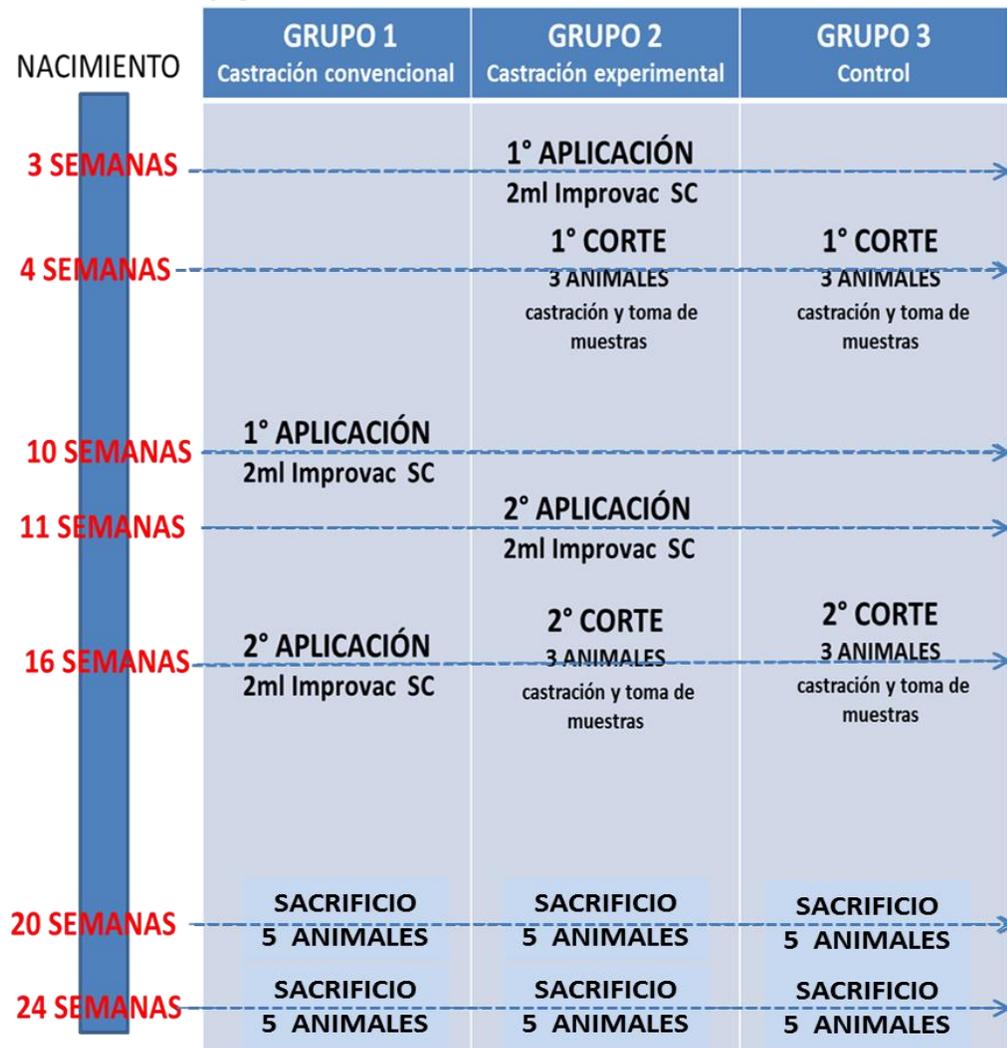
\* Grupo 3 (Control).- Constó de 16 animales a los que se les aplicó dos dosis (2 ml cada una), de un placebo, en este caso SSF, mediante una inyección subcutánea bajo la oreja. La primera aplicación se realizó a las 3 semanas y la segunda a las 11 semanas de edad.

La primera fecha de corte se realizó a las 4 semanas de edad, se escogieron al azar 6 animales del Grupo 2 y 3 (tres de cada uno respectivamente) y fueron sometidos a orquiectomía.

La segunda fecha de corte se realizó a las 16 semanas de edad. Todos los procedimientos realizados en el primer corte se repitieron en este lote, con 6 animales escogidos al azar, de igual forma 3 del grupo 2 y 3 del grupo 3. Posterior a la orquidectomía los animales regresaron a la línea de producción.

La última etapa de corte coincidió con edad del sacrificio el cual, se realizó en dos etapas debido a cuestiones de comercialización de la granja: una a las 20 y otra a las 24 semanas de edad; sacrificando 15 animales en la primera etapa (5 de cada grupo experimental) y 13 animales en la segunda (por motivos ajenos al estudio se extraviaron 2 animales) (cuadro 1).

Cuadro 1.- Flujograma de actividades



#### 5.4.- Métodos de castración

Los animales fueron castrados de la siguiente forma.

- Se premedicó con un tranquilizante, (Azaperona a una dosis de 2.2mg/kg IM profunda) y se dejó actuar por 20 minutos
- Se aplicó el anestésico (Zoletil® a dosis de 0.4 a 0.7ml IM)
- Una vez medicado y sujetado el animal se realizó un lavado en la zona escrotal
- Se realizó un corte sobre el rafe medio al tiempo que se empujaban los testículos de forma ventral
- Se hicieron cortes en la túnica albugínea y vaginal para exteriorizar el testículo
- Posteriormente se suturó el paquete testicular con hilo de algodón desinfectado y se cortó.
- Se repitió lo mismo con el otro testículo y se dejó abierta la herida para evitar lo más posible el edema.
- Se aplicó de forma intramuscular bencilpenicilina procaínica, dihidroestreptomicina y dexametasona (Dexabiopen®) como antibiótico y analgésico a una dosis de 1ml/10 kg de peso
- Una vez pasado el efecto del anestésico se regresaron a la línea de producción.

El epidídimo fue retirado de los testículos, estos últimos se destinaron para otra investigación alterna sobre el efecto de la vacunación anti- GnRH prepuberal temprana sobre el aparato reproductor del macho. Se tomaron muestras pares de cada una de las regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), por animal.

## **5.5.- Procesamiento de las muestras**

El procesamiento de las muestras para inmunohistoquímica e histomorfología, se realizó en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la torre de investigación “Dr. Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

## **5.6.- Mediciones histomorfológicas del epitelio epididimal en muestras contrastadas con la tinción hematoxilina – eosina (H-E)**

Para este estudio las muestras de epidídimo fueron procesadas de la siguiente manera:

- I. Se tomaron los cortes antes mencionados de aproximadamente 0.5cm<sup>2</sup> los cuales se fijaron en paraformaldehído al 4% como un mínimo de 2 horas, debido a que no era posible procesar las muestras el mismo día a las 24 horas se realizaron tres lavados en solución PBS de 10 minutos cada una.
- II. Posteriormente se realizó su inclusión en parafina, para esto se necesitó dejar las muestras previamente en un ciclo de 18 horas en el Histoquinete.
- III. Una vez teniendo el tejido en parafina se realizaron cortes de 5µm de grosor y se montaron en laminillas gelatinizadas.
- IV. Una vez teniendo las laminillas montadas se procedió a desparafinar:
  - a. Xilol 1 15 minutos (2 cambios)
  - b. Xilol 2 15 minutos (2 cambios)
- V. Ya desparafinadas se procedió a hidratar las muestras en el tren de alcoholes:
  - a. Etanol-Xilol 5 minutos
  - b. Etanol 100% 5 minutos
  - c. Etanol 96% 5 minutos
  - d. Etanol 80% 5 minutos
  - e. Etanol 70% 5 minutos
  - f. Agua destilada 5 minutos

- VI. Una vez hidratadas las muestras se colocaron en Hematoxilina de 5 a 10 minutos
- VII. Trascurrido este tiempo se lavó por agitación en agua destilada
- VIII. Después se lavaron en agua corriente durante 15 minutos
- IX. Pasado este tiempo se volvió a lavar con agua destilada unos segundos
- X. Una vez hecho esto fueron dejadas las muestras en Etanol al 70% por 3 minutos
- XI. Posteriormente se colocaron en eosina 10 minutos
- XII. Pasado este tiempo se procedió a nuevamente deshidratar la muestra en los trenes de alcoholes
  - a. Etanol 70%: 2 minutos
  - b. Etanol 80%: 5 minutos
  - c. Etanol 96%: 5 minutos (2 veces)
  - d. Etanol 100%: 5 minutos
  - e. Etanol-Xilol: 3 minutos (2 veces)
  - f. Xilol 1: 3 minutos
- XIII. Y para concluir se realizó el montaje con resina entellan.

Se hicieron 3 tipos de mediciones en campo de 20X de las cabezas cuerpos y colas de los epidídimos para cada uno de los animales, de la siguiente manera:

- A. Área epitelial: se midió el área total del epitelio de los túbulos, a este se le restaron el área de la luz la cual se considera como el espacio sobrante al término de los estereocílios de cada túbulo.
- B. Ancho del epitelio: este se contó como la porción comprendida entre el estroma del túbulo y el comienzo de los estereocílios de cada porción
- C. Largo de los estereocílios: esta medida se tomó desde el final del epitelio y el comienzo de la luz del túbulo.

Se midió la mayor cantidad de túbulos posible, considerando en los criterios b y c cuatro medidas por cada túbulo de forma aleatoria.

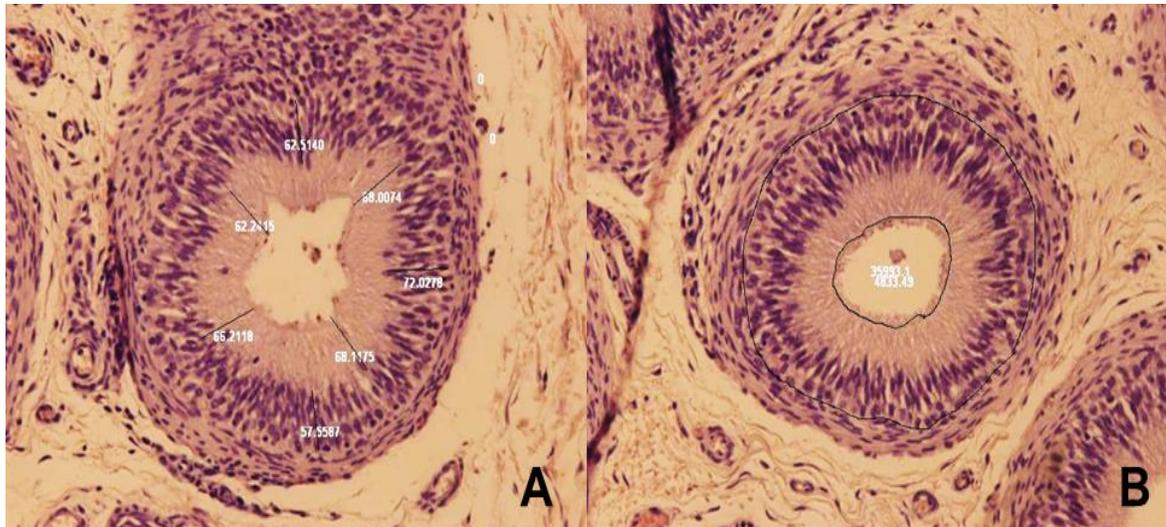


Figura 4.- A.-Forma de medición del ancho epitelial y del largo de los estereocilios  
 B.- Forma de medición del área epitelial (Contreras-Ortiz, 2016)

### 5.7.- Detección de receptores a andrógenos (AR) y factor de proliferación celular (PCNA).

La expresión de AR en el epitelio epididimal se determinó por la inmunohistoquímica del antígeno AR (Sta. Cruz sc-816 rabbit) mientras que para la de PCNA se ocupó el antígeno PCNA (Sta Cruz sc-56 rabbit)

