



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES

CAMBIOS HISTOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS EN TESTÍCULOS DE
CONEJOS TRATADOS CON UNA VACUNA ANTICONCEPTIVA A BASE DE
GnRH

TESIS

Que presenta:

Josué Rangel Díaz

Como requisito para obtener el grado de:

Maestro en Producción Agropecuaria

Director:

Doctor en Ciencias Biológicas Guillermo Salas Razo

Co-director:

Maestro en Ciencias Biológicas Jesús Antonio Rojo Martínez

Morelia, Michoacán, Agosto de 2015.



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES**

**CAMBIOS HISTOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS EN TESTÍCULOS DE CONEJOS
TRATADOS CON UNA VACUNA ANTICONCEPTIVA A BASE DE GnRH**

Alumno: Josué Rangel Díaz

**Asesores: Guillermo Salas Razo, Jesús Antonio Rojo Martínez, Rogelio
Garcidueñas Piña, Mauricio Perea Peña, Juan Pablo Flores Padilla.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme tantas gratas experiencias.

A mis padres, mi hermano y María que son el pilar de mi vida; mi familia, especialmente a mi abuela Esperanza, a mis amigos y compañeros de trabajo y estudios.

A la Máxima Casa de Estudios, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y de forma particular al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.

A mis asesores, Jesús Antonio Rojo Martínez, Rogelio Garcidueñas Piña, Mauricio Perea Peña, Juan Pablo Flores Padilla, por su valioso apoyo y amistad que me han otorgado durante este proceso, a quienes reconozco que fueron parte indispensable en mi formación. Especialmente a mi amigo Guillermo Salas Razo que depositó su confianza para iniciar con este trabajo, pero sobre todo por abrirme las puertas de su casa y permitirme conocer a su linda familia con quien tengo un gran lazo afectivo.

A mi amigo Enrique Yarto Jaramillo y la Dra. Anneke Moresco, quienes me iniciaron en el tema de la contracepción y que sin su orientación no hubiese iniciado con estos estudios.

A mis amigos Adrián Sánchez y Manuel López por su apoyo en el trabajo Histológico, a mi amigo Iván por prestarme su granja para la realización del experimento.

A mi amigo Ruy Ortiz, que siempre me ha brindado su ayuda cuando lo busco.

A todos, gracias.

ÍNDICE

I.- RESUMEN	1
II.- ABSTRACT	2
III.- INTRODUCCIÓN GENERAL	3
IV.- REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1.- Anatomía del Testículo	4
4.2.- Histología del Testículo	5
4.3.- Fisiología del Testículo	7
4.4.- Métodos anticonceptivos	8
4.5.- Vacuna	9
4.5.1.- Hapteno	10
4.5.2.- Proteína portadora o de transporte	10
4.5.3.- Excipiente	10
4.5.4.- Adyuvante	10
4.5.5.- Reacciones adversas	11
4.5.6.- Dosis	12
4.5.7.- Vía de Administración	12
4.6.- Vacuna a base de GnRH	13
4.6.1.- Mecanismo de acción de la vacuna GnRH + proteína de difteria + DEAE-celulosa (improvac ®)	13
4.6.2.- Daños en el testículo	15
V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
VI.- HIPÓTESIS	16
VII.- OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	16
7.1 General:	16

7.2- Específicos:	16
VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS	17
IX.-RESULTADOS.	20
X.- DISCUSIÓN.....	30
XI.- CONCLUSIÓN.....	35
XII.- REFERENCIAS	36
XIII.- ANEXOS.....	45

I.- RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles séricos de testosterona y los cambios morfométricos e histológicos en testículos de conejos, a 4, 12 y 24 semanas posteriores a la administración de una vacuna anticonceptiva a base de GnRH. Se utilizaron 30 conejos machos con una edad promedio de 2 meses y un peso de 2,328 gr, divididos en 6 grupos de 5 conejos. 3 grupos recibieron 2.0ml de la vacuna a base de GnRH, los 3 grupos restantes recibieron 2.0ml de solución salina, repitiendo el tratamiento para todos los grupos a las 4 semanas. Para evaluar los cambios morfométricos, fueron registradas las mediciones semanales de longitud y diámetro testicular durante todo el estudio, para observar los cambios histológicos se sacrificaron 2 grupos de conejos (vacunado, no vacunado) en 3 momentos posteriores a la segunda aplicación del tratamiento y procesado los testículos para su observación con objetivos de 10x, 40x y 100x., y para la medición de testosterona se colectó una muestra de sangre. Los conejos tratados mostraron una disminución en la morfometría testicular, teniendo su mayor efecto en la semana 4, para posteriormente tener un crecimiento gradual hasta el término del estudio. Los cambios histológicos revelan un proceso temporal de atrofia testicular como respuesta al proceso de inflamación agudo, sin encontrar necrosis. Los niveles de testosterona sérica en los conejos tratados con la vacuna anticonceptiva a base de GnRH presentaron menores concentraciones en todos los momentos evaluados, teniendo un incremento gradual. Concluyendo que la vacuna a base de GnRH en conejos tiene efectos temporales y no genera lesiones que comprometan su funcionalidad.

Palabras clave: inmunocontracepción, gónadas, eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas, morfometría testicular, atrofia.

II.- ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate serum testosterone levels and morphometric and histological changes in rabbit testes, 4, 12 and 24 weeks after administration of a contraceptive vaccine based on GnRH. 30 male rabbits were used with an age of 2 months and a weight of 2,328 grams, divided into 6 groups of 5 rabbits. 3 groups received 2.0ml of GnRH-based vaccine, the other three groups received 2.0ml of saline solution, repeating the treatment for all groups at 4 weeks. To evaluate the morphometric changes were measured weekly the length and testicular diameter during the study, to observe the histological changes 2 groups of rabbits (vaccinated, not vaccinated) in 3 different times after the second application of treatment, were slaughtered and processed testicles for observation with objectives 10x, 40x and 100x., and was collected a blood sample to measure the testosterone serum levels. The treated rabbits showed a decrease in testicular morphometry, having its greatest effect at the week 4, and later showed a gradual growth until the end of the study. Histological changes reveal a temporal process of testicular atrophy in response to acute inflammation process, not finding necrosis. testosterone serum levels in rabbits treated with the contraceptive vaccine based on GnRH had lower concentrations at all times evaluated, with a gradual increase. Concluding that the GnRH-based vaccine in rabbits have temporary effects and does not generate injuries that compromise their functionality.

Keywords: immunocontraception, gonads, the hypothalamic-pituitary-gonadal, morphometry testicular atrophy.

III.- INTRODUCCIÓN GENERAL

Conocer la biología reproductiva permite realizar acciones de forma programada y tener una mayor eficiencia en el uso de los recursos biológicos, materiales, financieros y humanos para lograr el mayor rendimiento de las explotaciones pecuarias (Hafez, 2002).

Este conocimiento es uno de los logros más emblemáticos de la investigación del en el campo de las ciencias de la vida y la zootecnia permitiendo mejorar la productividad y la tasa de mejoramiento genético de los animales destinados a la producción de leche, lana, carne, huevos, pieles y mieles, así como de incrementar la calidad de sus productos (Ricaurte, 2006).

El desarrollo científico tecnológico y la aplicación de nuevas técnicas han permitido hacer más eficientes los procesos, reducir el intervalo entre partos, sincronizar celos, conocer el ciclo reproductivo, recolectar células germinales, inseminar, transferir embriones, realizar diagnósticos de gestación ultra tempranos (Hafez,2002; Brunius 2011).

De forma tradicional en los sistemas de pecuarios el manejo reproductivo se realiza buscando mejorar la producción logrando el mayor número de crías en menor tiempo y con características homogéneas (Ricaurte, 2006).

Sin embargo el manejo de la reproducción en algunas ocasiones se realiza como un mecanismo biológico evitando la reproducción temporal que permite controlar poblaciones, manejar ejemplares ferales, control de plagas, animales de compañía, animales silvestres que están sus genes sobre presentados (Kirkpatrick, 1999; Gobello,2002; Miller 2002, 2004^a; Griffiths, 2011)

Existen diferentes formas de evitar o disminuir la concepción, generalmente han sido usados en las hembras, sin embargo, recientemente el uso de métodos en

machos ha venido creciendo. La contracepción o anticoncepción es un conjunto de métodos o sustancias empleados para evitar la fecundación y por consiguiente la gestación (Killian, 2004, Kutzler, 2006, Statish,2014).

A pesar de que existen diversos métodos anticonceptivos, se deben evaluar de acuerdo a las características propias de cada especie. La elección debe tomarse con base al conocimiento de cada método, la experiencia y los resultados obtenidos y evaluar las ventajas y desventajas que el método puede implicar y las expectativas que se tengan de este. Debido a esto se han desarrollado nuevas estrategias de anticoncepción a través de la inmunidad, conocida como inmunoanticoncepción (Kutzler, 2006;Statish, 2014, Miller,1997).

La inmunoanticoncepción, es un método anticonceptivo a base de vacunas que utiliza el sistema inmunológico del animal produciendo anticuerpos que bloquean o inhiben la síntesis de algún factor indispensable para la reproducción. Se han desarrollado actualmente vacunas a base de GnRH, que actúan produciendo anticuerpos de forma temporal que se ligan a la GnRH producida por el animal impidiendo que se realice la comunicación del eje Hipotálamo – Hipófisis – Adrenales (Hennessy, 2008, Massei,2008).

Sin embargo su uso en la producción animal como herramienta para el manejo reproductivo no se ha realizado, debido a que no se han estudiado a fondo los cambios producidos por el efecto de la vacuna anticonceptiva a base de GnRH.

IV.- REVISIÓN DE LITERATURA

4.1.- Anatomía del Testículo

El aparato reproductor del conejo consiste en testículos, epidídimo, ampollas, conducto deferente, uretra, pene, glándulas prepucales y las glándulas accesorias, tiene la particularidad de retraer los testículos en el abdomen,

ausencia del glande en el pene y un escroto bien desarrollado craneal al pene, (Holtz y Foote, 1978; Brewer, 2006; Capello y Lennox, 2006; Fowler, 2015).

Uno de los órganos más importantes de sistema reproductivo del macho, son los testículos que presentan una posición horizontal al cuerpo y tienen una función fundamental, que es producir células germinales así como la síntesis de hormonas esteroideas; responsables de promover la reproducción así como de manifestar los caracteres secundarios propios de los machos. Se forman durante la fase embrionaria y derivan de los túbulos renales (Donnelly, 2004; Brewer, 2006).

Los testículos se sitúan en el escroto, cada uno en un lado de la línea inguinal, posicionados casi horizontalmente (Holtz y Foote, 1978). Durante los períodos de inactividad sexual o el estrés los testículos vuelven a la cavidad abdominal a través del anillo inguinal, y puede volver a bajar por la acción del músculo cremáster (Brewer, 2006; Capello y Lennox, 2006).

Las gónadas del macho son estructuras ovoides de unos 5.5 ± 0.79 centímetros (cm) de largo y un peso aproximado de 2.184 ± 5.5 gramos (g). Su posición depende de muchos factores, incluyendo la posición del cuerpo, la temperatura corporal, actividad reproductiva, la repleción del tracto gastrointestinal y cantidad de grasa abdominal y estrés (Fraser, 1988; Richardson, 2003; Donnelly, 2004; Brewer, 2006; Capello y Lennox, 2006; Castañeda, 2014).

4.2.- Histología del Testículo

Las cubiertas testiculares se componen por: 1) dartos; 2) fascia espermática externa, constituida por varias capas de tejido conjuntivo denso; 3) saco cremastérico, que corresponde a una capa formada por fibras musculares de tipo estriado, muy amplia en comparación con el resto de los componentes observados; 4) fascia espermática interna, la cual es imperceptible; 5) lámina parietal de la túnica vaginal; 6) lámina visceral de la túnica vaginal, ambas

separadas por la cavidad vaginal, 7) el estroma, compuesto por tejido conectivo denso que forma la túnica albugínea y los septos o tabiques que conforma al testículo en lobulillos de tejido conectivo laxo y 8) el parénquima compuesto por una red compleja de túbulos seminíferos en los cuales se encuentran principalmente células de Sertoli y el epitelio germinal en su lámina basal (Fraser, 1988; Donnelly, 2004; Capello y Lennox, 2006; Smok, 2009; McNitt, 2013).

El epitelio germinal del tubo seminífero contiene numerosas fases de células esferoidales diploides en su lámina basal y que mediante su maduración y procesos de división meiótica (espermatogonias, espermatocitos y espermátides) que migran hacia la luz o lumen del tubo permitiendo la liberación de espermatozoides maduros, gracias al soporte de las células de Sertoli que desarrollan funciones sustentaculares, nutriendo los espermatozoides en desarrollo. Debido a su función mecánica, de soporte, descarga de espermatozoides, así como ser una barrera fisiológica, posee numerosas mitocondrias (Asaad, 2011; Yasser, 2012; McNitt et al., 2013).

