

INMUNIZACION ACTIVA ANTI-GnRH EN OVINO (*Ovis aries*): MORFOMETRÍA TESTICULAR, HISTOPATOLOGÍA Y RESPUESTA ENDOCRINA EN CORDEROS PREPÚBERES

Active immunization against GnRH in ovine (*Ovis aries*): testicular morphometry, histopathology and endocrine responses in prepubertal ram lambs

M. A. Gutierrez-Reinoso¹, P. M. Aponte², J. A. Teran-Sinchiguano¹, M. Garcia-Herreros³

¹ Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), Latacunga, Ecuador.

² Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador.

³ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Santarém, Portugal

* Autor correspondiente: Manuel García-Herreros DVM, PhD; Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I.P.), Polo de Santarém, Quinta da Fonte Boa, 2005-048, Santarém, Portugal. Tel.: (+351) 243767 ext. 330.

E-mail address: herrerosgm@gmail.com

Recibido: 20/06/2017

Evaluado: 08/07/2017

Aceptado: 10/07/2017

RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar el efecto de la inmunización activa anti-GnRH como alternativa a la esterilización quirúrgica en corderos prepúberes. Se utilizaron 20 corderos de la raza Dorper (2 meses de edad) divididos en 2 grupos [control (n= 5) y tratado (n= 15)]. El tratamiento consistió en dos aplicaciones (cada 15 días) de una vacuna anti-GnRH diseñada a partir de un análogo sintético (acetato de buserelina) utilizando hidróxido de aluminio como coadyuvante. Para determinar la efectividad del protocolo de inmunización se evaluó la morfometría testicular (longitud, anchura y volumen), las alteraciones histopatológicas (diámetro túbulos seminíferos, espermatogonias/testículo y presencia de espermatozoides) así como la respuesta endocrina (FSH, LH, testosterona y cortisol plasmáticos) mediante test ELISA. Los parámetros morfométricos (longitud, anchura y volumen testicular) fueron significativamente menores en el grupo inmunizado respecto al grupo control ($p < 0,05$). La vacuna anti-GnRH generó una reducción del volumen testicular en ~11 veces ($p < 0,05$). El diámetro de los túbulos se redujo ~3,5 veces con respecto al control ($p < 0,05$). El volumen tubular, lumen y el espacio intertubular también disminuyeron significativamente en el grupo vacunado ($p < 0,05$). Los animales vacunados también mostraron una reducción significativa (~40 veces) del n° de espermatogonias ($p < 0,05$) habiendo ausencia de espermatozoides en un 60% (9/15) de los animales. No se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de LH, FSH, testosterona y cortisol entre los grupos ($p > 0,05$). En conclusión, la inmunización activa prepuberal contra la GnRH tuvo efectos marcados en la actividad y la morfometría testicular en la especie ovina, sin embargo no afectó a los niveles hormonales endocrinos ni a la espermatogénesis en todos los individuos. Debido a que el efecto anti-GnRH fue heterogéneo, se deberían evaluar otras estrategias de vacunación para poder considerar la inmunización activa anti-GnRH una alternativa viable a la esterilización quirúrgica convencional.

Palabras clave: Inmunización activa, GnRH, histopatología testicular, respuestas endocrinas, ovinas.

ABSTRACT

The main objective of the present research was to assess the effects of an active immunization against GnRH on male reproductive function as an alternative to surgical sterilization evaluating testicular morphometry, histopathological alterations and plasma gonadotropin levels in prepubertal ram lambs. Dorper ram lambs (age= 2 months; control group, n= 5; treatment group, n=15) were immunised by using an anti-GnRH vaccine (two administrations spaced 15d) developed by linking a GnRH homologous molecule to tetanus toxoid (clostridial toxoid) with aluminum hydroxide as adjuvant. To determine the effectiveness of the vaccination protocol, testicular morphometry was evaluated (length, width, mean volume and total volume) together with histopathological alterations in testicular tissue samples (seminiferous tubule diameters, spermatogonia per testis and sperm presence) and endocrine responses (ELISA) from blood samples (FSH, LH, testosterone and cortisol plasma levels). Morphometric parameters (testicular length, width and volume) were significantly reduced in vaccinated animals with respect to the

control group ($p < 0.05$). The anti-GnRH vaccine generated a reduction in testicular volume of 11-fold. Tubule diameters decreased in the vaccinated group with respect to the control by a factor of ~ 3.5 . Both tubule and intertubular volumes significantly decreased in vaccinated ram lambs ($p < 0.05$). There was also a significant reduction of the lumen in the vaccinated animal group ($p < 0.05$). Vaccinated animals showed significant reductions in spermatogonial numbers by a factor of ~ 40 -fold ($p < 0.05$). Sperm was absent in all seminiferous tubules in the 60% (9/15) of individuals. No significant differences were observed between vaccinated and control group regarding FSH, LH or testosterone plasma levels ($p > 0.05$). In conclusion, prepubertal active immunization against GnRH led to marked differences on testes morphometry and activity in ovine species, however, it did not affect endocrine levels nor spermatogenesis in all individuals studied showing a partial vaccination effect in some of them. Thus, taking into account the heterogeneous dysfunctional responses obtained, different vaccination assays and strategies should be tested before active immunization against GnRH is considered as a viable alternative to conventional surgical sterilization.