- I. Se ocuparon muestras de tejido montadas en laminillas cubiertas con gelatina al igual que para la tinción H-E
- II. Las muestras se desparafinaron de la siguiente manera
  - A. Se dejaron en la estufa a 60°C por 30 minutos
  - B. Al pasar este tiempo se procedió a la hidratación del tejido con pases por alcoholes a diferente concentración
    1. Xilol 1 por 10 minutos
    2. Xilol 2 por 5 minutos
    3. Etanol-Xilol por 5 minutos
    4. Etanol 100% por 5 minutos
    5. Etanol 96% por 5 minutos
    6. Etanol 90% por 5 minutos

7. Etanol 70% por 5 minutos
  8. H<sub>2</sub>O destilada por 5 minutos, 2 veces
- III. Una vez desparafinadas las muestras se pasaron a una solución de citrato de sodio al 0.01M con un pH 6 durante 15 minutos en baño maría con agua destilada en el horno de microondas, con la finalidad de exteriorizar los receptores.
  - IV. Cada 5 minutos se revisaban que el nivel de citrato no bajara más allá del nivel de tejido, en dado caso de que así fuera se reponía la cantidad que se hubiera evaporado
  - V. Se realizó un lavado con agua destilada por 5 minutos,
  - VI. Una vez seca la muestra se prosiguió a delimitar el área con un plumón hidrofóbico
  - VII. Una vez hecho esto se colocaron sobre las muestras gotas de PBS Twin 20 al 0.1% durante 20 minutos
  - VIII. Después se colocó PBS por 10 minutos
  - IX. Pasado este tiempo se adiciona albúmina de suero bovino (BSA) al 5% +PBS Twin 20 al 0.1 % para neutralizar los receptores inespecíficos de la muestra y se dejó durante 2 horas
  - X. Posteriormente se colocó el anticuerpo primario y se dejó en un recipiente cubierto por 24 horas
    - A. Para este trabajo se ocuparon los anticuerpos a una dilución 1:100 en solución BSA
  - XI. Después se realizaron 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS Twin 20 al 0.1%
  - XII. Hecho esto se colocó el anticuerpo biotinilado a una dilución 1:200 en PBS Twin 20 al 0.1% dejándolo durante 2 horas
  - XIII. Se realizaron nuevamente 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS Twin 20 al 0.1%
  - XIV. Se aplicó el complejo Avidina-Biotina el cual se preparó con PBS Twin 20 al 0.1% una hora antes de ser utilizado.

- XV. Se realizaron nuevamente 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS Twin 20 al 0.1%
- XVI. Pasado esto se reveló con diaminobencidina, se dejó hasta notar el cambio de color
- XVII. Se enjuagó con agua destilada y fue contrastado con hematoxilina unos cuantos segundos
- XVIII. Se dejó secar la muestra
- XIX. Se colocó en Xilol 1 por 10 minutos
- XX. Se pasó a Xilol 2 por 5 minutos
- XXI. Se dejó secar y se montó con resina entellan para su observación al microscopio.

Se tomaron 60 fotos por cerdo, 20 por cada porción de epidídimo.

En cada foto se realizó la medición del área de los túbulos y dentro de los márgenes de estos se contaron las células con la ayuda del programa Image-Pro Plus v6.0.

Una vez obtenido dicho conteo se estandarizó la cuenta sacando la proporción de células que habría en  $10,000\mu\text{m}$  ( $\frac{\text{número obtenido} \times 10,000}{\text{área obtenida}}$ ), una vez hecho esto con las 20 mediciones se obtuvo el promedio de cada porción de epidídimo de cada cerdo.

### **5.8.- Método estadístico**

Una vez terminado el conteo y obtenido los promedios se procedió a analizar los datos con el programa estadístico SPSS v.22

En dicho programa se realizaron las siguientes mediciones:

Prueba de normalidad: Se realizó una prueba de Shapiro-Wilks para determinar que las mediciones tendieran a la normalidad con una confianza de 95%.

Prueba de homogeneidad de varianzas: Se corrió el estadístico de Levene para determinar si había similitud en las varianzas de las mediciones con un 95% de confianza.

Prueba de ANOVA: se realizó una prueba de análisis de varianzas para conocer si existían diferencia estadística significativa entre los grupos estudiados, siempre y cuando las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene dieran un resultado significativo.

Prueba de Tukey: Esta se corrió en las comparaciones en donde había diferencia entre los grupos y existían 3 tratamientos con la finalidad de conocer los intervalos, siempre y cuando las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene dieran un resultado significativo.

Prueba T de Student: Esta se empleó con la finalidad de conocer el intervalo de diferencia cuando los resultados del ANOVA eran significativos y solo había 2 tratamientos.

## **6.- RESULTADOS**

### **6.1.- Mediciones histomorfológicas del epitelio epididimal**

En la gráfica 1, se observa que en los animales de **24 semanas de edad** en la región de la **cola del epidídimo** existe una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en el **ancho epitelial**. Presentando un ancho mayor en el grupo con **tratamiento experimental** que en el grupo control (64.4  $\mu\text{m}$  vs 38.3  $\mu\text{m}$ ). De manera individual (T de student) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de 3.93  $\mu\text{m}$  en las de menor diferencia y hasta un 48.2  $\mu\text{m}$  en las de mayor ( $\pm 7.22 \mu\text{m}$ )

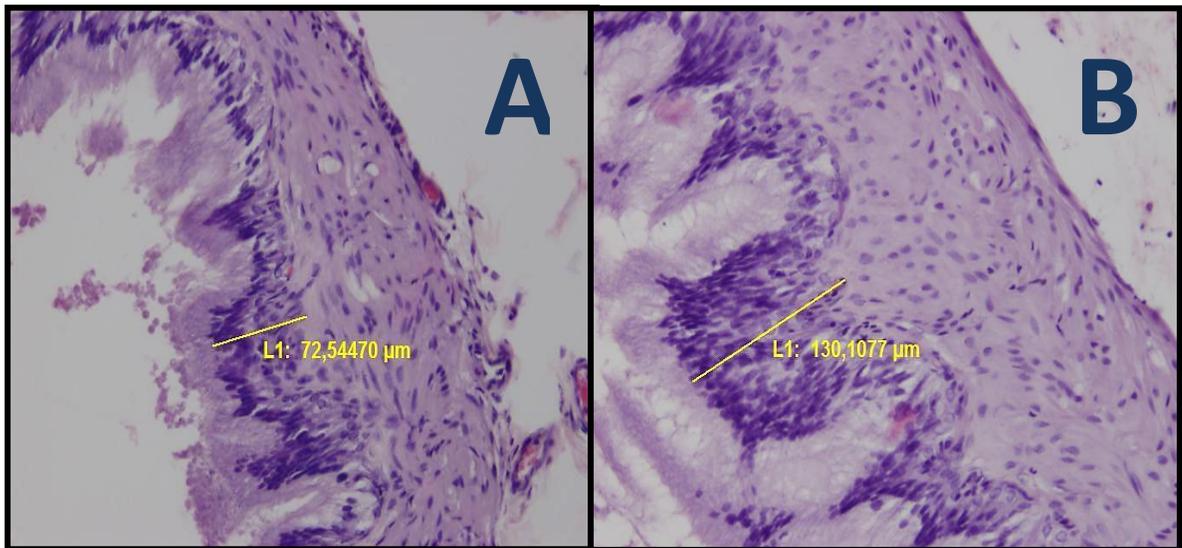
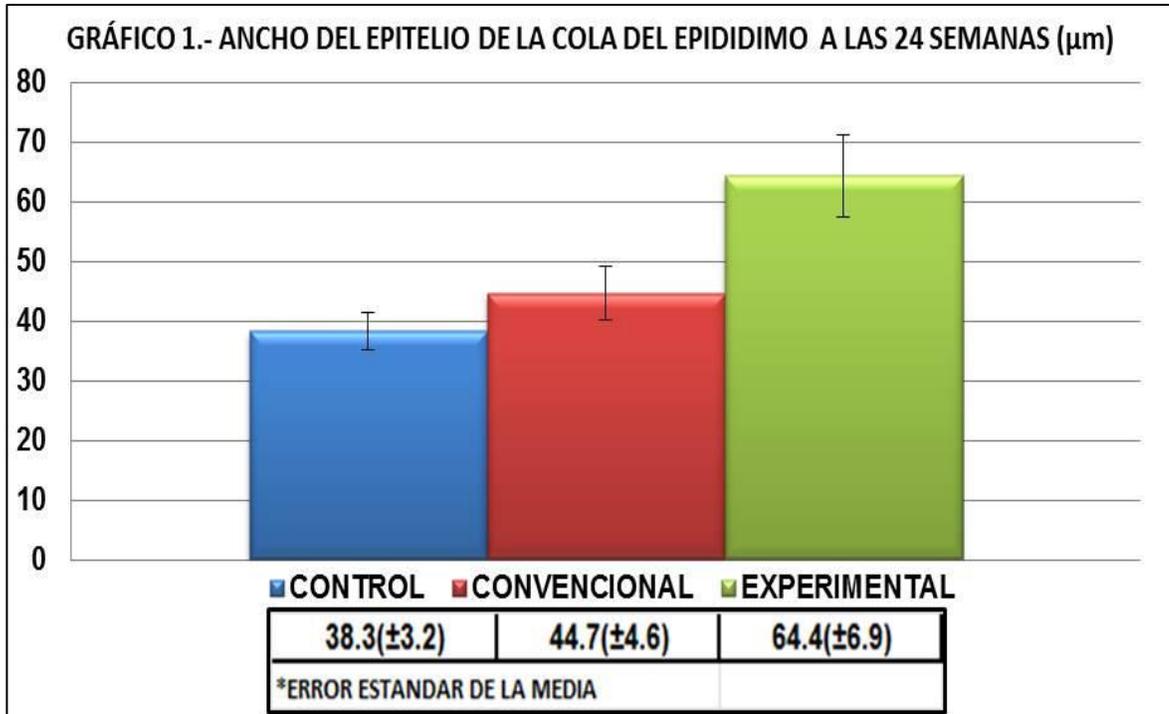


Figura 5.-Imágenes a 200x de Cola de Epidídimo con técnica H-E a las 24 semanas de edad mostrando mediciones del ancho epitelial  
 A: animal del grupo control; B: animal del grupo con tratamiento experimental

En la gráfica 2 observamos que en los animales de **24 semanas de edad** en la región de la **cabeza** existe una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en la **longitud de los estereocilios**. Siendo más grandes los del grupo con **tratamiento experimental** que los del grupo control ( $41.1\mu\text{m}$  vs  $22.0\mu\text{m}$ ) De manera individual (T de student) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de  $1.38\mu\text{m}$  en las de menor diferencia y hasta un  $36.85\mu\text{m}$  en las de mayor.