El tejido conectivo entre los túbulos seminíferos, denominado espacio intersticial, contiene tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos y las células de Leydig. Estas segregan testosterona (hormona sexual masculina) que controla los caracteres sexuales secundarios (Haltmeyer, 1969; Fraser, 1988; Castro, 2002; Brewer, 2006).

Las células de Leydig se localizan en conglomerados triangulares dentro del tejido conectivo vascular intersticial entre los túbulos seminíferos, presentan diferentes formas con un núcleo ovoide. Están bajo el control de las hormonas de la pituitaria anterior, que se encuentra en la base del cerebro y que a su vez están reguladas por las hormonas producidas por el hipotálamo, realizando un control de los niveles de andrógenos en sangre a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Brewer, 2006; Yasser, 2012; McNitt et al., 2013).

4.3.- Fisiología del Testículo

La función del testículo es controlada por el hipotálamo que secreta de forma pulsátil un decapeptido esencial para la reproducción de los mamíferos conocido como hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), se ha conservado sin cambios a través de la evolución en muchas especies animales (Miller et al, 2004b; Perry, 2008; Kirkpatrick, 2011; Benavides, 2011).

La GnRH se difunde en la eminencia media hacia los capilares del sistema porta hipofisiario para llegar a su sitio blanco, las células gonadotrópas de la hipófisis anterior, estimulando la producción y secreción de las gonadotropinas hipofisiarias, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que, se conducen por el torrente sanguíneo a través de la arteria testicular y permiten activar las funciones gonadales, la esteroidogénesis mediante la hormona luteinizante (LH), y la gametogénesis a través de la hormona folículo estimulante (FSH) (Killian, 2004; Nash, 2004; Kutzler; 2006; Perry, 2008; Benavides, 2011).

Se ha demostrado que altas frecuencias de pulsos de GnRH, estimula preferentemente la secreción de LH, mientras que bajas frecuencias de pulsos de GnRH favorecen la secreción de FSH (Recabarren, 2006).

Las funciones gonadales están íntimamente relacionadas porque se requiere la síntesis de esteroides, tanto para la producción y desarrollo de gametos, como para el desarrollo de las características sexuales secundarias, maduración de los genitales y de la conducta sexual (Krause, 2009, Statish, 2010).

El esteroide más importante sintetizado en el testículo es la Testosterona producida en las células de Leydig, teniendo una correlación positiva entre la masa de células de Leydig con la secreción de testosterona. Esta hormona es necesaria para iniciar la espermatogénesis en la pubertad y para el mantenimiento de la producción espermática. Se ha investigado que en algunas especies, los niveles de testosterona necesarios para mantener la espermatogénesis es alrededor de un 25 a 45% de los niveles normales (Ewing 1979; Castro, 2002).

El conocimiento de la anatomía, histología y fisiología e reproductiva ha permitido tener un control de los eventos dentro de los sistemas de producción que generalmente son orientados hacia incrementar las poblaciones animales o mejorar la calidad de los productos.

Sin embargo el manejo reproductivo se puede utilizar para, controlar los comportamientos y olores ligados al sexo, evitar o reducir las poblaciones animales o reducir la expresión de genes sobre representados en un grupo de animales por medio de métodos anticonceptivos (Kirkpatrick, 1999; Benavides, 2011).

4.4.- Métodos anticonceptivos

La anticoncepción es un procedimiento reversible para impedir o reducir la fertilidad. Existen numerosos procedimientos anticonceptivos que impiden el proceso reproductivo, ya sea a nivel del cerebro, glándula pituitaria, los ovarios, los óvulos, los testículos, el esperma o por algunas hormonas reproductivas (Kirkpatrick, 1999; Miller, 2002; Gobello, 2002; Miller, 2004a; Massei, 2008; Statish, 2010; Griffiths, 2011).

Existen en el mercado diferentes métodos anticonceptivos como los tratamientos a base de progestinas (levonogestrol, acetato de megestrol, acetato de melengestrol), agonistas de la GnRH, píldoras anticonceptivas (indenopyridina, bisdiamina), conocidos como tradicionales, que han demostrado tener respuestas variables y afectan el Bienestar Animal (Boulanger, 2012; Kutzler, 2006; Perry, 2008).

Recientemente, como medida emergente a la demanda creciente por el cuidado del Bienestar Animal, se realizan investigaciones en la búsqueda de diferentes alternativas que tengan menores consecuencias adversas y que su efecto sea temporal, como lo son la vasectomía reversible y la inmunoanticoncepción (Asa, 1993).

4.4.1.- Inmunoanticoncepción

En 1988 se desarrolló un método con el propósito de controlar el tamaño de poblaciones animales domésticas y silvestres que causan problemas a la sociedad, mediante una vacuna basada en proteínas que causan la producción de anticuerpos que interfieren en la síntesis de algún factor indispensable de la reproducción, conocido como inmunoanticoncepción (Kirkpatrick, 1999; Benavides, 2011).

Algunas de las ventajas principales de la inmunoanticoncepción es la capacidad de administrar dosis en volúmenes muy pequeños que tienen un efecto durante un periodo largo, de bajo costo y que se puede utilizar en hembras y machos (Miller, 2000; Delves, 2005; Kirkpatrick, 2011).

Actualmente se tienen 2 formas de realizar la inmunoanticoncepción, mediante el bloqueo en la zona pelúcida (ZP), a través de la proteína de la zona pelúcida porcina (PZP), previniendo la fecundación del óvulo, o mediante la producción de anticuerpos de GnRH que impiden su función (Kirkpatrick, 1999; Gobello, 2002).

4.5.- Vacuna

En cualquier vacuna se pueden diferenciar elementos de su composición: (1) el antígeno o componente activo, que es el componente que induce la respuesta inmune, generalmente se compone del hapteno y de una proteína portadora, (2) el excipiente que se compone de la solución o vehículo en el que va disuelto o emulsionado el componente activo para que sea posible su administración, así como sustancias conservadores que evitan la contaminación de la vacuna, (3) los adyuvantes, que tiene la función de mejorar la respuesta del organismo contra el antígeno (Bonneau, 1994; Cronin, 2003; Zamaratskaia, 2009; Rydhmer, 2010)

4.5.1.- Hapteno

Los haptenos son sustancias generalmente de bajo peso molecular que no inducen por si solas, la formación de anticuerpos, pero se combinan específicamente con ellos. Por lo tanto, es necesario conjugarlos con una proteína larga, de alto peso molecular y con mayores determinantes antigénicos que sirva como portador, para que a su vez, una vez inoculado, se logren los efectos inmunogénicos, mediante la respuesta de IgG (Kutzler, 2006).

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es una hormona de bajo peso molecular producida en el organismo, debido a esto, carece de propiedades inmunogénicas, ya que al administrarse en la vacuna, el organismo la reconoce como una sustancia alogénica (Miller, 2004^a, Perry, 2008; Kirkpatrick, 2011).

4.5.2.- Proteína portadora o de transporte

Para lograr los efectos de estimulación del sistema inmunológico, las sustancias de bajo peso molecular y/o producidas por el organismo, se acoplan a moléculas más complejas, que tengan en su composición mayores determinantes antigénicos, tal es el caso del acoplamiento del hapteno (GnRH) con proteínas inmunogénicas inactivadas y de alto peso molecular, como el toxoide tetánico, toxoide diftérico y la difteria que se utilizan como portadores de antígeno en las vacunas para desarrollar respuestas inmunes fuertes. Las vacunas conjugadas se realizan generalmente por enlaces covalentes y colocadas en un vehículo. (Guillen, 2009; Mota-Sánchez, 2009).

4.5.3.- Excipiente

El vehículo son las sustancias que componen la vacuna con el propósito de facilitar la preparación, conservación y aplicación de la sustancia activa, la proteína portadora y el adyuvante (Miller, 2004^a; Kirkpatrick, 2011).

4.5.4.- Adyuvante

Los adyuvantes son sustancias, preparados químicos o incluso bacterias generalmente no patógenas, que al administrarse junto con el antígeno de la vacuna potencian, incrementan, estimulan o modulan la respuesta inmune tanto a nivel celular como humoral, haciendo más efectiva y fuerte la respuesta inmunológica (Kirkpatrick, 2011).

Con la administración de adyuvantes, se logra emplear menos antígeno en la vacuna, mejorar el tiempo de respuesta, además de generar más anticuerpos específicos. Al tener un modo de acción inespecífico, incrementa la respuesta inmune a una gran variedad de antígenos (Miller, 2000; Miller, 2003; Statish, 2010).

Cuando se combina el antígeno con un potente adyuvante, la vacuna tiene la capacidad de estimular de forma persistente la respuesta inmune, dando como resultado la producción de anticuerpos por tiempo prolongado (Herbert, 2005, Perry, 2008; Kirkpatrick, 2011).

En el campo de la Medicina Veterinaria la eficacia del adyuvante en la inducción de una fuerte respuesta inmune es algo que se privilegia, tolerando incluso el hecho de utilizar algunos agentes a pesar de los posibles efectos colaterales principalmente debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad (Franco, 2004; Morris, 1999).

4.5.5.- Reacciones adversas

Al momento de aplicar las vacunas, pueden provocar reacciones no esperadas al animal que le fueron administrados los antígenos, siendo diferentes en todas las especies, a pesar que sean aprobadas por haber cumplido los requisitos de seguridad, eficacia, potencia y pureza, existe la posibilidad de tener efectos secundarios (Roth, 1999; Day, 2006).

Los efectos adversos o secundarios, pueden estar relacionados con solo un componente de la vacuna. Los efectos locales son particularmente derivados del adyuvante (Strasser, 2003). Se tienen datos de una serie de reacciones adversas

post vacunales que van desde una reacción en el sitio de la inyección, hasta los efectos que pueden comprometer la vida de los animales (McMillen, 1995). Novak. (2007) clasificó estas reacciones en 5 grados dependiendo la severidad de este teniendo a la clase I (No hay reacción relacionada con la vacuna); clase II (Formación de un nódulo, edema, fibrosis en el sitio de aplicación); clase III (Edema facial, urticaria generalizada); clase IV (Presencia de signos sistémicos: Fiebre, vómitos y diarreas); clase V (Anafilaxia, shock y muerte).

4.5.6.- Dosis

Es muy difícil establecer una dosis óptima capaz de generar la mejor respuesta inmunitaria, debido a muchos factores de la constitución de la vacuna y del individuo al cual se inmunizará, sin embargo se pueden establecer un rango de dosis mínima y máxima, con el propósito de conocer el intervalo medio donde se consiga la respuesta inmune esperada (Novak, 2007; Benavides, 2011).

Dosis pequeñas así como dosis muy elevadas de antígenos no producen títulos cuantificables de anticuerpos, y por lo tanto, no produce efecto. A este estado se le conoce como tolerancia inmunológica (Day, 2006).

Estudios reportados en cerdos, venados, perros, elefantes, ardillas canguros y caballos, indican que la utilización de dos aplicaciones de 400 µg - 800 µg con un intervalo de 4 a 5 semanas entre aplicaciones es suficiente para lograr el efecto (Miller et al, 2000; EFSA, 2004a; Miller et al, 2004b; NWRC, 2008; Massei, 2008; Kirkpatrick, 2011; Statish, 2010; Kirkpatrick, 2011; Benavides, 2011).

4.5.7.- Vía de Administración

Sin duda, el método más efectivo para la formación de anticuerpos es a través de la vacunación. Se ha demostrado que la cantidad de anticuerpos producidos es más rápida si se realiza por vía intramuscular, sin embargo es menos efectiva que la vía subcutánea (Phillips, 1989; Day, 2006; Novak, 2007)

4.6.- Vacuna a base de GnRH

Existen en el mercado diferentes vacunas a base de la hormona GnRH, que han sido utilizadas para la anticoncepción de las poblaciones animales, jugando un papel importante en el control de las poblaciones de distintos mamíferos como: ratas, bovinos, venados, caballos, ovejas, ardillas, perros y gatos; para prevenir comportamientos agresivos y reducir los olores ligados con la maduración sexual en machos de algunas especies (Miller et al, 2000; EFSA, 2004a; Miller et al, 2004b; NWRC, 2008; Massei, 2008; Kirkpatrick, 2011; Statish, 2010; Kirkpatrick, 2011; Benavides, 2011; Phraluk, 2015).

Se ha limitado el uso de la vacuna a base de GnRH, en realizar inmunocastración, aplicándose en animales de abasto y el control de plagas. Es decir no se ha explorado su aplicación en programas de manejo reproductivo.

Además de su funcionamiento eficaz como método anticonceptivo, investigaciones reportan que su uso mejora la calidad de la carne en animales de producción, así como de no pasar a la cadena alimenticia, viven más tiempo una vez que se eliminan los efectos fisiológicos de la actividad sexual y no tiene efectos en el comportamiento social de los animales (Miller et al, 2003; Miller et al, 2004a; Kirkpatrick, 2011; Kirkpatrick, 2011; Statish, 2010; Benavides, 2011).