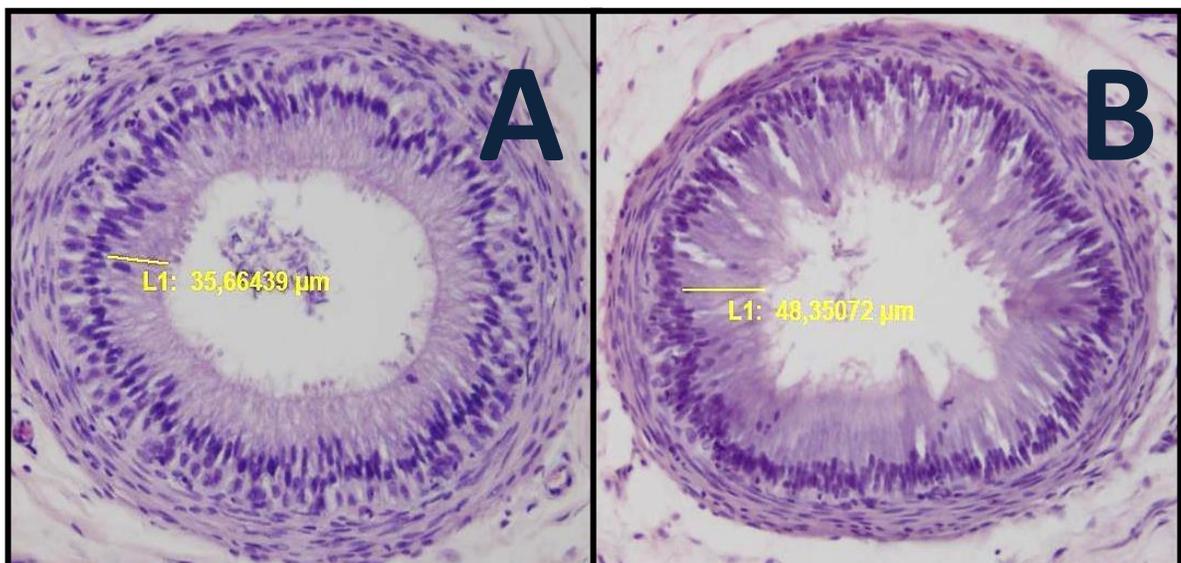
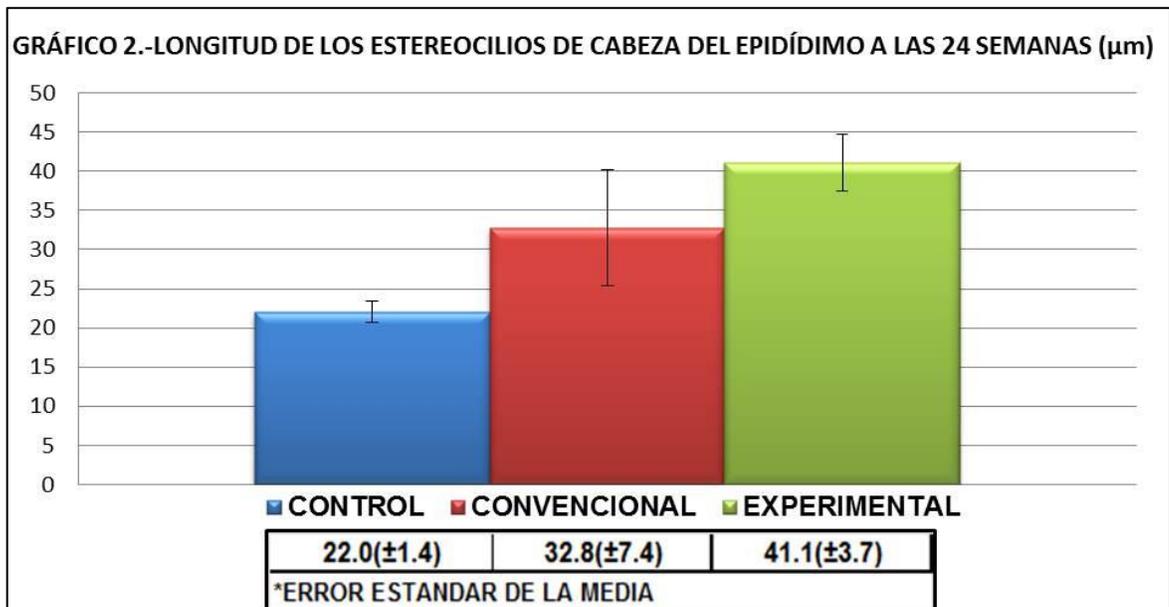
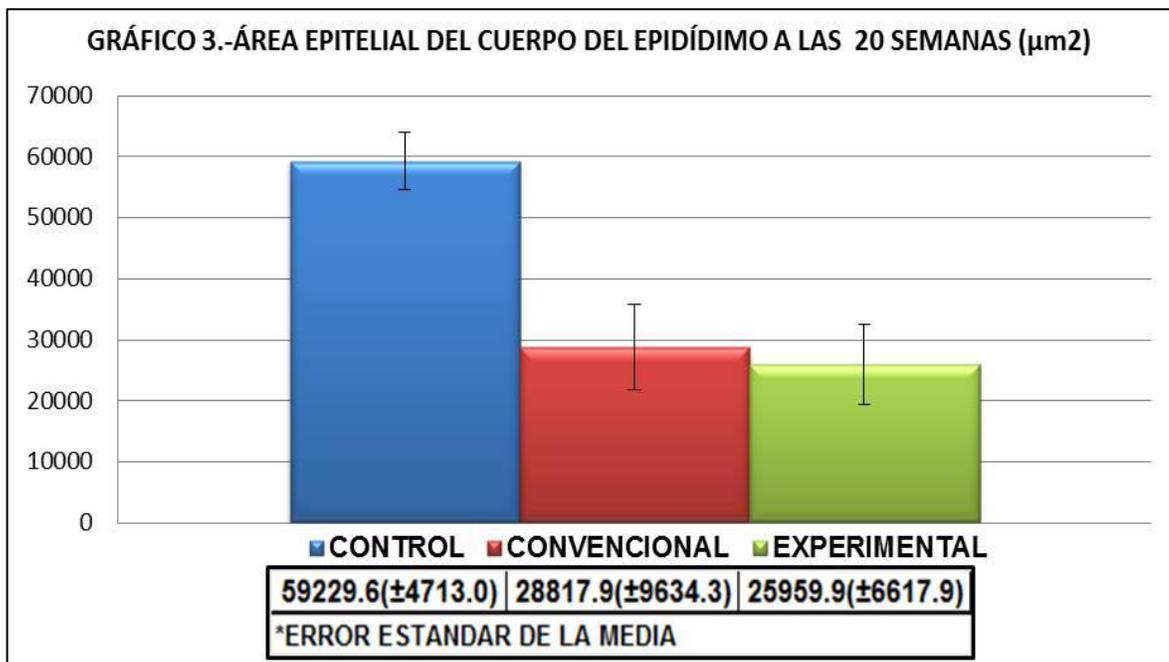


Figura 6.-Imágenes a 200x de Cabeza de Epidídimo con técnica H-E a las 24 semanas mostrando mediciones del largo de estereocilios  
A: animal del grupo control; B: animal del grupo con tratamiento experimental

En la gráfica 3 se observa que en los animales de **20 semanas de edad** hay una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en el **área epitelial** de la región del **cuerpo**. Siendo mayor el área del grupo control que la del grupo con tratamiento convencional ( $59229.6 \mu\text{m}^2$  vs  $28817.9 \mu\text{m}^2$ ), De manera individual (Tukey) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de  $6,617.72 \mu\text{m}^2$  en las de menor diferencia y hasta un  $54,205.76 \mu\text{m}^2$  en las de mayor. De igual manera el **grupo control** tuvo una mayor área epitelial que el grupo con tratamiento experimental ( $59229.6 \mu\text{m}^2$  vs  $25959.9 \mu\text{m}^2$ ). De manera individual (Tukey) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de  $10836.45 \mu\text{m}^2$  en las de menor diferencia y hasta un  $55702.88 \mu\text{m}^2$  en las de mayor.



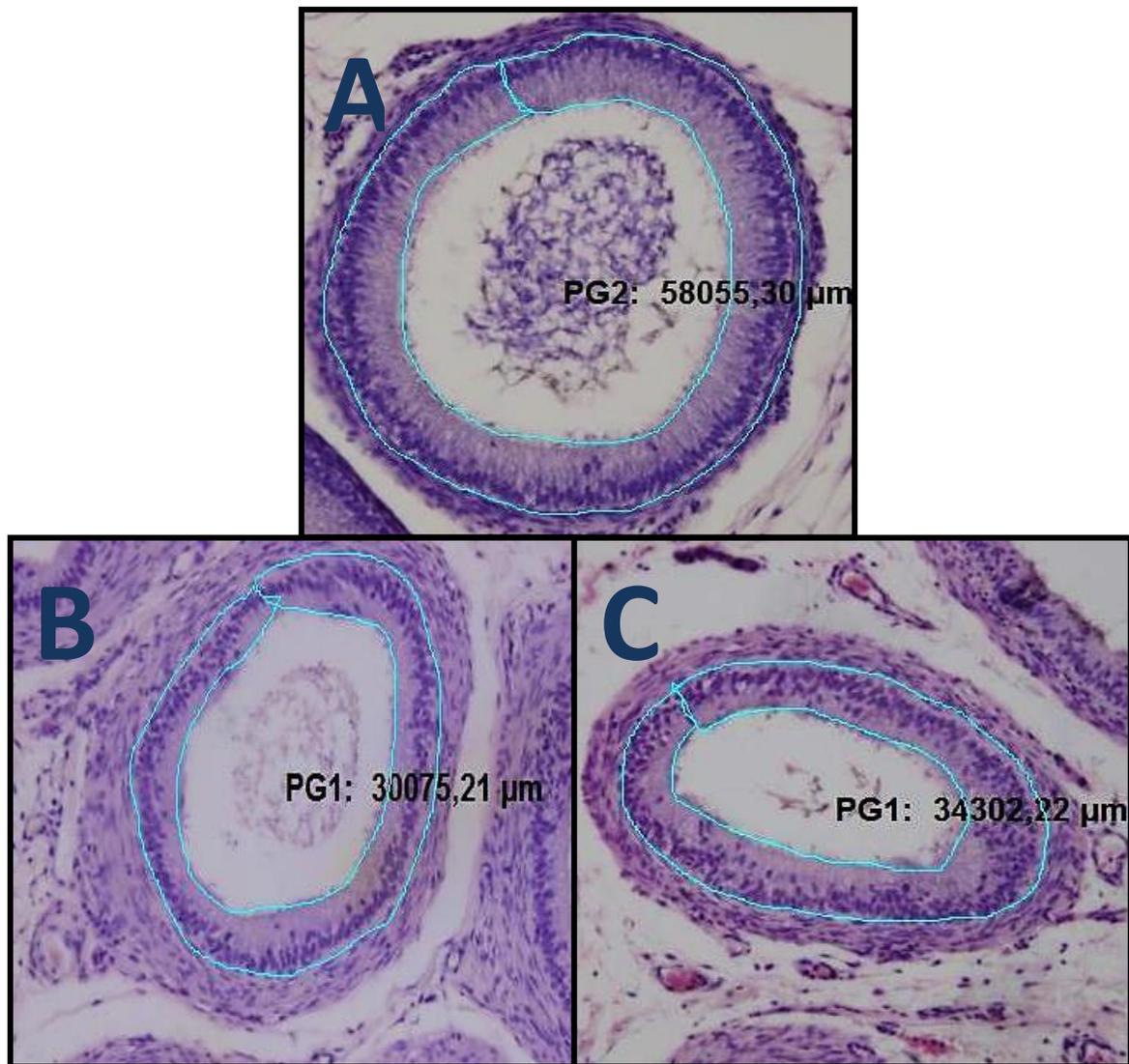


Figura 7.-Imágenes a 100x de Cuerpo de Epidídimo con técnica H-E a las 20 semanas de edad mostrando mediciones del área epitelial; A: animal del grupo control; B: animal del grupo con tratamiento convencional; C: animal con tratamiento

En las demás comparaciones no hubo una diferencia estadística significativa (anexos I, II y III).

## 6.2.- Determinación de receptores a andrógenos

En la gráfica 4 podemos observar que en los cerdos de 24 semanas de edad en la región de la **cabeza del epidídimo** existe una diferencia ( $p < 0.05$ ) en el **número de células sensibles a andrógenos**, teniendo el grupo control el mayor número

de estas en comparación con el grupo con tratamiento experimental (16.9 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  vs 5.3 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$ ). De manera individual (T de student) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de 1.98 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  en las de menor diferencia y hasta un 20.67 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  en las de mayor.

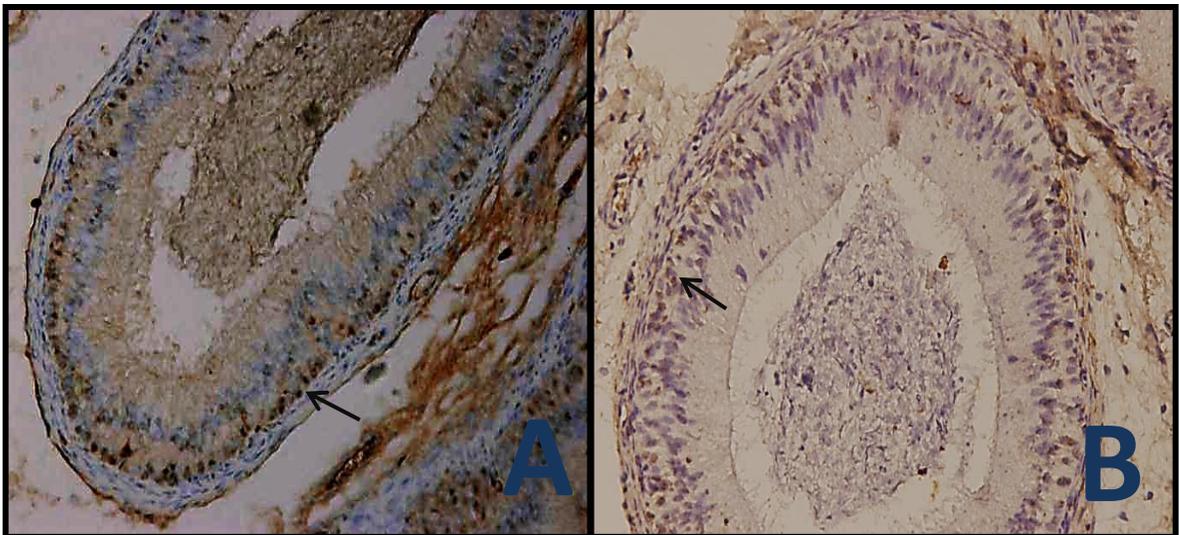
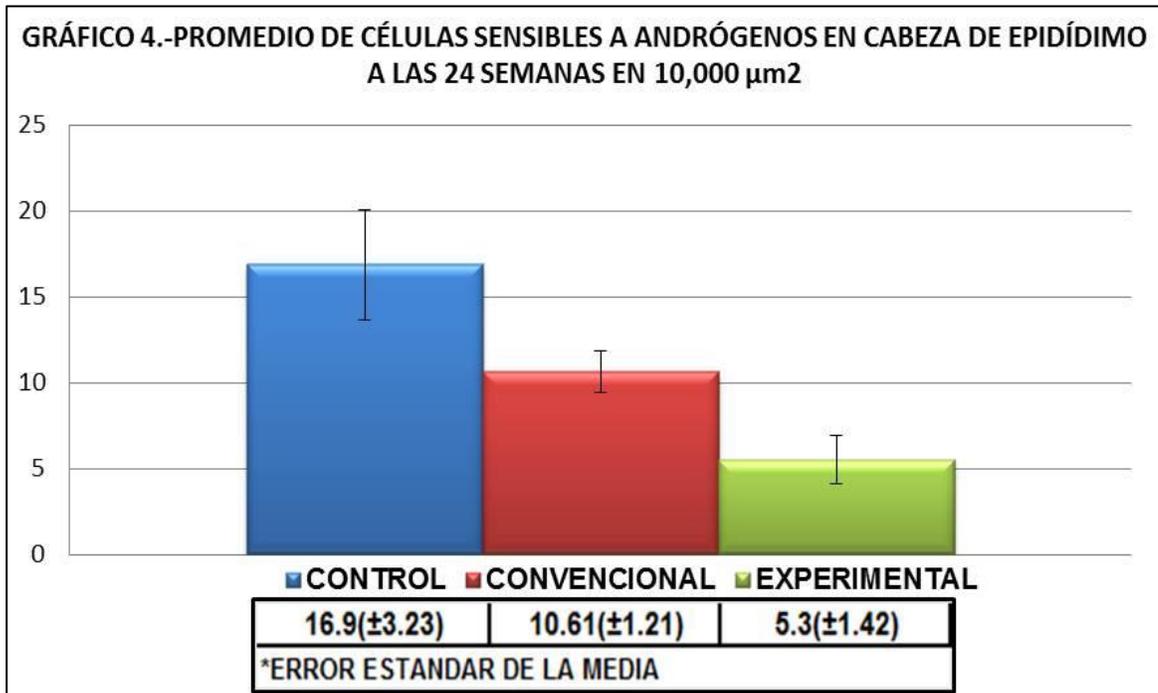


Figura 8.-Imágenes a 200x de Cabeza de Epidídimo con técnica de inmunohistoquímica a las 24 semanas de edad mostrando inmunoreactividad de los AR; la flecha señala una célula positiva; A: animal del grupo control; B: animal del grupo con tratamiento experimental

En la gráfica 5 podemos observar que en los animales de **24 semanas de edad** en la región del **cuerpo del epidídimo** existe una diferencia ( $p < 0.05$ ) en el **número de células sensibles a andrógenos**, teniendo el grupo control el mayor número de estas en comparación con el grupo con tratamiento experimental ( $35.23 \text{ cel. } /10,000\mu\text{m}^2$  vs  $11.2 \text{ cel. } /10,000\mu\text{m}^2$ ). De manera individual (T de student) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de  $5.1 \text{ cel. } /10,000\mu\text{m}^2$  en las de menor diferencia y hasta  $42.9 \text{ cel. } /10,000\mu\text{m}^2$  en las de mayor.

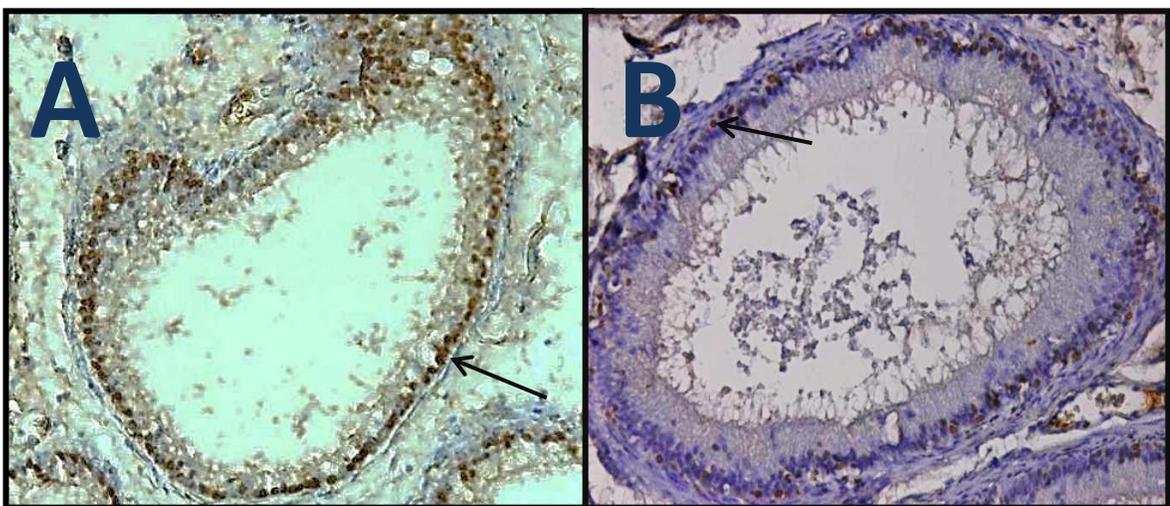
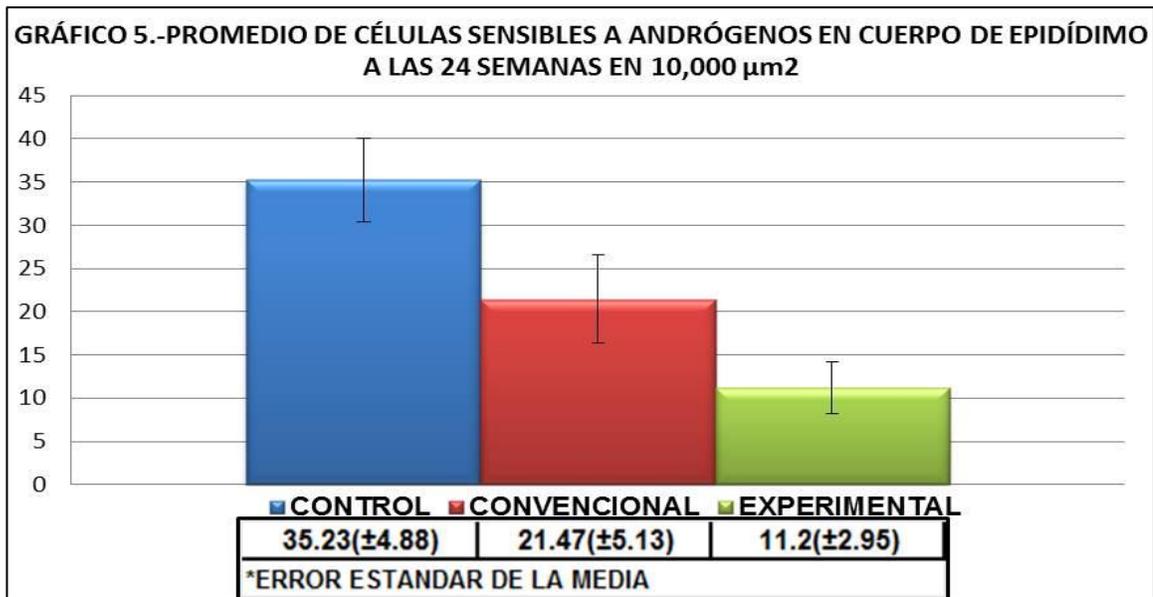


Figura 9.-Imágenes a 200x de Cuerpo de Epidídimo con técnica de inmunohistoquímica a las 24 semanas de edad mostrando inmunoreactividad de los RA; la flecha señala una célula positiva; A: animal del grupo control; B: animal del grupo con tratamiento experimental

En la gráfica 6 podemos observar que en los animales de **24 semanas de edad** en la región de la **cola del epidídimo** existe una diferencia ( $p < 0.05$ ) en el **número de células sensibles a andrógenos** teniendo el grupo control el mayor número de estas en comparación con el grupo con tratamiento experimental (7.56 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  vs 2.8 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$ ). De manera individual (T de student) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de 1. 8 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  en las de menor diferencia y hasta 7.8 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  en las de mayor.