4.6.1.- Mecanismo de acción de la vacuna GnRH + proteína de difteria + DEAE-celulosa (improvac ®)

La vacuna es manufacturada para la industria porcícola, su principio activo es un análogo sintético de GnRH que contiene solo 9 aminoácidos el cual se liga por enlaces covalentes a una proteína transportadora que se obtiene de la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. El toxoide de la difteria es estable, seguro, con propiedades altamente inmunogénicas y ampliamente usado en el desarrollo de vacunas para uso pediátrico DEAE-dextrano es usado como adyuvante, su excipiente es en base acuosa utilizando thiomersal como agente preservativo y urea como solubilizante (Dunshea et al. 2001; Hennesy 2008; Benavides 2011).

Al administrar el GnRH sintético de la vacuna, el animal lo reconoce como “antígeno”, iniciando la producción de anticuerpos que son capaces de ligarse con la GnRH producida por el cuerpo y evita que se acople a los receptores gonadotropos, provocando la supresión de la secreción de las hormonas FSH y LH (Benavides, 2011; Hennessy, 2008; Kirkpatrick, 2011).

La disminución de las hormonas gonadotropas produce una atrofia de las gónadas, por lo que en los machos, el tamaño y función de los testículos y las glándulas bulbouretrales disminuyen, provocando una supresión de la espermatogénesis, los niveles de testosterona se reducen y subsecuentemente una supresión de los comportamientos sexuales (Chillik, 2002; Perry, 2008; Benavides, 2011; Kirkpatrick, 2011).

Cuando se administra por primera vez los antígenos, provocan una pequeña respuesta inmunitaria, y se le conoce como estímulo primario. Este primer contacto provoca una respuesta inicial de menor intensidad, tras una serie de interacciones entre células T, Células presentadoras de antígeno (CPAs) y células B (Chillik, 2002, Miller, 2003).

El siguiente contacto con el mismo inmunógeno induce una respuesta secundaria que difiere de la primaria (más rápida, más amplia, más eficaz), como si el organismo “recordara” que ya había estado expuesto a ese inmunógeno antes. De hecho, la respuesta secundaria y las subsecuentes explotan el aumento del número de linfocitos específicos para el inmunógeno producidos durante la respuesta primaria. Esta respuesta también se llama “respuesta de memoria o anamnésica” y los linfocitos que participan en ella se denominan células de memoria (Berek, 1993; Regueiro, 2011).

El objetivo de una vacunación es la generación de células de memoria, conocidas como células de Memoria B y T que son las responsables de proveer una rápida y eficiente inmunidad después del segundo contacto con antígenos específicos (Sander, 1988; Berek, 1993).

La antigenicidad de una sustancia depende de la velocidad con la cual ésta es catabolizada por las células fagocitarias, es decir, a medida que la velocidad sea mayor, esta tendrá menor posibilidad de inducir la formación de anticuerpos (Kirkpatrick, 2011; Regueiro, 2011).

4.6.2.- Daños en el testículo

No existen reportes de efectos de la primera aplicación de la vacuna anticonceptiva a base de GnRH. Sin embargo, existen estudios que reportan cambios en el testículo después de una a dos semanas posteriores a la aplicación del refuerzo, en donde se observa disminución de la turgencia y longitud, posteriormente entre las 4 y 5 semanas, se ha demostrado que la vacuna alcanza su mayor efecto, observando una atrofia completa, con los testículos totalmente flácidos, la longitud se reduce aproximadamente hasta la mitad del tamaño normal. Esta atrofia persiste hasta por 12 semanas en cerdos, 8 a 10 semanas en cabras, 9 a 10 semanas en gatos y hasta de 16 a 24 semanas en equinos. Reportando azoospermia, reducción de espermatogénesis, teratozoospermia y atrofia testicular (Miller, 1997; Kirkpatrick, 2011; Miller, 2004b; Herbert and Trigg, 2005; Massei, 2008; Statish, 2014).

Sin embargo, la atrofia testicular puede ser un efecto deseado siempre y cuando el efecto no impacte en la salud del animal ni comprometa su reproducción futura (Pai, 2009). Estudios histológicos realizados en cerdos señalan que después de aplicada la vacuna anticonceptiva muestran signos de atrofia en testículos y epidídimos y una reducción significativa en peso (Hilbe, 2006).

A pesar de su probada eficacia como método anticonceptivo en diversas especies, su uso ha sido limitado en Producción Animal debido a que a pesar de que se ha reportado una posible regresión de la atrofia testicular, no existen estudios que

expliquen los cambios histológicos y fisiológicos que se generan en las gónadas para garantizar su reversibilidad (Miller, 2002).

V.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconocen los cambios histológicos y fisiológicos generados por la vacuna anticonceptiva a base de GnRH y si estos producen lesiones que comprometan el retorno de la funcionalidad de los testículos en conejos.

VI.- HIPÓTESIS

Los cambios histológicos y fisiológicos en los testículos del conejo producidos por la vacuna anticonceptiva a base de GnRH son temporales y no generan lesiones que comprometan su retorno a la funcionalidad.

VII.- OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

7.1 General:

- Evaluar los niveles séricos de testosterona y los cambios morfométricos e histológicos en testículos de conejos, a 4, 12 y 24 semanas posteriores a la administración de la vacuna anticonceptiva a base de GnRH.

7.2- Específicos:

- Evaluar los cambios en la morfometría testicular por el efecto de la vacuna.

- Detectar los cambios histológicos que pudiera haber en testículos a 4, 12 y 24 semanas posteriores a la aplicación del refuerzo de la vacuna anticonceptiva a base de GnRH.
- Valorar si la presencia de lesiones en testículos como consecuencia de la aplicación de la vacuna comprometen su funcionalidad.
- Determinar la concentración de Testosterona (T) sérica, a 4, 12 y 24 semanas posteriores a la aplicación del refuerzo de la vacuna.

VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en una granja cunícola de la ciudad de Morelia, Michoacán, México. La cual se encuentra ubicada entre las coordenadas 19°42'10"N 101°11'32"E, con una altitud de 1921 msnm, la clasificación climática de Koppen, corresponde a la formula $c(w1)(w)b(i)g$, predominando el clima templado, humedad media, precipitación pluvial anual de 773.5 mm y lluvias invernales máximas de 5 mm. La duración del día promedio anual es de 11:03:26 horas, con una humedad relativa media de 60% (INEGI, 2009).

Se utilizaron 30 conejos machos de razas productoras de carne, distribuidos al azar en 6 grupos de 5 conejos (C1, C2, C3, T1, T2 y T3), con una edad promedio de 2 meses y un peso de 2,328 gr.

Los conejos fueron colocados en jaulas comerciales individuales identificadas con numeración ascendente y se mantuvieron en un periodo de una semana de aclimatación.

Se utilizó un alimento comercial peletizado para conejo de experimentación (Labdiet ®) *ad libitum* con un 2.39 Kcal/g de energía metabolizable, 17% de proteína cruda, 2.5% de grasa, 18% de fibra cruda y 6.4% cenizas.

Una vez aclimatados los conejos, se realizó morfometría de los testículos registrando las mediciones de longitud y diámetro, tomando como referencia la línea media. Este procedimiento se realizó cada semana durante todo el estudio.

Los conejos de los grupos T1, T2 y T3 recibieron la vacuna anticonceptiva a base de GnRH (Improvac®), 2.0 ml vía subcutánea (SC) en la base del cuello; mientras que los conejos de los grupos C1, C2 y C3 recibieron 2.0 ml de solución salina fisiológica. A las 4 semanas se repitió el tratamiento en todos los grupos.

Para observar los cambios histológicos en testículos se sacrificaron conejos en diferentes momentos: 4, 12 y 24 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento. Los animales fueron sacrificados de acuerdo al procedimiento señalado por la NOM-033-ZOO-1995. Se realizó la orquiectomía, y los testículos fueron conservados en Solución de Bouin para tejidos blandos (McClung, 1966).

Para el proceso histológico se tomaron muestras realizando un corte longitudinal para el testículo izquierdo y un corte transversal para el testículo derecho, y se colocaron en *cassettes* de inclusión para su deshidratación, aclaramiento (desalcoholización o diafanización), infiltración e inclusión para tejidos blandos (McClung, 1966).

Posteriormente las muestras se colocaron en bloques de parafina para realizar cortes de 5 μm y teñirlos con coloración corriente de Hematoxilina y Eosina (H.E) (McClung, 1966; Drury, 1967; Humason, 1972).

Con el propósito de evaluar las características de los testículos en los cortes histológicos en diversos aumentos, se utilizaron objetivos de 10x, 40x y 100x. En túbulos seminíferos se observó su luz, la identificación, conformación y tamaño de la zona espermatogénica, así como la concentración y forma y la conformación de la lámina basal. En el Intersticio se observó la presencia tejido conectivo fibroso, la identificación de los septos o tabiques testiculares y conglomerados triangulares donde se ubican las células de Leydig.

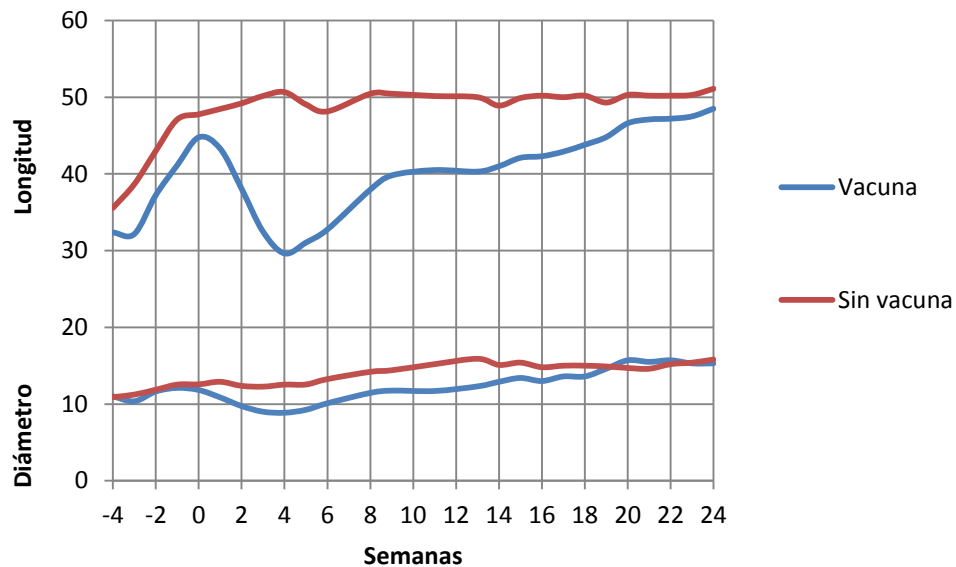
Para medir los niveles séricos de testosterona se tomó una muestra de sangre una hora antes del sacrificio, y se determinaron mediante la técnica de electroquimioluminiscencia.

Los resultados de la morfometría testicular y niveles séricos de testosterona fueron analizados mediante técnicas de estadística descriptiva. Los cambios histológicos y las lesiones fueron descritos cualitativamente.

IX.-RESULTADOS.

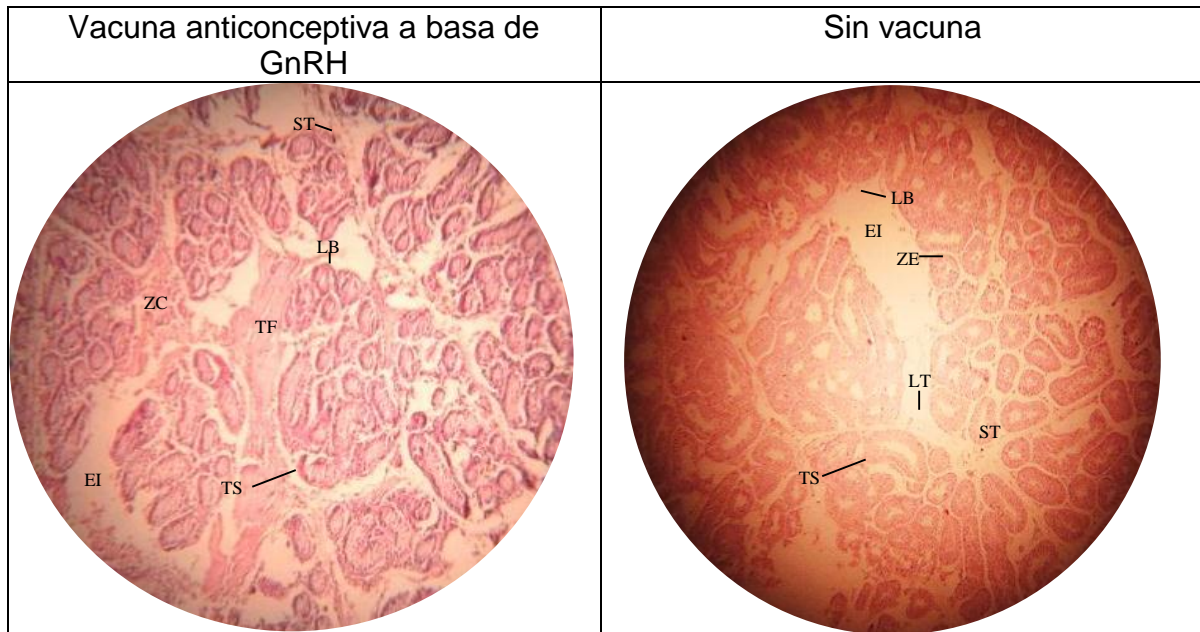
En la morfometría testicular se observó el mayor efecto en la disminución del diámetro y longitud 4 semanas después de aplicado el refuerzo de la vacuna anticonceptiva a base de GnRH. A partir de la semana 6, se observó un incremento gradual de la longitud y diámetro hasta el término del experimento. En contraste, en los conejos no vacunados, el crecimiento fue gradual hasta la semana 4 para la longitud y hasta la semana 10, para el diámetro para posteriormente mantener su tamaño hasta la conclusión del experimento (Fig. 1).