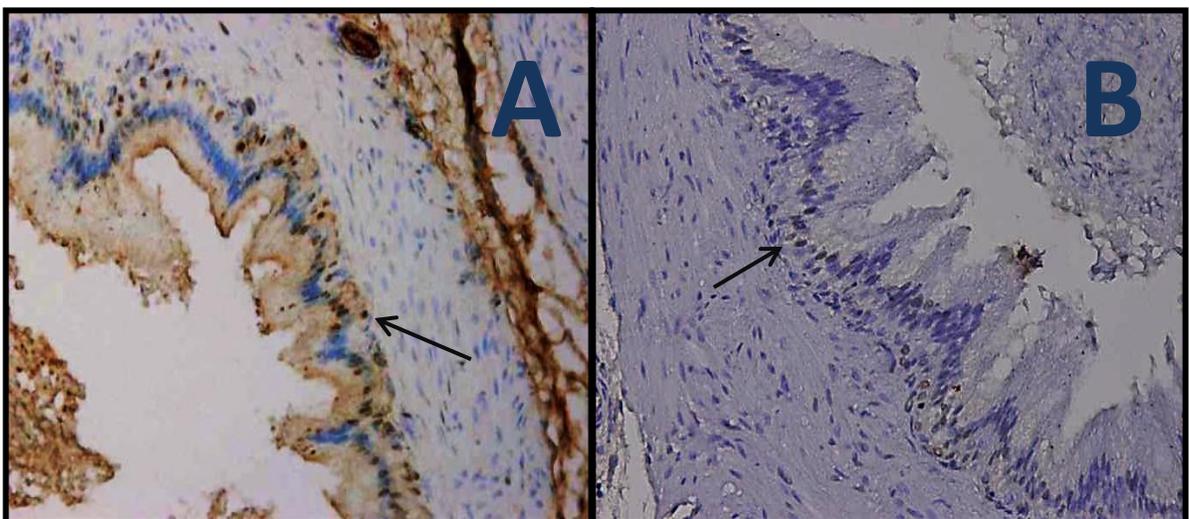
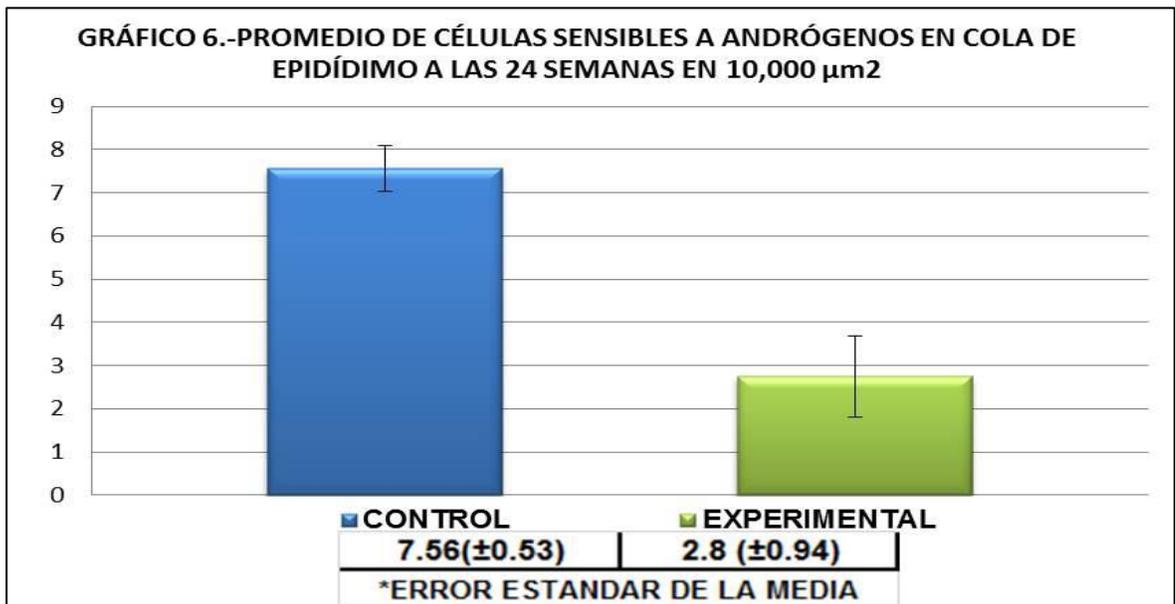
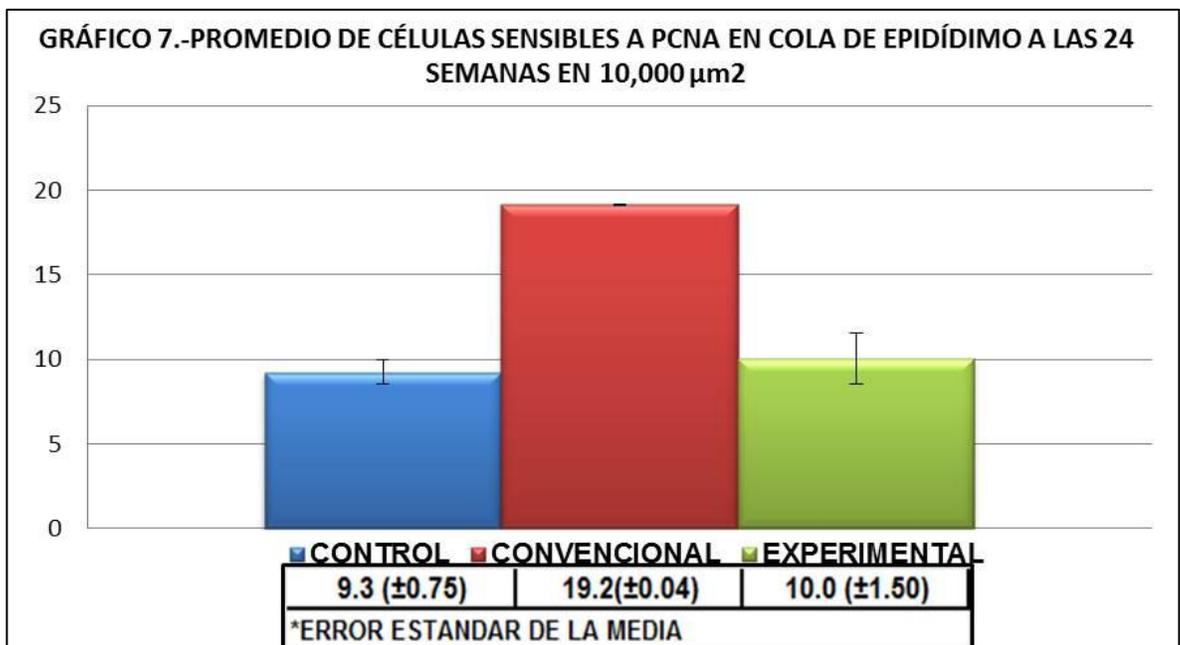


Figura 10.-Imágenes a 200x de Cola de Epidídimo con técnica de inmunohistoquímica a las 24 semanas de edad mostrando inmunoreactividad de los AR; la flecha señala una célula positiva; A: animal del grupo control; B: animal del grupo con tratamiento experimental

En las demás comparaciones no se encontraron diferencias estadísticas (anexo IV).

### 6.3.- Detección de receptores a PCNA

En la gráfica 7 podemos observar que en los animales de **24 semanas de edad** en la región de la **cola del epidídimo** existe una diferencia ( $p < 0.05$ ) en el **número de células sensibles a PCNA**, teniendo el grupo con **tratamiento convencional** el mayor número de estas en comparación con el grupo control (19.6 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  vs 9.3 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$ ). De manera individual (Tukey) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de 4.4 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  en las de menor diferencia y hasta 15.3 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  en las de mayor. De igual manera podemos observar que el grupo con **tratamiento convencional** tiene un mayor **número de células sensibles a PCNA** en comparación con el grupo experimental (19.6 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  vs 10.0 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$ ). De manera individual (Tukey) el rango de diferencia en las mediciones de los grupos fue de 3.6 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  en las de menor diferencia y hasta 14.5 cel. /10,000 $\mu\text{m}^2$  en las de mayor.



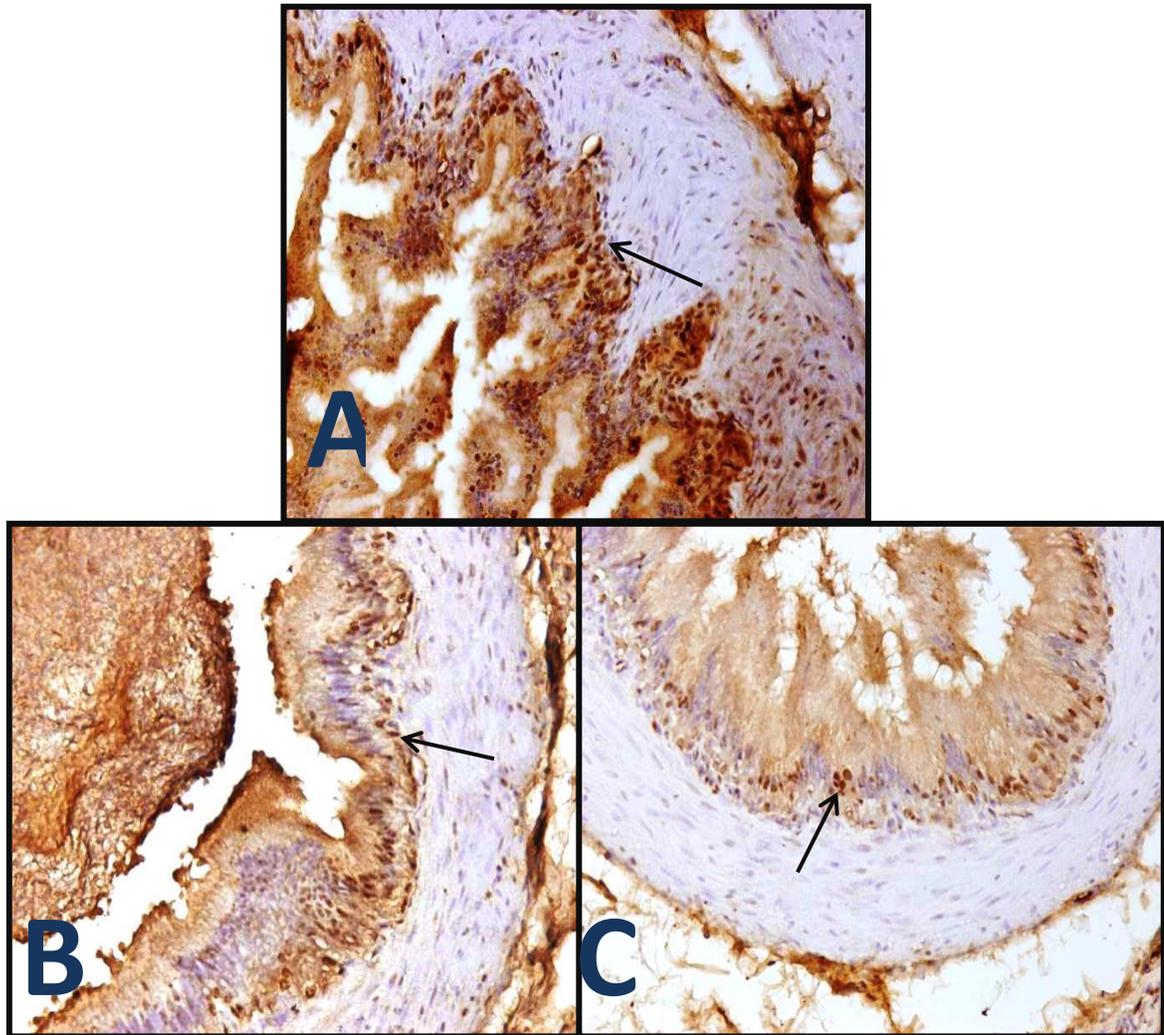


Figura 11.-Imágenes a 200x de Cola de Epidídimo con técnica de inmunohistoquímica a las 24 semanas de edad mostrando inmunoreactividad a PCNA; la flecha señala una célula positiva; A: animal del grupo con tratamiento convencional; B: animal del grupo control; C: animal del grupo con tratamiento experimental.

## 7.- DISCUSIÓN

El determinar en qué momento se encuentra completamente desarrollado el epidídimo de cerdo aún es un tema que no ha sido completamente estudiado, a pesar de ello se ha propuesto que la responsable de dicho proceso es la testosterona, la cual tiene la capacidad de generar sus propios receptores (Li-Ji y cols., 2000) con lo que se puede intuir que al tener mayor cantidad de receptores, será mayor la influencia que esta hormona ejerce sobre el epitelio epididimal, es

por esto que autores como Hamzeh y Robaire (2011), Falvo y cols., (2015) y Katleba y cols., (2015) hablan de que el desarrollo de este órgano, específicamente del epitelio tiene como base fundamental la expresión y activación de los receptores a andrógenos.

Tomando en cuenta lo anterior, al encontrar en nuestro estudio que el número de células inmunoreactivas a andrógenos es mayor en las tres regiones del epidídimo del grupo control comparado con el grupo con tratamiento experimental a las 24 semanas, hacemos referencia a lo mencionado por Li-Ji y cols., (2000) sobre el establecimiento de la maduración del epidídimo con lo que podemos suponer que el epitelio epididimal del grupo experimental no ha logrado hasta este punto un completo desarrollo, mientras que el grupo con tratamiento convencional si lo ha obtenido para este momento. Una explicación probable es que la aplicación de la vacuna contra GnRH en el grupo experimental se dé en un momento crucial del desarrollo de dichas células inmunoreactivas, situación que ya se llevó a cabo para el momento en que se da la aplicación en los animales con tratamiento convencional, es decir la vacunación temprana en el grupo experimental induce un desarrollo posterior al que presenta el convencional. Por otra parte el tratamiento convencional presenta a las 24 semanas la misma inmunoreactividad que el grupo control, lo que se interpreta como un crecimiento compensatorio evidente.

Las diferentes regiones anatómicas del epidídimo parecen mostrar respuestas diferentes a la deprivación androgénica, de tal manera que en las mediciones histomorfológicas encontramos diferencias a las 20 semanas en el área epitelial del cuerpo del epidídimo del grupo control en comparación con los otros dos tratamientos, pero no existieron diferencias en las otras dos regiones. La literatura consultada no muestra una diferencia específica por región, sin embargo nuestros resultados parecen sugerir que dicha sensibilidad regional es factible. Esto no podemos aseverarlo pues existen otros factores interactuando con los andrógenos

para favorecer el desarrollo epitelial del epidídimo tal es el caso de los estrógenos (Avenel, 2010).

Estas interacciones modulan el desarrollo epididimal y a la fecha aún no son del todo explicadas, pero podrían ser las causantes de que en el presente trabajo la medición del área y ancho epitelial, así como el largo de los estereocilios en el grupo control, se reflejen en un incremento puntual a las 16 semanas que luego sufre una marcada disminución en mediciones posteriores (anexo I, II y III). Por su parte en el grupo experimental el comportamiento en las mediciones es errático, algunas mediciones van a la baja con el tiempo (longitud de estereocilios en cuerpo) (anexo III), otras se mantienen (como el caso de la cola) (anexo II) y otras fluctúan bajando y volviendo a subir (área epitelial de cabeza y cuerpo) (anexo I), esto hace difícil interpretar el efecto de la inmunocastración temprana.

Lo anterior nos hace pensar que la deprivación androgénica en la 3ª semana provoca este comportamiento errático, tal vez por la ausencia o supresión de los andrógenos y otros factores que interactúen con ellos, ya presentes en la 10ª semana, por lo que el tratamiento convencional no presenta tantas fluctuaciones y que muestra valores a las 24 semanas similares al grupo control, lo cual concuerda con lo que mencionan Hazmeth y Robaire (2009), quienes comprobaron que el epidídimo de rata una vez que es privado de testosterona, sufre una degeneración a nivel epitelial y cuando dicha hormona es restablecida ocurre un crecimiento acelerado.

Por su parte el grupo experimental a las 24 semanas muestra valores en el área epitelial y longitud de los estereocilios de la cabeza mayores al control, como si las mediciones del grupo experimental no presentaran una disminución como ocurre con el control.

La diferencia regional también se hizo evidente, en el promedio de los conteos de células marcadas para PCNA donde se observó diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) en la región de la cola del grupo convencional de 24 semanas comparado tanto

con el promedio del grupo control como con el del grupo experimental, no así para la regiones de la cabeza y cuerpo ( $p>0.05$ ), esto puede deberse a que la porción de la cola se encuentra en la etapa de regeneración lo cual concuerda con el estudio de Bernal-Mañas, *et al.*, (2014) donde se comenta que el índice de proliferación en la cola del epidídimo es menor que en las otras dos regiones, con esto se infiere que la cabeza y el cuerpo pudieran haber pasado por dicha regeneración en las semanas previas a esta medición por lo que solo se observó la de la cola debido a que la segunda aplicación (y por consiguiente la regresión de los niveles de testosterona) llevan menos tiempo que en el grupo experimental. Sin embargo la regresión del grupo convencional fue más rápida que la del grupo experimental, esto pudo deberse a que al aplicar la vacuna a una edad más temprana se ejerció un efecto sobre una ventana de susceptibilidad crucial para el desarrollo del epidídimo del cerdo. Pudiéramos hablar de que dicha ventana es el momento en cual, dentro del testículo, se realiza un recambio total de las células de Leydig, dicho proceso ocurre a las 4 semanas de edad y es un proceso que depende totalmente de andrógenos (Hafez, 2002).

## **8.- CONCLUSIONES**

Con base en los resultados obtenidos de este estudio se puede concluir que el efecto de la supresión antigénica de la GnRH en una etapa prepuberal temprana, tiene como consecuencia un retraso sobre el desarrollo del epidídimo del cerdo.

Sin embargo se sugiere continuar con estudios que nos ayuden a entender el funcionamiento de otros elementos presentes en la maduración espermática como los estrógenos; así como diferentes etapas del ciclo celular (apoptosis), el cual pudiese alterarse al momento de realizar una aplicación prepuberal de la vacuna contra GnRH.

## 9. - LITERATURA CITADA

1. Aki Murashima , Satoshi Kishigami, Axel Thomson, Gen Yamada, Androgens and mammalian male reproductive tract development (review) *Biochimica et Biophysica Acta* 1849 (2015) 163–17
2. Amanda Swain. The epididymis, in Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Third Edition. Edited by Jimmy D. Neill. Editorial Elsevier, 2006. Chapter 6, pp. 245-256
3. Anna Fàbrega, Marta Puigmulé, Marc Yeste, et. al, Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa, *Theriogenology* (2011).
4. Avenel Joseph, Rex A. Hess, David J. Schaeffer, et. al, Absence of Estrogen Receptor Alpha Leads to Physiological Alterations in the Mouse Epididymis and Consequent Defects in Sperm Function, *biology of reproduction* 82, 948–957 (2010) DOI 10.1095/biolreprod.109.079889
5. Arango Prado María del Carmen, Llanes Fernández Leticia, Díaz Román Tomás y Faxas García María Elena, La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula; *Rev Cubana Oncol* 1997;13(2):126-134
6. Benoît Deslandes, Claude Gariepy, Alain Houde; Review of microbiological and biochemical effects of skatole; *Elsevier, Livestock Production Science* 71 (2001) 193–200
7. Bruniusa C, Zamaratskaia G, Andersson K, Chenc G, Norrby M, Madej A, Lundströma K. Early immunocastration of male pigs with Improvac® – Effect on boar taint, hormones and reproductive organs. *Vaccine*, 2011. 29:9514–9520.

8. C. Lonardi, A. Scollo, S. Normando, M. Brscic and F. Gottardo, Can novel methods be useful for pain assessment of castrated piglets? *The Animal Consortium* 2015 page 1 of 7 doi:10.1017/S1751731114003176
9. Carl Brunius, Galia Zamaratskaia, Kristina Andersson, et al. Early immunocastration of male pigs with Improvac® – Effect on boar taint, hormones and reproductive organs, Elsevier, *Vaccine* 29 (2011) 9514–9520
10. Claus R, Rottner S, Rueckert C. Individual returns to Leydig cell function after GnRH-immunization of boars. *Vaccine* 2008. 26; 4571-8.
11. C.M. Bernal-Mañas, E. Beltrán-Frutos, C. Ferrer, V. Seco-Rovira, E. Pinart, M.D. Briz, S. Bonet, M. Canteras, L.M. Pastor, Cell proliferation in the seminiferous and epididimal epithelia of *Sus domesticus*; *Theriogenology* 81 (2014) 702–711.
12. De Chiara Alessia, Pederzoli-Ribeil Magali, Mocek Julie et. al, Characterization of cytosolic proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in neutrophils: antiapoptotic role of the monomer, *Journal of Leukocyte Biology* Volume 94, October 2013.
13. E. S. E. Hafez, B. Hafez; Reproducción e inseminación artificial en animales; 7° ed.; Ed. Mc Graw Hill; 2002
14. Einarsson S, Brunius C, Wallgren M, Lundström K, Andersson K, Zamastskaia G, Rodriguez-Martinez H. Effects of early vaccination with Improvac® on the development and function of reproductive organs of male pigs. *Anim Rep Sci*, 2011. 127:50-5.
15. Evison Benjamin J., Actis Marcelo L., Wua Sean Z., et. al. A site-selective, irreversible inhibitor of the DNA replication auxiliary factor proliferating cell

nuclear antigen (PCNA), *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22 (2014) 6333–6343

16. Franc, a LR, Silva Jr VA, Chiarini-Garcia H, Garcia SK, Debeljuk L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 2000;63:1629–36.
17. G Zamaratskaia , J Babol, A Madej , EJ Squires, K Lundstro, Age-related Variation of Plasma Concentrations of Skatole, Androstenone, Testosterone, Oestradiol-17b, Oestrone Sulphate, Dehydroepiandrosterone Sulphate, Triiodothyronine and IGF-1 in Six Entire Male Pigs, *Reprod Dom Anim* 39, 168–172 (2004).
18. G. Zamaratskaia, S. Stefanovic, K. Lundstrom, O. Doran. Expression of the hepatic skatole- and androstenone-metabolising enzymes in entire male pigs of two live weights. *Livestock Science*. Volume 145, Issue 1, Pages 124-130, May 2012. doi:10.1016/j.livsci.2012.01.006
19. Gang Chen, Ying Bai, Li Ren, et. al. Metabolism of Androstenone, 17b-Estradiol and Dihydrotestosterone in Primary Cultured Pig Hepatocytes and the Role of 3b-Hydroxysteroid Dehydrogenase in This Process. *PLOS ONE* January 2015 Volume 10 Issue 1. doi: 10.1371/journal.pone.0113194
20. Geoffrey Shaw, Marilyn B. Renfree; Wolffian Duct Development; *Sex Dev* 2014; 8:273–280 DOI: 10.1159/000363432
21. H. Andersson, M. Wallgren, L. Rydhmer, et. al; Photoperiodic effects on pubertal maturation of spermatogenesis, pituitary responsiveness to exogenous GnRH, and expression of boar taint in crossbred boars, Elsevier, *Animal Reproduction Science* 54 \_1998. 121–137
22. H. W. M. VAN Van Straaten, C. J. G. Wensing, Leydig Cell Development in the Testis of the pig, *biology of reproduction* 18, 86-93 (1978)

23. Hakan Era, Nuray Acara, Dijle Kipmen-Korgunc, et al. Determination of PCNA, cyclin D3, p27, p57 and apoptosis rate in normal and dexamethasoneinduced intrauterine growth restricted rat placentas. *Acta Histochemica* (2015)
24. J. Bassols a,\* , E. Ka´da´r a, M. Briz a, E. Pinart, et. al. Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures Evaluation of boar sperm maturation in vitro, Elsevier 2005, *Theriogenology* 64
25. J. Bassols, E. Ka´da´r a, M. Briz, et. al, Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures Evaluation of boar sperm maturation in vitro, *Theriogenology* 64 (2005) 1995–2009
26. J. Blake Tyrrell, James W. Findling, david C. Aron, Hipotálamo e hipófisis, en: *Endocrinología básica y clínica*, tercera edición, editado por Antonio Lemus Gamboa, editorial Manual Moderno, México D. F. 1995 pp. 73-135
27. Kimberley D Katleba, Erin L Legacki, Alan J Conley and Trish Berger, Steroid regulation of early postnatal development in the corpus epididymidis of pigs; *Journal of Endocrinology* (2015) 225, 125–134
28. Lee B. Smitha,<sup>1</sup>, William H. Walkerb,\* The regulation of spermatogenesis by androgens; Elsevier; *Seminars in Cell & Developmental Biology* 30 (2014) 2–13
29. Li-Ji Zhu, Matthew P. Hardy, Ivan V. Inigo et. Al. Effects of Androgen on Androgen Receptor Expression in Rat Testicular and Epididymal Cells: A Quantitative Immunohistochemical Study<sup>1</sup>, *biology of reproduction* 63, 368–376 (2000)