Figura 1.- Morfometría testicular media de conejos tratados con vacuna anticonceptiva a base de GnRH respecto a los no tratados (mm).



Los cambios histológicos observados, a un objetivo de 10x, a las 4 semanas posteriores de la segunda aplicación de la vacuna anticonceptiva a base de GnRH fueron: túbulos seminíferos pequeños, difusos, sin luz, sin identificación de la zona de crecimiento espermatogénico y lámina basal indefinida; espacio intersticial con abundante tejido conectivo fibroso y zonas de congestión. En contraste, en el grupo no vacunado los túbulos seminíferos fueron de un tamaño correspondiente a su edad, con formas cilíndricas contorneadas, apreciándose su luz y zona de crecimiento espermatogénico; septos testiculares delimitados (Fig. 2).

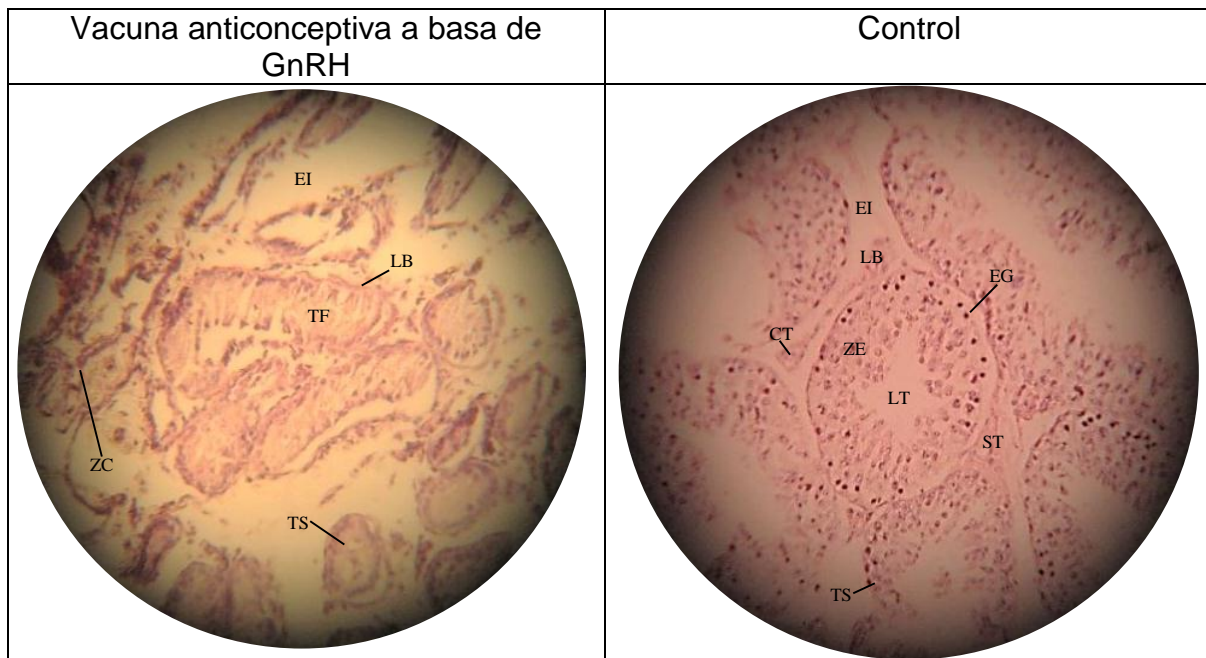
Figura 2.- Cambios histológicos de conejos de 4 meses de edad a 4 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (x10).



EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; ST= Septos testiculares; TF= Tejido Fibroso (abundante en espacio intersticial con presencia de colágeno); TS=Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica.

En los conejos que se administró la vacuna de GnRH a 4 semanas posteriores de la segunda aplicación, con el objetivo 40x, se observaron túbulos seminíferos difusos, sin luz y de menor tamaño, presencia de tejido conectivo fibroso en su interior, sin zona de crecimiento espermatogénico, ni delimitación con la lámina basal. En el espacio intersticial se observaron zonas de congestión sin la presencia de conglomerados triangulares. En el grupo de conejos no vacunados se observaron túbulos seminíferos cilíndricos, delimitados por su lámina basal, con presencia de luz y una zona espermatogénica con presencia de espermatogonias. Se apreciaron conglomerados triangulares en el espacio intersticial (Fig. 3).

Figura 3.- Cambios histológicos de conejos de 4 meses de edad a 4 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (x40).



CT= Conglomerado Triangular; EG= Espermatogonias; EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; ST= Septos testiculares; TF= Tejido Fibroso; TS= Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica.

Con objetivo de 100x en conejos vacunados se identificaron túbulos seminíferos con formas ligeramente definidas, sin luz, delgada capa de células en la zona espermatogénica sin delimitarse de su lámina basal; el intersticio se observa con fibrina. En el grupo de conejos no vacunados se observaron túbulos seminíferos debidamente conformados, identificando su lámina basal y la zona espermatogénica con presencia de células germinales y luz. En el espacio intersticial se observaron conglomerados triangulares (Fig. 4).

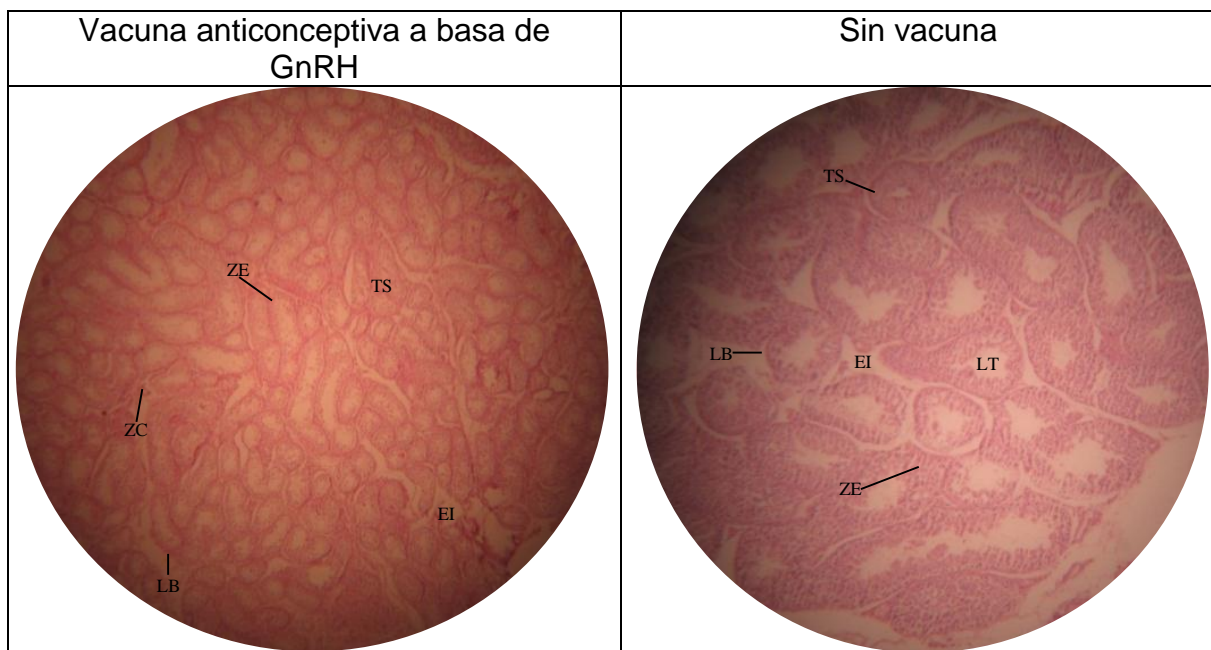
Figura 4.- Cambios histológicos de conejos de 4 meses de edad a 4 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (x100).



CT= Conglomerado Triangular; EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; TF= Tejido Fibroso; TS= Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica.

12 semanas posteriores a la segunda aplicación de la vacuna, con objetivo de 10x se observaron túbulos seminíferos pequeños con relación al tamaño del grupo que no vacunado, ligeramente contorneados, lámina basal sin diferenciarse de la zona de crecimiento espermatogénico, sin luz, espacio intersticial con zonas de congestión. En los conejos no vacunados se observaron túbulos seminíferos con formas cilíndricas, de tamaño correspondiente a su edad, con luz, contorneados, identificando la zona de crecimiento espermatogénico y su lámina basal (Fig. 5).

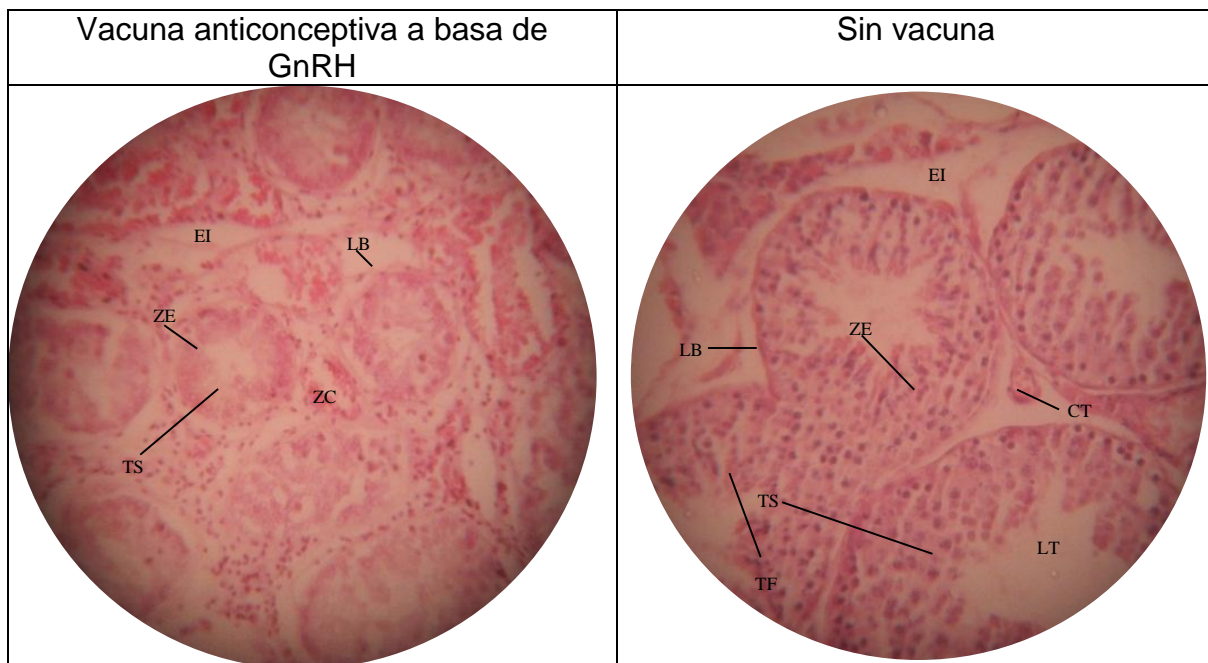
Figura 5.- Cambios histológicos de conejos de 6 meses de edad a 12 semanas posteriores a la segunda aplicación tratamiento (x10).



EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; ST= Septos testiculares; TF= Tejido Fibroso; TS= Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica.

Con el objetivo de 40x, en conejos vacunados después de 12 semanas de la segunda aplicación del tratamiento, se observaron túbulos seminíferos reducidos respecto al grupo no vacunado, sin delimitar su lámina basal, sin luz y ligera congestión en la zona de crecimiento espermatogénico. En el espacio intersticial se observó fibrina. En conejos no vacunados se observaron túbulos seminíferos, contorneados, con luz y de forma cilíndrica, en la zona espermatogénica se aprecian algunas células germinales, dentro del espacio intersticial se apreciaron conglomerados triangulares (Fig. 6).

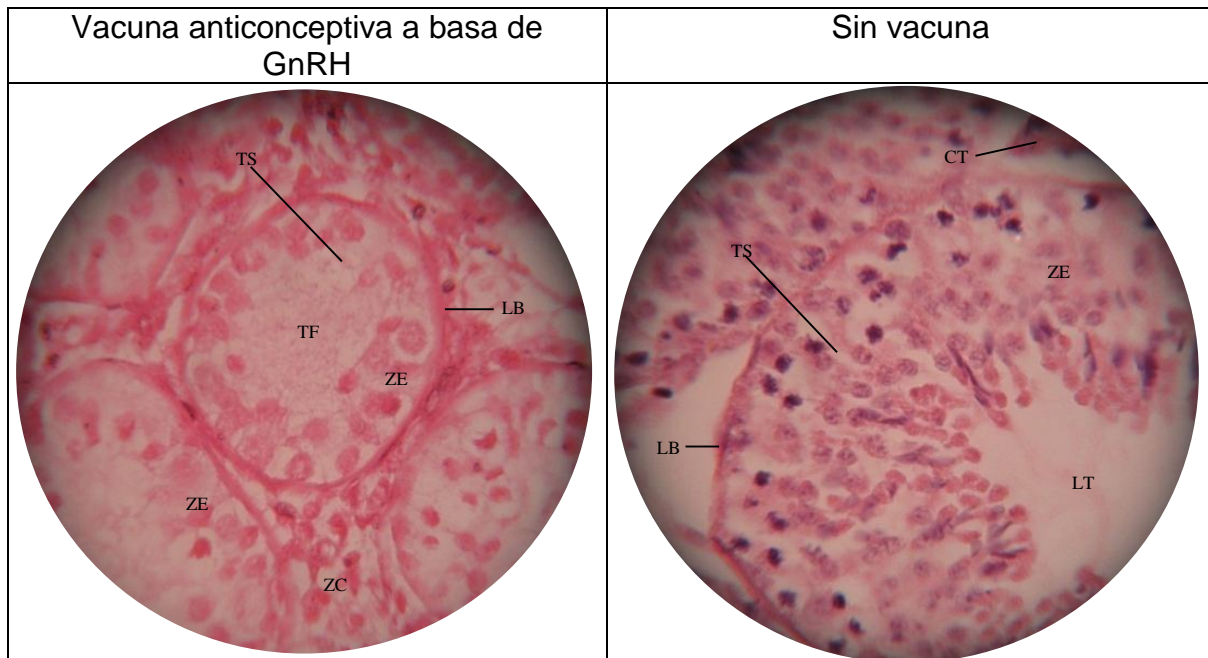
Figura 6.- Cambios histológicos de conejos de 6 meses de edad a 12 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (x40).



CT= Conglomerado Triangular; EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; TF= Tejido Fibroso; TS= Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica.

El grupo que recibió la vacuna a base de GnRH luego de 12 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento con objetivo de 100X se observó, túbulos seminíferos contorneados, de forma cilíndrica, sin luz, y presencia de tejido conjuntivo fibroso, lámina basal engrosada, zona espermatogénica con una delgada capa de células, abundante fibrina en el espacio intersticial y escasas zonas de congestión. En el grupo de conejos no vacunados se observaron túbulos seminíferos contorneados, con luz, zona espermatogénica con varias capas de células diferenciadas, lámina basal definida y presencia de conglomerados triangulares en el intersticio (Fig. 7).

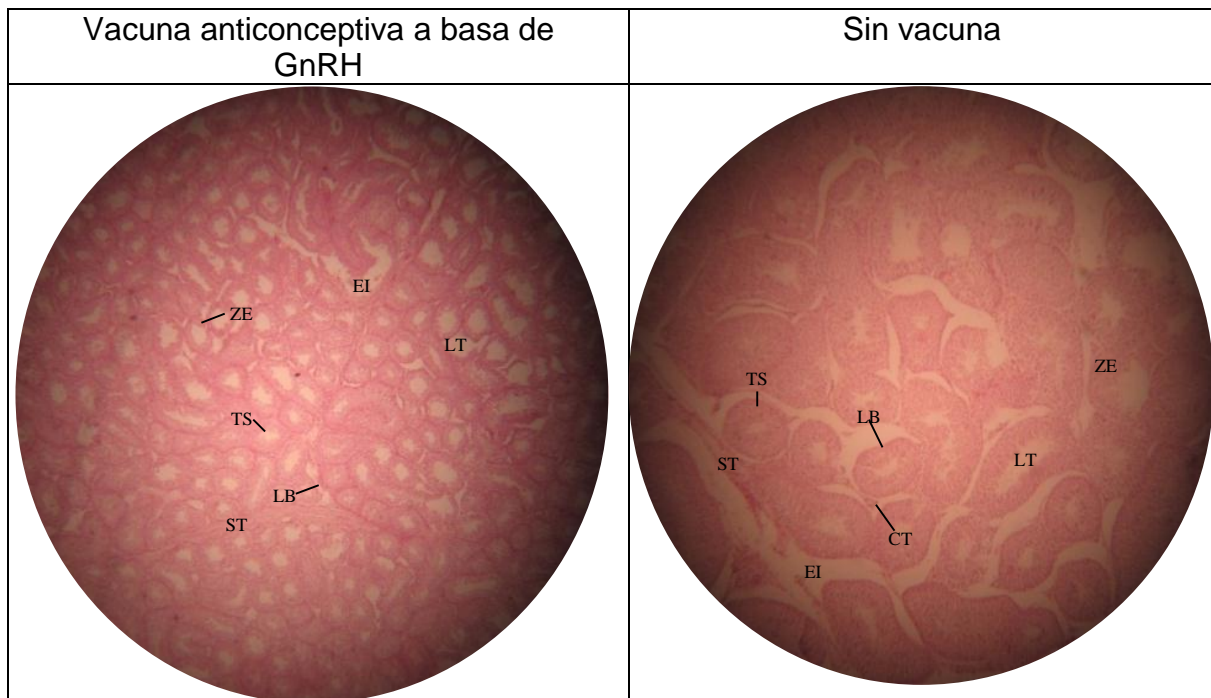
Figura 7.- Cambios histológicos de conejos de 6 meses de edad a 12 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (x100).



CT= Conglomerado Triangular; EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; TF= Tejido Fibroso; TS= Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica (En el grupo sin vacuna se observan diferentes células germinales).

Después de 24 semanas posteriores a la segunda aplicación de la vacuna con objetivo de 10x se observaron túbulos seminíferos ligeramente definidos, circulares, luz y con zona espermatogénica, espacio intersticial reducido. En el grupo sin vacuna se observaron los túbulos seminíferos de un tamaño correspondiente a su edad, cilíndricos, contorneados, apreciándose su luz y zona de crecimiento espermatogénico, conglomerados triangulares en el espacio intersticial (Fig. 8).

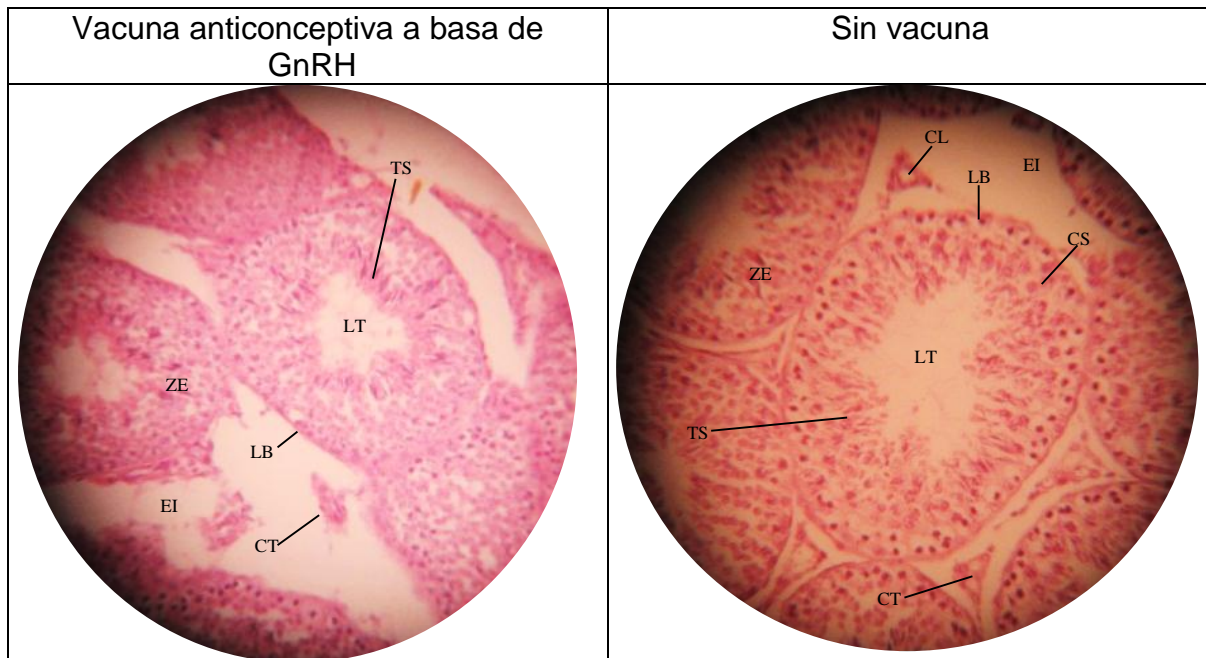
Figura 8.- Cambios histológicos de conejos de 9 meses de edad a 24 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (x10).



CT= Conglomerado Triangular; EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; ST= Septos testiculares; TF= Tejido Fibroso; TS= Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica.

En el grupo de animales que recibieron la vacuna de GnRH a 24 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento con objetivo de 40x se observaron túbulos seminíferos definidos, circulares, ligeramente reducidos en tamaño respecto al grupo no vacunado, con luz, lámina basal congestionada y diferenciada de la zona espermatogénica, en el espacio intersticial se identificaron algunos conglomerados triangulares. En el grupo sin vacuna se observaron túbulos seminíferos contorneados de forma cilíndrica, con luz, la zona espermatogénica con células germinales y diferenciadas de su lámina basal, conglomerados triangulares en el espacio intersticial (Fig. 9).

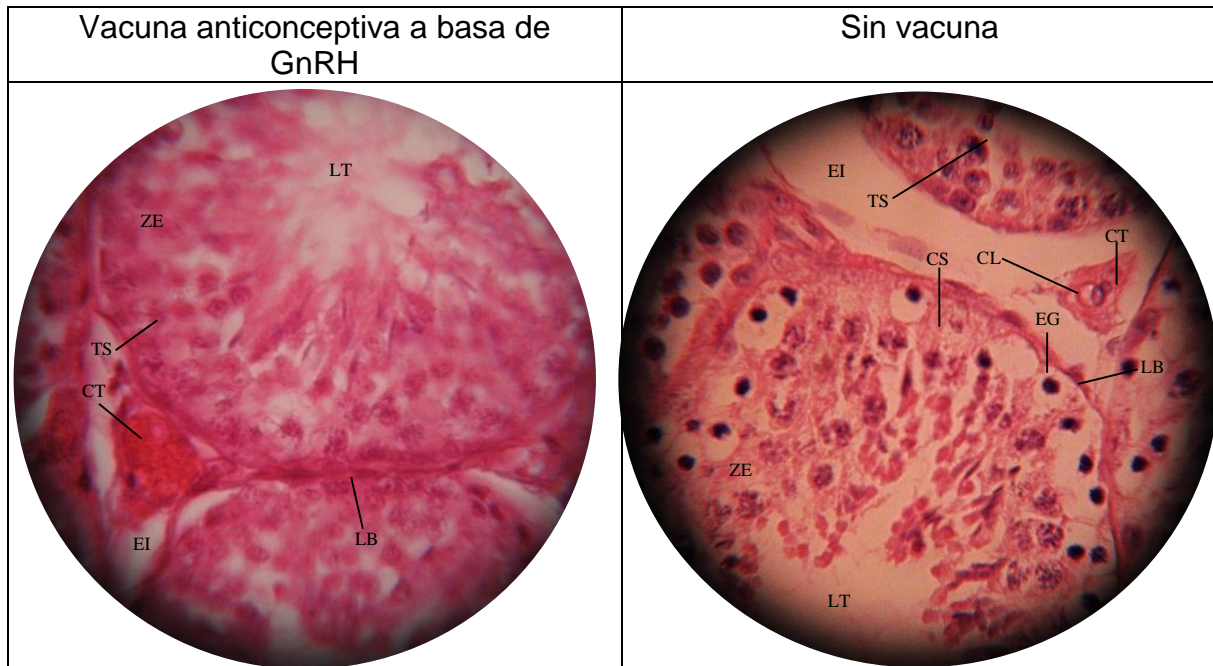
Figura 9.- Cambios histológicos de conejos de 9 meses de edad a 24 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (x40).



CL= Células de Leydig; CS= Células de Sertoli; CT= Conglomerado Triangular; EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; ST= Septos testiculares; TF= Tejido Fibroso; TS= Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica.