30. Luiz R. Franca, Gleide F. Avelar, Fernanda F.L. Almeida Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. Elsevier 2005, *Theriogenology* 63 300-318
31. Mahsa Hamzeh and Bernard Robaire, Effect of Testosterone on Epithelial Cell Proliferation in the Regressed Rat Epididymis; *Journal of Andrology*, Vol. 30, No. 2, March/April 2009.
32. Bernard Robaire and Mahsa Hamzeh, Androgen Action in the Epididymis (Review); *Journal of Andrology*, Vol. 32, No. 6, November/December 2011.
33. Mogens t. Jensen,<sup>1</sup> \* raymond p. Cox,<sup>2</sup> and bent borg jensen<sup>1</sup>, 3-Methylindole (Skatole) and Indole Production by Mixed Populations of Pig Fecal Bacteria *Applied and environmental microbiology*, aug. 1995, p. 3180–3184 vol. 61, no. 8
34. Monica Hansson, Nils Lundeheim, Görel Nyman, Gunnar Johansson; Effect of local anaesthesia and/or analgesia on pain responses induced by piglet castration. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2011 ; 53:34
35. Nicholas Wicks, Spencer Crouch, Christopher A. Pearl. Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. Elsevier 2013 *Anim. Rep. Sci.* 142 149-159
36. Oskam IC, Levrik S, Tajet H, Dahl E, Ropstad E, Andresen O. Differences in testosterone, androstenone, and skatole levels in plasma and fat between pubertal Duroc and Landrace boars in reponse to human chorionic gonadotrophin stimulation. *Theriogenology*, 2010. 74;10 88-98.
37. Pearl C, Berger T, Roser JF. Estrogen and androgen receptor expression in relation to steroid concentrations in the adult boar epididymis. *Domestic Animal Endocrinology*, 2007.33;451–459

38. Pfizer Animal Health; Improvac ® Anexo I ficha técnica o resumen de las características del producto.
39. Regiana L. Oliveira, José C. Nogueira, Germán A.B. Menchaca, Cleida A. Oliveira; Seasonal variation in estrogen receptor Era, but not ER $\beta$ , androgen receptor and aromatase, in the efferent ductules and epididymis of the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. Elsevier 2012, General and comparative Endocrinology 179 1-13
40. Renee Zaya, Chelsie Hennick, Christopher A. Pearl; In vitro expression of androgen and estrogen receptors in prepuberal an adult rat epididymis. Elsevier 2012, General and Comparative Endocrinology 178 573-586
41. Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. The epididymis, in Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition. Edited by Jimmy D. Neill. Editorial Elseiver, 2006. Chapter 22, pp. 1071-120.
42. Robic A, Larzul C, Bonneau M. Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue: a review. Genet Sel Evol 2008; 40:129–43.
43. S. Einarsson a, K. Andersson b, M. Wallgren a,c, Short- and long-term effects of immunization against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac<sup>TM</sup>, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs, Elsevier, Theriogenology 71 (2009) 302–310
44. S. Falvo, M. M. Di Fiore, L. Burrone, G. Chieffi Baccari, S. Longobardi and A. Santillo, Androgen and oestrogen modulation by D-aspartate in rat epididymis; Reproduction, Fertility and Development 2015, <http://dx.doi.org/10.1071/RD15092>
45. S.A. McCoard, D.D. Lunstra, T.H. Wise, and J.J. Ford, Specific Staining of Sertoli Cell Nuclei and Evaluation of Sertoli Cell Number and Proliferative

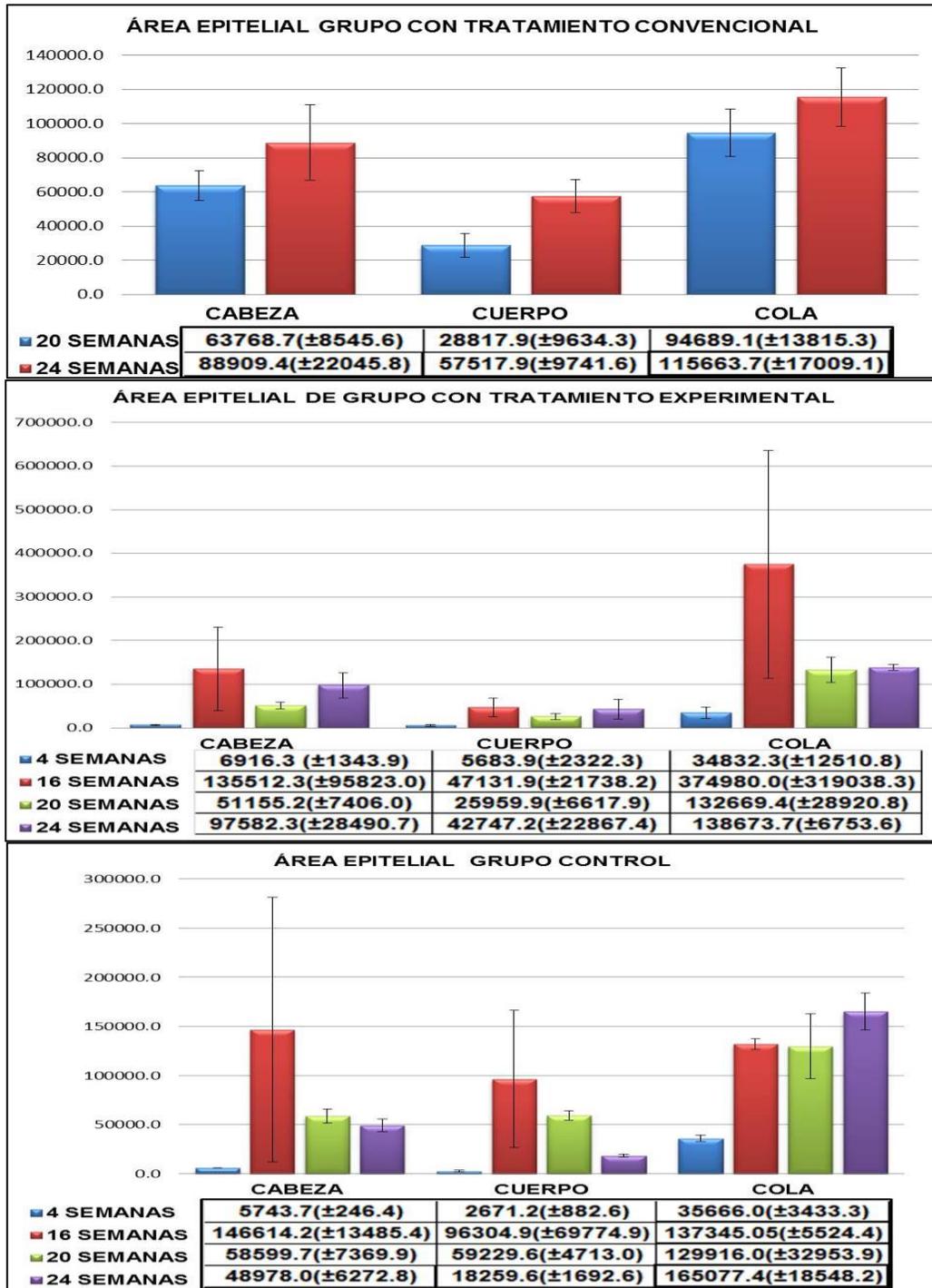
Activity in Meishan and White Composite Boars During the Neonatal Period, *biology of reproduction* 64, 689–695 (2001).

46. Shih-Hsing Leir, James A. Browne, Scott E. Eggener, Ann Harris, Characterization of primary cultures of adult human epididymis epithelial cells *Fertility and Sterility*® Vol. -, No. -, - 2014 0015-0282
47. Torres-Bernal Luis Fernando, Díaz-Rubio José Luis, Sánchez Patricia, et. al, Análisis de expresión de PCNA, p53 y bcl-2 en la secuencia melanosis adquirida primaria-melanoma conjuntival, *Rev Mex Oftalmol*; Septiembre-Octubre 2006; 80(5):234-240.

## 10.- ANEXOS

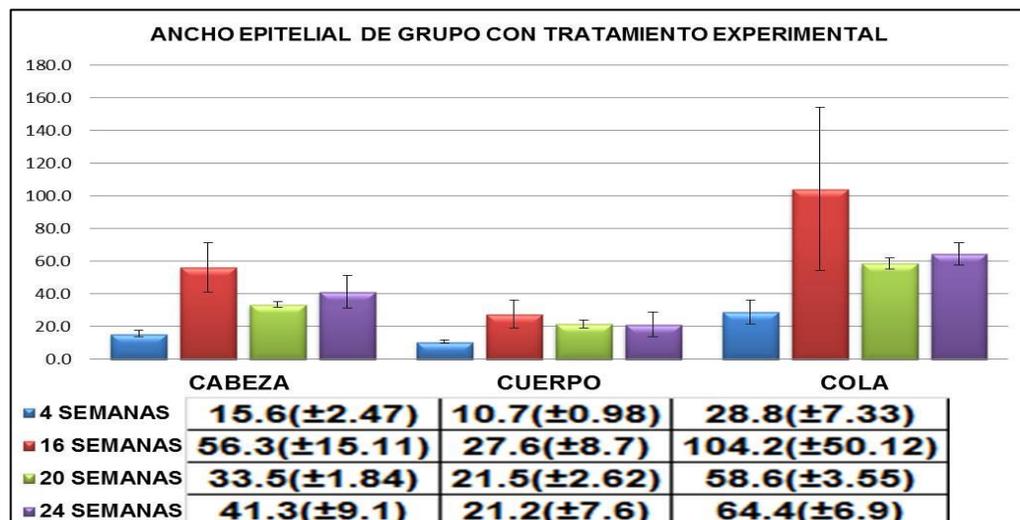
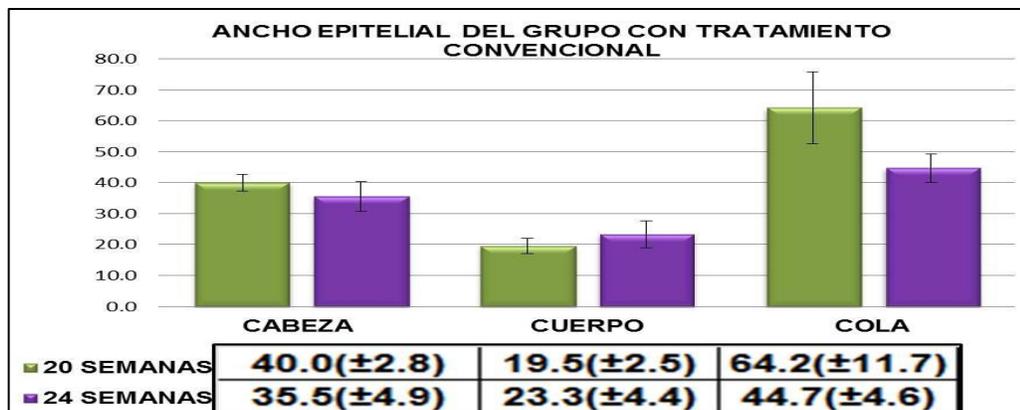
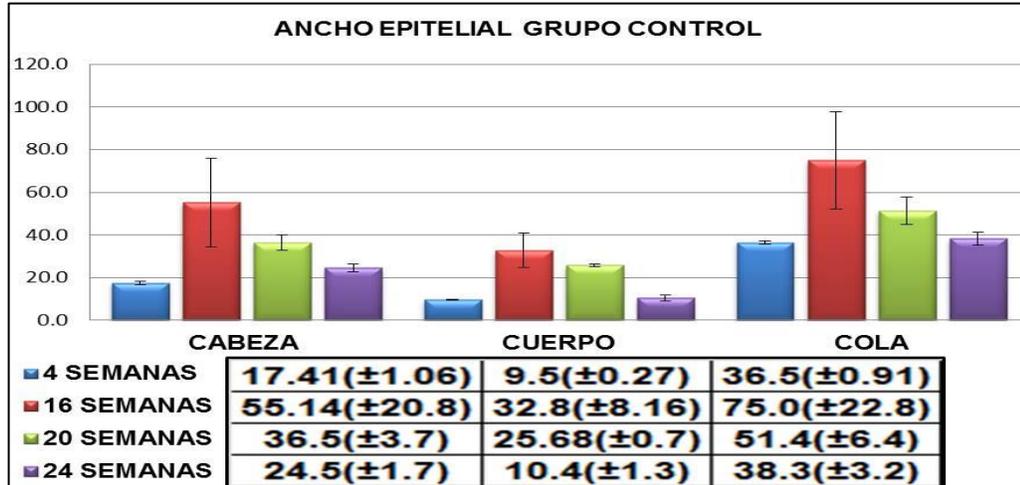
### 10.1.- Anexo I