Los cambios histológicos observados, a un objetivo de 100x, a las 24 semanas posteriores de la segunda aplicación de la vacuna anticonceptiva a base de GnRH fueron: túbulos seminíferos de tamaño similar respecto al grupo de conejos no vacunados, hiperemia, lámina basal congestionada, presencia de luz, zona de crecimiento espermatogénico engrosada, células diferenciadas en la zona espermatogénica. En el espacio intersticial se observaron conglomerados triangulares congestionados. En el grupo de conejos no vacunado se observaron túbulos seminíferos contorneados de forma cilíndrica, con luz, células germinales en la zona espermatogénica y conglomerados triangulares en el espacio intersticial (Fig. 10).

Figura 10.- Cambios histológicos de conejos de 9 meses de edad a 24 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (x100).



CL= Células de Leydig; CS= Células de Sertoli; CT= Conglomerado Triangular;EG= Espermatogonia; EI= Espacio Intersticial; LB= Lámina basal; LT= Luz del Túbulo; ST= Septos testiculares; TF= Tejido Fibroso; TS= Túbulo seminífero; ZC= Zonas de Congestión; ZE= Tamaño de la Zona Espermatogénica.

Los cortes histológicos de testículos de conejos tratados con una vacuna anticonceptiva a base de GnRH a 4, 12 y 24 semanas posteriores a la aplicación del refuerzo, muestran que no existen lesiones que comprometan la actividad reproductiva.

Los niveles de testosterona sérica en los animales tratados con la vacuna anticonceptiva a base de GnRH tienen menores concentraciones séricas de testosterona ($p < 0.05$) en todos los tiempos evaluados (Cuadro 1). Sin embargo, la concentración a las 24 semanas de los animales vacunados fue similar ($p > 0.05$) al grupo no vacunado a las 4 semanas.

Cuadro 1. Concentración sérica de testosterona ($\mu\text{g/dl}$) en conejos posteriores a la segunda aplicación del tratamiento (promedio \pm E.E).

Semana	Vacuna anticonceptiva a basa de GnRH	Sin vacuna
4	17.4 ^{a*} \pm 49.0	163.5 ^b \pm 49.0
12	67.3 ^a \pm 49.0	564.0 ^b \pm 49.0
24	126.9 ^a \pm 49.0	1183.0 ^b \pm 49.0

*Literales diferentes dentro de filas indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

X.- DISCUSIÓN

Los conejos tratados con la vacuna anticonceptiva a base de GnRH sufrieron un retraso en el desarrollo testicular, debido al estímulo primario que genera la aplicación de la primera dosis de la vacuna. Este efecto fue reportado por Zamaratskaia (2008) en cerdos, quien menciona que después de la primera aplicación de la vacuna se origina la activación del sistema inmune para el reconocimiento del antígeno aplicado, pero es insuficiente para generar los anticuerpos necesarios que interrumpan la comunicación Hipotálamo – Hipófisis – Gónadas y lograr la inhibición de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por ende la inhibición de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

La administración del refuerzo de la vacuna ocasiona una respuesta anamnésica o de memoria, que es más rápida, fuerte y efectiva para la producción de linfocitos B que la primera aplicación de la vacuna (Tizard, 2008), lo cual da origen a la producción de anticuerpos en las células plasmáticas, que ocasiona el bloqueo o inhibición de la GnRH al formarse el complejo Antígeno–Anticuerpo. Este complejo tiene una conformación tal, que impide pasar por difusión hacia los canales de la Hipófisis, donde se encuentran los receptores de GnRH responsables de la síntesis y liberación del FSH y LH al torrente sanguíneo. Debido a ello, las células de Leydig de las gónadas en los conejos vacunados no recibieron el estímulo necesario para la síntesis de esteroides, principalmente testosterona, así como para el mantenimiento de la espermatogénesis, lo que da como resultado que se active una respuesta inespecífica conocida como inflamación aguda. Serhan (2010) describe a este proceso tisular como el primer mecanismo del organismo para el restablecimiento o reparación del órgano o tejido afectado, controlado por eventos secuenciados como: vasoconstricción, mediada por impulsos nerviosos; vasodilatación, regulada por mediadores químicos e hiperemia; extravasación, con presencia de fibrina derivada de la descomposición de fibrinógeno; congestión, aumento de la viscosidad sanguínea y estasis; quimiotaxis; contacto, reconocimiento englobamiento y degradación.

El mayor efecto producido por la vacuna a base de GnRH sobre la morfometría testicular (diámetro y longitud) se observó en la semana 4. Estos resultados son similares a los reportados por Miller et al. (2000); EFSA. (2004^a); Miller et al. (2004b); NWRC. (2008); Massei. (2008); Zamaratskaia. (2008); Kirkpatrick. (2011); Statish. (2010); Kirkpatrick. (2011); Benavides. (2011), quienes reportan que los cambios producidos por la vacuna anticonceptiva a base de GnRH, tienen su mayor efecto entre las semanas 4 y 5.

A medida que transcurre el tiempo el efecto de la vacuna disminuye, debido a que las poblaciones de células de memoria inmunológica descienden como

consecuencia de la reducción de las concentraciones de antígeno o del complejo antígeno-anticuerpo necesarias para que persista la estimulación de células B en su mecanismo de activar la respuesta humoral. La duración del efecto de la vacuna anticonceptiva a base de GnRH depende de la especie que se inmunice y puede ser entre 3 y 18 meses de acuerdo a lo reportado por Kirkpatrick. (2011); Miller, (2004b); Herbert and Trigg, (2005); Massei, (2008); Statish. (2014). Estos cambios se observaron con el comienzo gradual en el aumento de tamaño de los testículos de los conejos tratados con la vacuna anticonceptiva a base de GnRH.

Durante este tiempo y como parte del mecanismo de recuperación de la funcionalidad testicular da comienzo la fase proliferativa que Serhan (2010) describe como una serie de pasos no seriados de angiogénesis, con la formación de nuevos vasos; deposición de colágeno; formación de tejido granular, como consecuencia de la reparación celular; proliferación de fibroblastos, que dan el color característico eritematoso, y epitelización.

Posteriormente se continúa con el proceso de maduración y remodelación del tejido, que inicia cuando se igualan los niveles de producción y degradación de colágeno. Puede tener una duración variable, dependiendo del daño del tejido u órgano, edad del animal, condición corporal, entre otras causas. Con el paso del tiempo se pierde su apariencia eritematosa ya que los vasos sanguíneos que dejan de ser necesarios son eliminados mediante apoptosis (Greenhalgh, 1998). Debido a este proceso de inflamación los conejos inmunizados a base de GnRH no alcanzaron los niveles de crecimiento testicular de los conejos no inmunizados.

El incremento en la morfometría testicular en las primeras semanas del experimento también se puede atribuir a que se utilizaron conejos jóvenes de una edad aproximada de dos meses y que, de acuerdo con Holtz (1978), alcanzan su madurez después de los seis o siete meses de edad.

A medida que se alcanza la madurez sexual los testículos, una vez localizados en el escroto, son más pesados, firmes y de color rojo (Fraser, 1988), características que fueron observadas durante los últimos meses del experimento en los conejos no inmunizados.

Las evaluaciones histológicas de los testículos de los conejos inmunizados muestran que los mayores efectos encontrados fueron a las 4 semanas de la segunda aplicación del tratamiento, que coincide con lo reportado por Brunuis (2010) quien menciona que los testículos del cerdo se ven drásticamente afectados posterior a la aplicación del refuerzo de la vacuna, observando disturbios en la zona espermatogénica y un decremento de células de Leydig, derivados del proceso de inflamación y observados con zonas de congestión, hiperemia, atrofia como resultado del efecto inhibitor de la vacuna contra la GnRH que al ser conjugada con los anticuerpos se imposibilita su paso hacia los receptores hipofisarios que producen y sintetizan FSH y LH, hormonas responsables del mantenimiento de la función esteroideogénica y de gametogénesis, lo que da como resultado la pérdida del tamaño y funcionalidad del testículo.

En estudios en ratas y ovejas tratadas con una vacuna a base de GnRH, señalan que los cortes histológicos de testículo mostraban una pérdida de la espermatogénesis después de aplicado el refuerzo de la vacuna (Ferro, 2004). Hecho que puede ser atribuible a la disminución de la zona de crecimiento espermatogénico encontrada durante las primeras 12 semanas posteriores a la segunda aplicación del tratamiento en este estudio.

En las investigaciones realizadas por Asa. (1993) Miller. (1992, 2000, 2004^a, 2004^b), Chillik (2002) Killian. (2004), Kirkpatrick; Herbert. (2005), (2009,2011), Hennessy (2008), Boulanger (2012) sugieren que la vacuna anticonceptiva a base de GnRH puede ser reversible, debido a que observo el retorno del tamaño testicular, presencia de libido y fertilidad en algunos casos. Esto es comprobable debido a que en este estudio los túbulos seminíferos a pesar de verse afectados

en su tamaño y forma, no se observó necrosis ni lesiones que comprometieran su funcionalidad, permitiendo el desarrollo de las células germinales en la lámina basal y un retorno del tamaño testicular.

La anatomía del testículo está íntimamente relacionada con su funcionamiento, teniendo una correlación positiva entre la masa de células de Leydig con la secreción de testosterona reportada por Ewing. (1979) en ratas, conejos, cueros, perros y hamsters. Por lo que en este estudio al disminuir el tamaño testicular a consecuencia de la reducción en el número de células de Leydig se observó una disminución en la concentración de testosterona sérica. Hafez *et al.* (2002) señalan que en el caso de la atrofia testicular, existe una disminución en el número y el tamaño de las células de Leydig, y por lo tanto será alterada la producción de testosterona.

En estudios realizados por Killian (2005) en ciervos rojos reportó que los niveles bajos de testosterona afectan el desarrollo de la cornamenta, el comportamiento y la masa corporal. En los conejos tratados, las células de Leydig responsables de la producción de testosterona se atrofiaron en las primeras semanas después de la segunda aplicación de la vacuna a base de GnRH, por lo que las concentraciones de testosterona bajaron; cuando el proceso de inflamación disminuyó por efecto de la baja concentración del complejo antígeno-anticuerpo, se suspendió el efecto supresor de GnRH permitiendo la síntesis y liberación de FSH y LH en hipófisis anterior, desencadenando el desarrollo de células de Leydig para la producción de testosterona y la gamatogénesis, lo que explica el aumento gradual en la concentración de testosterona hasta el final del experimento.

XI.- CONCLUSIÓN

La vacuna anticonceptiva a base de GnRH en conejos tiene efectos temporales en los cambios histológicos y fisiológicos en los testículos sin generar lesiones que comprometan su funcionalidad, lo que permitiría ampliar su uso en el manejo reproductivo y de comportamiento en animales de alto valor genético, de compañía y fauna silvestre.

XII.- REFERENCIAS

Asa C. S. (1993). The development of contraceptive methods for captive wildlife. *Contraception in wildlife management*. Paper 2

Benavides G. (2011). Induction of anoestrus in free-ranging african elephant (*loxodonta africana*) cows using a gonadotrophin-releasing hormone vaccine. (Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias). Facultad de ciencias veterinarias de la Universidad de Pretoria. Pp 12-22.

Berek C, Ziegner M. (1993). The maturation of the immune response. *Immunology Today*. 14(8):400-4.

Bonneau M., Dufour R., Chouvet C., Roulet C. and Squires E.J., (1994). The effects of immunization against Luteinizing Hormone-Releasing Hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint-related compounds in intact male pigs. *Journal of Animal Science*, 72, 14-20.

Boulanger J. R., et al., (2012) Sterilization as an alternative deer control technique: a review. *Human-Wildlife Interactions* 6(2):273-282.

Brewer N. R. (2006). Historical special topic overview on rabbit comparative biology: Biology of the Rabbit. *Journal American Association laboratory Animal Science* 45: 8- 24

Capello V., Lennox A.M. (2006). Gross and surgical anatomy of the reproductive tract of selected exotic pet mammals. *Association of Avian Veterinarians*. 19-28.

Castañeda Velázquez s, Cano Torres R, Felipe-Pérez Y. (2014) Rabbit testis morphometric study. V congreso americano de cunicultura, México.

Castro AC, Berntson WE, Cardoso FM. (2002). Plasma and testicular testosterone levels, volumen density and number of Leydig cells and

spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35: 493-498.

Chillik, C. (2002). Agonistas y Antagonistas de GnRH en Reproduccion Asistida. *Revista de Endocrinología Ginecología y Reproducción*. Vol IX Número 3- pp22 - 33.

Day M. J. (2006) Vaccine side effects: fact and fiction. *Veterinary Microbiology* 117(1):51-8.

Delves P. J., Roitt I. M. (2005). Vaccines for the control of reproduction—status in mammals, and aspects of comparative interest. *Journal of Developmental Biology* 21:265-73.

Donnelly T. M. (2004).. Section 2: Rabbit. Basic anatomy, physiology and husbandry. In: K.E. Quesenberry and J.W. Carpenter (eds), *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Philadelphia, AP: Elsevier. 136 – 146

Drury, R. A. B. and Wallington, E. A.(1967) *Carlton's Histological Technique*, fourth edition. Oxford University Press, London, 1967.

Ewing L.L., Zirkin B.R., Cohran R.C., Kromann N., Peters C. and Ruiz-Bravo N. (1979). Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hámster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, 105: 1135-1142.

Ferro V. A. (2004). Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I)--a histological comparison in male animals. *Veterinary Immunology Immunopathology.*; 101 (1-2): 73-86.

Fraser KW. (1988). Reproductive biology of rabbits, *oryctolagus cuniculus* (L.), in Central Otago, New Zealand. *New Zealand Journal. Ecology*. 11: 79-88.

Fowler M. and Miller E. (2015). Zoo and wild animal medicine. Vol. 8. Elsevier Sounders p.827

Franco D., Giraldo M. y Patiño P. (2004). Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol 17:3.

Greenhalgh D. G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30 (9): 1019-1030.

Guillen D., Moreno-Mendieta S., Rodríguez-Sanoja R. (2009). Microorganismos y Virus: Herramientas clave para el desarrollo de vacunas. *BioTecnología*, vol. 13 No. 1.

Gobello C., Corrada Y., (2002). Control de la Reproducción en carnívoros de Zoológico. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*; 13(1): 1-5.

Griffiths A. L., (2011). The behaviour of badgers (*Meles meles*) in response to a period of pre-baiting and trapping undertaken for disease management research. Tesis para obtener el grado de Maestría por la Universidad de Exeter.

Hafez E. S. E y Hafez B. (2002). Reproducción e inseminación artificial. McGraw Hill. México.

Haltmeyer, G and Eik-Nes, K. (1969). Plasma levels of Testosterone in Male Rabbits Following Copulation. *Journal of. Reproduction. Fertility*. 19, 273 – 277.

Herbert, C. and Trigg, T. E., (2005). Applications of GnRH in the control and management of fertility in female mammals. *Animal Reproduction Science* 88, 141–153.

Hennessy, D. (2008). Improvac. Mode of action. Technical bulletin, Pfizer Animal Health.

Hilbe, M. et al. (2006). Histomorphological and immunohistochemical findings in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets. *schweizer archiv für tierheilkunde journal*, 148(11), pp. 599–608

Holtz, W and Foote, H. (1978). The anatomy of the reproduction system in male Dutch rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with special emphasis on the accessory sex glands. *Journal of Morphology*. 158: 1 – 20

Humason, G. L. (1972). Animal Tissue Techniques, third edition. W.H. Freeman, San Francisco.

INEGI, (2009). Prontuario de Información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos.

Killian, G., Miller, L. A., Diehl, N. K., Rhyan, J., and Thain, D. (2004). Evaluation of three contraceptive approaches for population control of wild horses. *Vertebrate Pest Conference*. 21, 263–268.

Killian, G., Wagner D. and Miller, L. (2005). Observations on the use of the GnRH vaccine Gonacon™ in male White-tailed deer. Proceedings of the 11th Wildlife Damage Management conference.

Kirkpatrick, J. F. (1999). Control de la fertilidad en la vida salvaje: un nuevo paradigma para el tratamiento humano de animales. *Teorema*. Vol XVIII/3. pp 137–148.

Kirkpatrick J.F., Lyda R.O., Frank K. M., (2011). Contraceptive vaccines for wildlife: a review. *American Journal of Reproduction Immunology*, 66: 40–50.

Kutzler, M. A. Wood. 2006. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 66. 514 – 525.

Krause, W. K. H and Naz R. K., (2009). Immune Infertility Springer, Verlag Berlin Heidelberg.

Massei G., Cowan D. P, Coats J., Gladwell F, Lane J. E. and Miller L. A., 2008. Effect of the GnRH vaccine GonaCon on the fertility, physiology and behavior of wild boar. *Wildlife Research* 35, 540 – 547.

McMillen GL, Briggs DJ, McVey DS, Phillip RM, Jordon FR. (1995) Vaccination of racing greyhounds: effects on humoral and cellular immunity. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 49(1-2):101-13.

McClung, J. R. (1966). Basic Microscope Technics. University of Chicago Press, Chicago

McNitt J. I., Lukefahr S. D., Cheeke P. R., Patton N. M. (2013). Rabbit Production, 9th Edition. CABI Publishing.

Miller, L.A., Johns, B.E. Elias D.J and Crane K.A. (1997). Comparative efficacy of two immunocontraceptive vaccines. *Vaccine*. Vol 15, No 17/18 pp. 1858 – 1862.

Miller, L. A., Johns, B. E., Elias D. J. and Killian, G.J. (2000). Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *American Journal of Reproductive Immunology*, 44: 266-274.

Miller, L. A. (2002). Reproductive control methods. Encyclopedia of pest management. Marcel Dekker, New York. pp.701 – 704.

Miller, L. A., Rhyan, J. C., and Killian, G. J. (2003). Evaluation of GnRH contraceptive vaccine using domestic swine as a model for feral hogs. *Wildlife Damage Management Conference 10*, pp.120–127.

Miller, L. A., Rhyan, J. C., and Drew, M. (2004^a). Contraception of bison by GnRH vaccine: A possible means of decreasing transmission of brucellosis in bison. *Journal of Wildlife Diseases* 40, 725–730.

Miller, L. A., Rhyan, J, and Killian, G., (2004^b). Gonacon a versatile GnRH contraceptive for a large variety of pest animal problems. USDA National Wildlife Research Center Staff Publications.

Morris H. J., Martínez C. Abdala R. (1999) Adyuvantes Inmunológicos. *Revista Cubana de Investigación Biomedica* 18(2): 13 – 70.

Mota-Sánchez, Javier. (2009). Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Pública de México* Vol. 51 (Supl. 3).

Nash, P. B., James, D. K., Hui, L. T., and Miller, L. A. (2004). Fertility control of California ground squirrels using GnRH immunocontraception. *Vertebrate Pest Conference 21*, 274–278.

Novak W., (2007). Predicting the “unpredictable” vaccine reactions. *Proceedings of North American Veterinary Conference*. Ithaca: International Veterinary Information Service.

Pai, M. (2009). Field evaluation of the immunocontraceptive gonacon in reducing eastern gray squirrel fecundity in urban areas. *Dissertation*. Clemson University.

Perry, K. R, Miller, L. A., Taylor, J. (2008). *Mycobacterium avium*: Is it an essential ingredient for a single injection immunocontraceptive vaccine?.*Proc.* 23

Vertebrate Pest Conference. Published at University of California, Davis. pp 253 - 256.

Phraluk O., Wajjwalkus W., Siriaroonrat B., Booddee O., Thongtip N. (2015) Effects of immunization against gonadotropin releasing hormone on reproductive functions in male rusa deer. *thai journal veterinary medicine*. 45(1):1-10.

Phillips TR, Jensen JL, Rubino MJ, Yang WC, Schultz RD (1989). Effects of vaccines on the canine immune system. *Canadian Journal of Veterinary Research.*; 53(2):154-60.

Recabarren, S. E. et. al. (2006). Análogos de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Arch. Med. Vet.* Vol. 38 N.1.

Regueiro J. R, López L. C. (1997) Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune (2ª Ed). Madrid, Editorial Médica Panamericana, 1997.

Ricaurte G., Sandra L. (2006) Importancia de un buen manejo de la reproducción en la avicultura. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* ®, Vol. VII, nº 04, Abril/2006

Richardson R. (2003). Rabbits: Health, Husbandry, and Diseases. Virginia CG 178. Roth JA. 1999. Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. *Advances in Veterinary Medicine*. 41:681-700.

Rydhmer, L., Lundström, K., and Andersson, K. (2010). Immunocastration reduces aggressive and sexual behaviour in male pigs, *Animal*, 4: 965-972.

Sander M. E, Makgoba M. W, Shaw S. (1988). Human native and memory T cell; reinterpretation of helper-induced and suppressor-induced subsets. *Immunology Today*. 1988; 9(7-8):195-9.

Serhan, C. N. (2010). Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press.

Statish K.G., Pankaj B., (2010). Vaccines for immunological control of fertility. *Reproduction Medicine Biology* 9:61-71.

Statish K., Shrestha A. (2014). Milestones in contraceptives vaccines development and hurdles in their application. *Human vaccines & Immunotherapeutics* 10:4, 911-925.

Tizard, I.R. (2009). Inmunología Veterinaria. McGraw-Hill. 8va Ed.

Yasser A., Abd-Elhamied M., and Gamal A. 2012. Histological and Histomorphometric changes of the rabbit testis during postnatal development. *Research Journal of Veterinary Sciences* 5 (2): 42-50, 2012

Zamaratskaia G., and Squires E. J, (2009). Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. *Animal*, 3, 1508-1521.

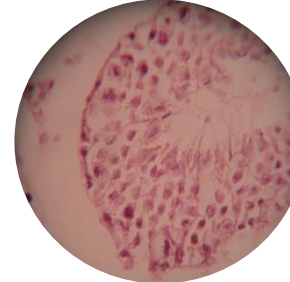
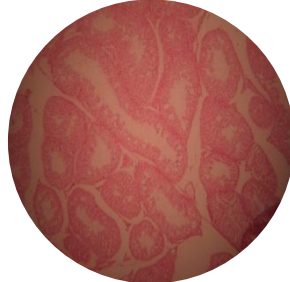
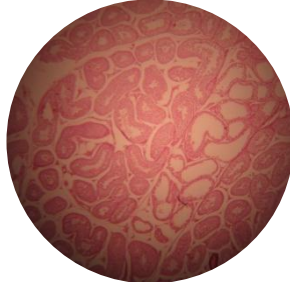
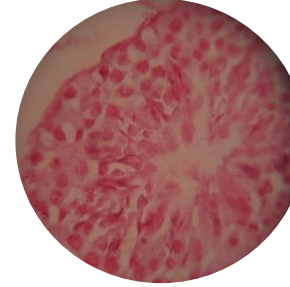
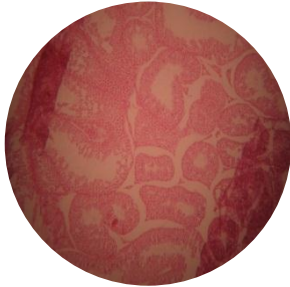
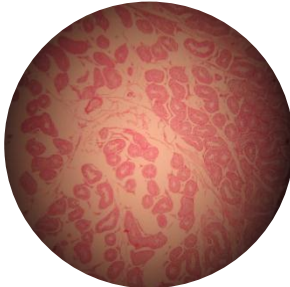
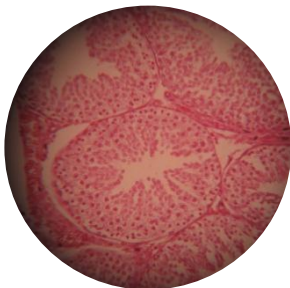
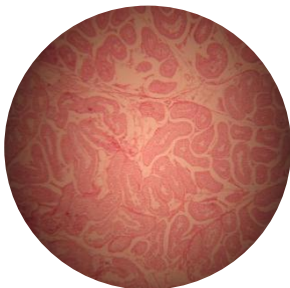
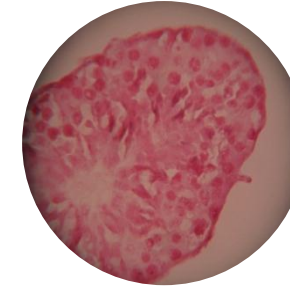
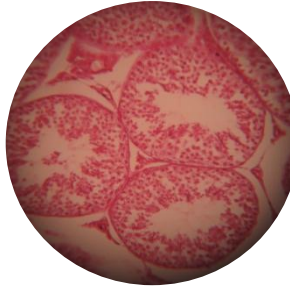
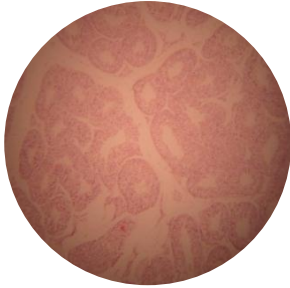
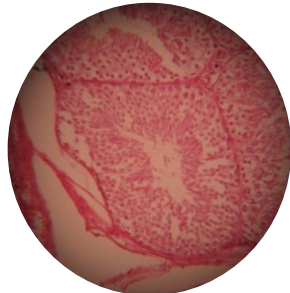
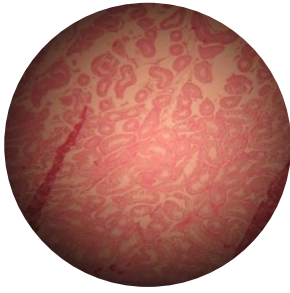
XIII.- ANEXOS

**CORTES HISTOLÓGICOS DE TESTÍCULO DE CONEJO A 4 SEMANAS
POSTERIORES A LA SEGUNDA APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO
(SOLUCIÓN SALINA)**