Tablas comparativas del área epitelial de acuerdo a la región, edad y tratamiento. (Se muestra el error estándar de la media)



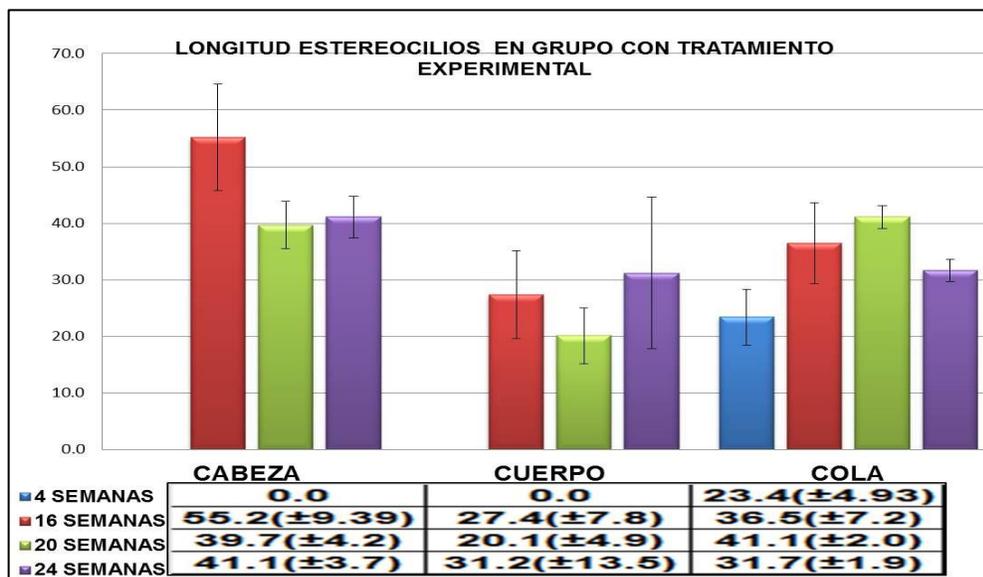
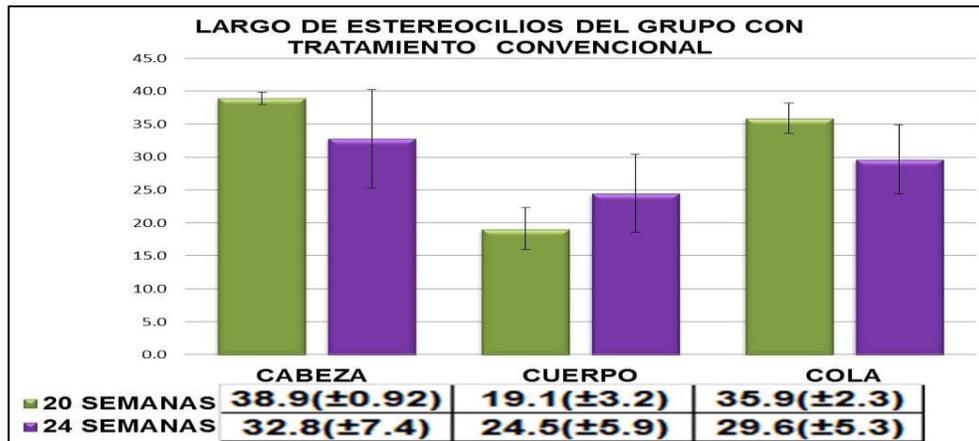
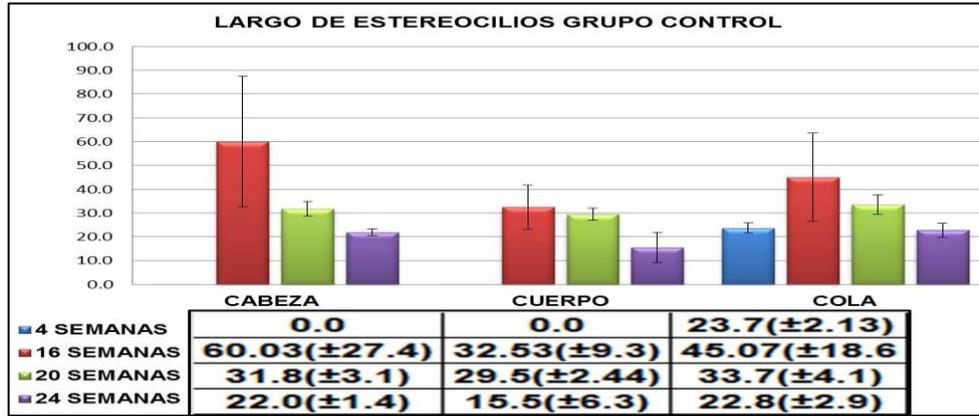
## 10.2.- Anexo II

Tablas comparativas del ancho epitelial de acuerdo a la región, edad y tratamiento. (Se muestra el error estándar de la media)



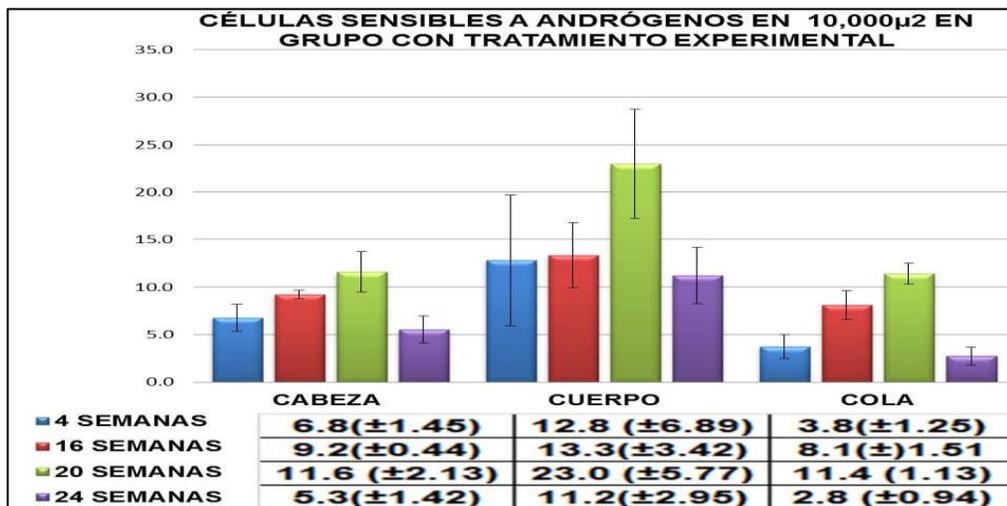
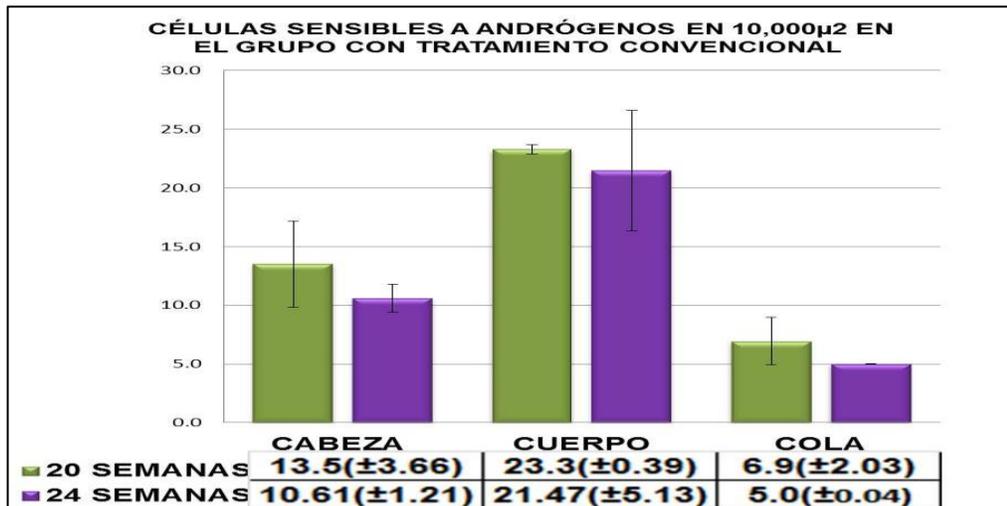
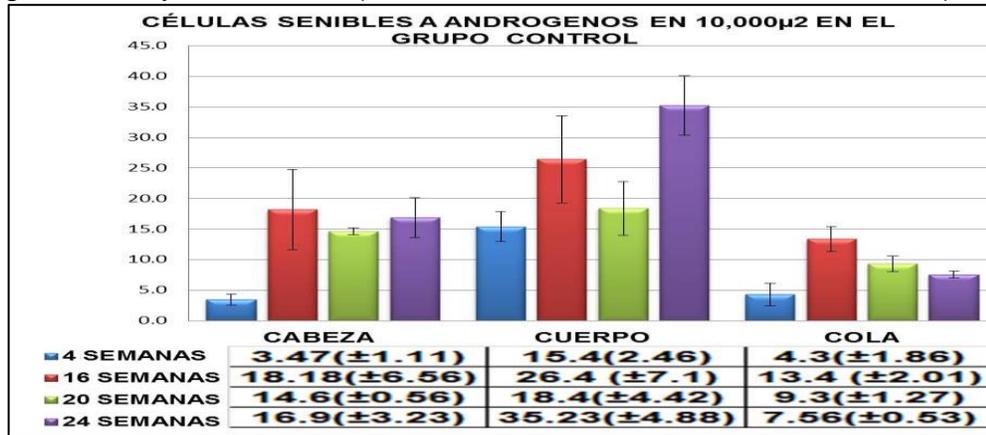
### 10.3.- Anexo III

Tablas comparativas del largo de los estereocilios de acuerdo a la región, edad y tratamiento. (Se muestra el error estándar de la media)



### 10.4.- Anexo IV

Tablas comparativas del promedio de células sensibles a andrógenos de acuerdo a la región, edad y tratamiento (Se muestra el error estándar de la media).



### 10.5.- Anexo V

Tablas comparativas del promedio de células sensibles a PCNA de acuerdo a la región, edad y tratamiento (Se muestra el error estándar de la media).