10x

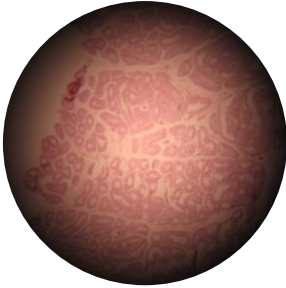
40x

100x

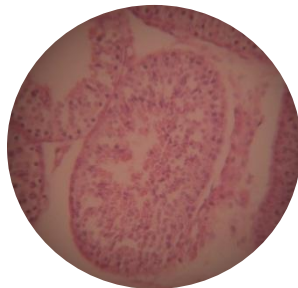


**CORTES HISTOLÓGICOS DE TESTÍCULO DE CONEJO A 12 SEMANAS
POSTERIORES A LA SEGUNDA APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO
(SOLUCIÓN SALINA)**

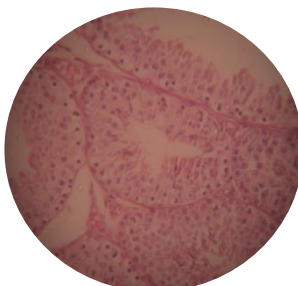
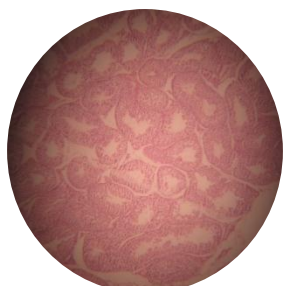
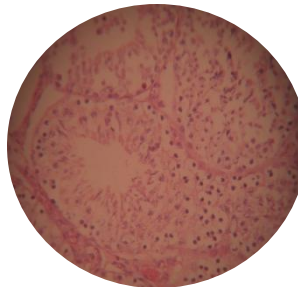
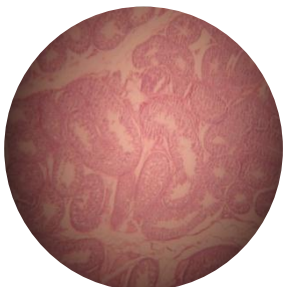
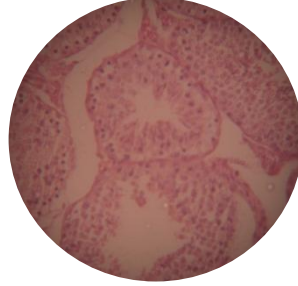
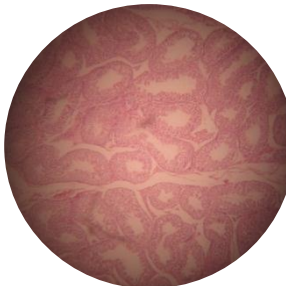
10x



40x



100x

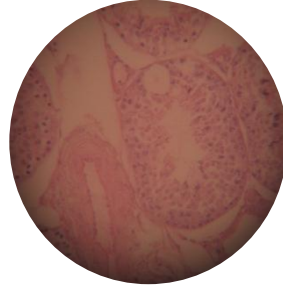
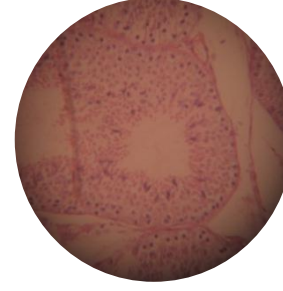
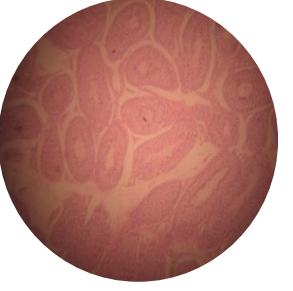
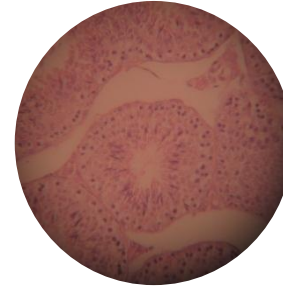
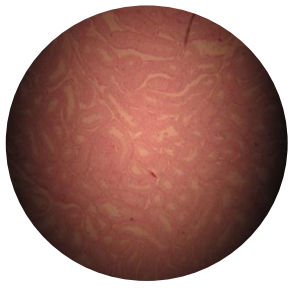
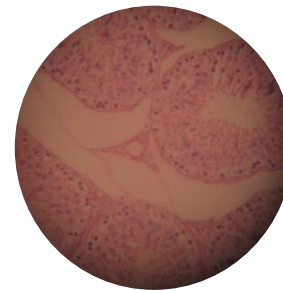
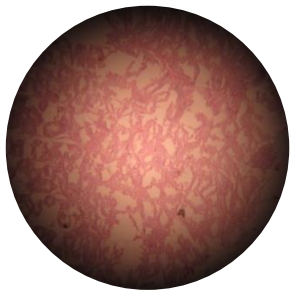
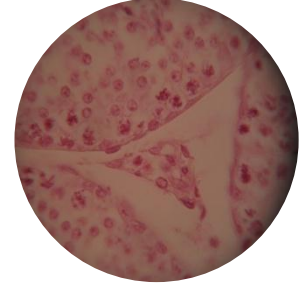
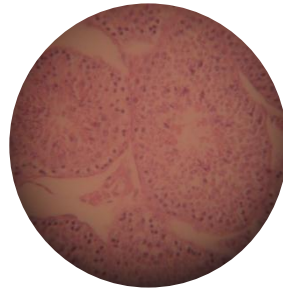
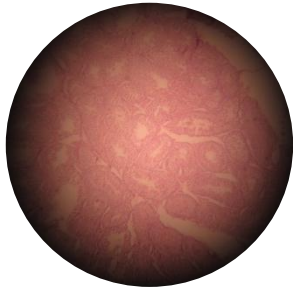


**CORTES HISTOLÓGICOS DE TESTÍCULO DE CONEJO A 24 SEMANAS
POSTERIORES A LA SEGUNDA APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO
(SOLUCIÓN SALINA)**

10x

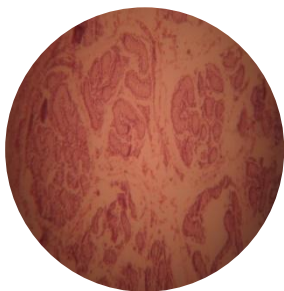
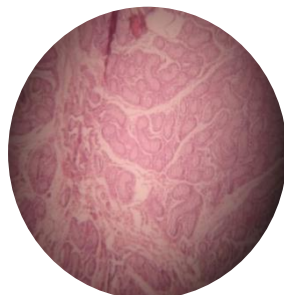
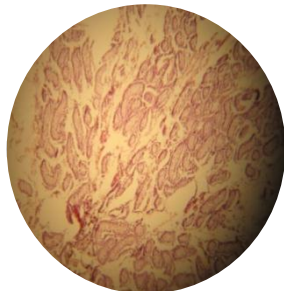
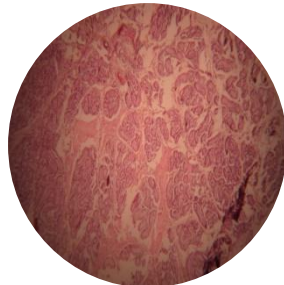
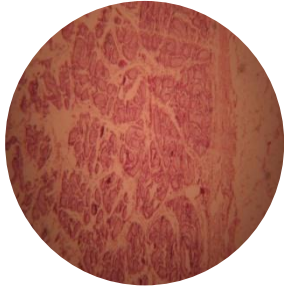
40x

100x

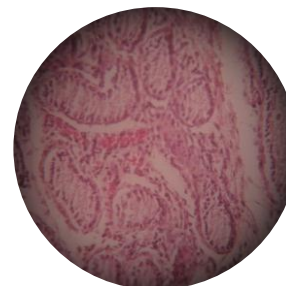
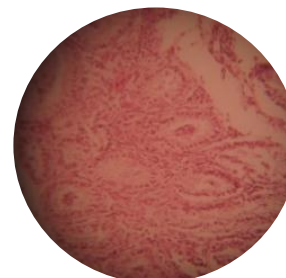
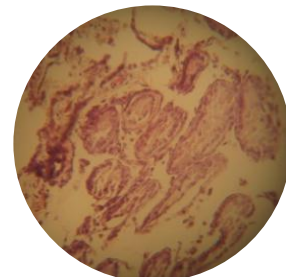
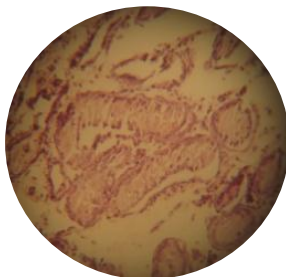
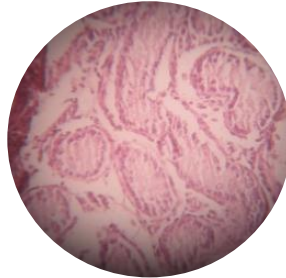


**CORTES HISTOLÓGICOS DE TESTÍCULO DE CONEJO A 4 SEMANAS
POSTERIORES A LA SEGUNDA APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO
(VACUNA ANTICONCEPTIVA A BASE DE GnRH)**

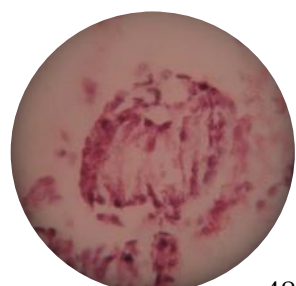
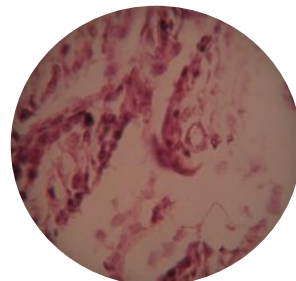
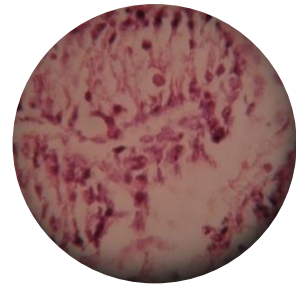
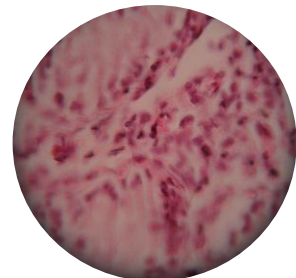
10x



40x



100x

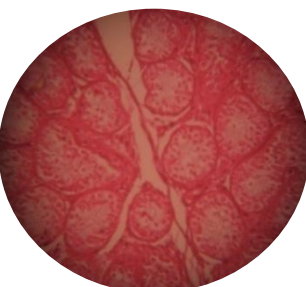
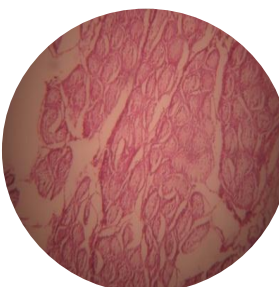
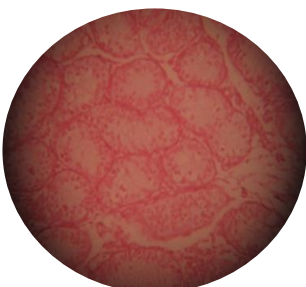
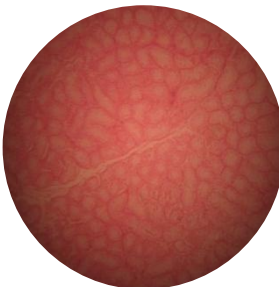
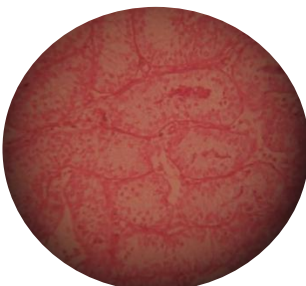
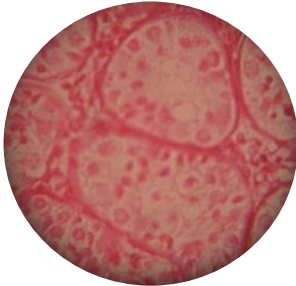
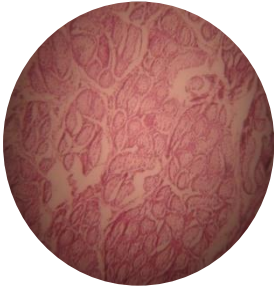
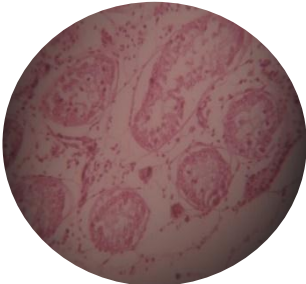


**CORTES HISTOLÓGICOS DE TESTÍCULO DE CONEJO A 12 SEMANAS
POSTERIORES A LA SEGUNDA APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO
(VACUNA ANTICONCEPTIVA A BASE DE GnRH)**

10x

40x

100x



**CORTES HISTOLÓGICOS DE TESTÍCULO DE CONEJO A 24 SEMANAS
POSTERIORES A LA SEGUNDA APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO
(VACUNA ANTICONCEPTIVA A BASE DE GnRH)**

10x

40x

100x