Keywords: active immunization, GnRH; testicular histopathology, endocrine response, ovine.

INTRODUCCION

El aumento en la productividad carnífera y sus características tiene relación con la supresión de la función reproductiva en animales domésticos ha sido siempre un factor importante debido a las ventajas que proporciona aumentando la productividad y las características del producto. Esta supresión se ha llevado a cabo por diferentes metodologías basadas en diferentes procedimientos hormonales, químicos, quirúrgicos, etc., siendo la más frecuente la esterilización quirúrgica. Aunque, el procedimiento tiene efectos secundarios tales como traumas, infecciones, hemorragias, estrés, dolor, malestar o incluso, en ocasiones, la muerte. Otros inconvenientes que podemos encontrar están relacionados con un elevado gasto económico, retraso en la productividad o la deposición excesiva de grasa en la carne. Es por ello, que debido a estos y otros factores, los métodos de esterilización no quirúrgicos son muy recomendables.

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es un decapeptido sintetizado a nivel del hipotálamo. Esta hormona controla la liberación de gonadotropinas desde la adenohipofisis, tales como la hormona luteinizante (LH) o la hormona folículo-estimulante (FSH) y por lo tanto es responsable del desarrollo de la función reproductiva en mamíferos (Clarke y Pompolo, 2005). De este modo, suprimir la liberación de gonadotropinas a nivel del eje hipotálamo-hipofisario, reduce la concentración de estas hormonas a nivel gonadal inhibiendo la función de las células de Leydig y las células de Sertoli, y como consecuencia la espermatogénesis (Kauffold et al., 2010).

Uno de los tratamientos más prometedores en la supresión de la función reproductiva es conocido como inmunocastración o inmuoesterilización. Este procedimiento se basa en el desencadenamiento de una respuesta autoinmune que directa o indirectamente modifica la estructura y función de las gónadas reduciendo la actividad de las hormonas sexuales y la capacidad de producir gametos (Occhio et al., 2001). Así, el diseño de una vacuna basada en una función anti-GnRH podría ser de gran relevancia, debido a los efectos que tiene esta hormona en la función reproductiva (Morton, 2007). Algunos intentos en la producción de este tipo de vacunas, no han tenido resultados del todo satisfactorios, debido a la baja efectividad en la función supresora de la GnRH, quizá debido a la poca afinidad de los anticuerpos generados o por la utilización de vehículos o adyuvantes no apropiados (Goubau et al., 1989).

El crecimiento y la maduración testicular en animales prepúberes es dependiente de la estimulación de las

gonadotropinas (FSH y LH) y del aumento de las concentraciones de testosterona (T) a nivel plasmático (Han et al., 2014). Estudios realizados por Janett et al. (2012) confirman la importancia de la edad en la efectividad de la inmunización, siendo más eficaces los tratamientos realizados antes de la pubertad. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la inmunización activa anti-GnRH en el desarrollo de la función reproductiva en ovino a partir de una vacuna específicamente diseñada como alternativa a la esterilización quirúrgica. Para ello se tendrán en cuenta los efectos derivados del tratamiento en la morfología testicular, histopatología del tejido testicular y los niveles plasmáticos hormonales de gonadotropinas en corderos prepúberes.

MATERIAL Y METODOS

En la presente investigación se utilizaron 20 corderos de raza Dorper (2 meses de edad) ubicados en el cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi, Ecuador (latitud: $0^{\circ} 56' 00''$ S; longitud: $78^{\circ} 37' 00''$ O; altitud: 2.750 m.s.n.m.). Todos los animales fueron sometidos a un riguroso control sanitario verificando la ausencia de patologías.

Los corderos se dividieron en 2 grupos. El primero ($n = 5$) se utilizó como grupo control (aplicación de solución salina, NaCl 0.9%), y al segundo ($n = 15$) se le aplicaron dos dosis de 2 ml (la primera de inmunización y la segunda de refuerzo con un espacio de tiempo de 15 días entre ambas) de una vacuna anti-GnRH de liberación lenta con un contenido total de ~ 500 μ g de un análogo sintético de la hormona GnRH (acetato de buserelina) conjugada con toxoides provenientes de *Clostridium septicum* (4×10^3 ppm) y de *Clostridium chauvoei* (1.6×10^7 ppm). Se utilizó como coadyuvante hidróxido de aluminio (15 mg) y como vehículo inyectable agua milli-Q con un 2% de formaldehído.

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en todos los individuos (5 ml) para la determinación del perfil hormonal. La primera muestra se tomó un día antes del inicio del experimento para tener una referencia del perfil plasmático hormonal en ambos grupos. A continuación, se tomaron muestras cada 15 días hasta el final del experimento. A partir de estas muestras se realizaron análisis hormonales mediante la técnica de ELISA indirecto (Abnova, Taipei, Taiwan) para la determinación de los niveles plasmáticos de las hormonas FSH, LH, testosterona y cortisol. Simultáneamente a las muestras de sangre tomadas, cada 15 días se realizaron mediciones de la morfología testicular de cada uno de los individuos de ambos

grupos (longitud y anchura de los testículos). Finalmente, aproximadamente a los 30-40 días después de la última aplicación de la vacuna anti-GnRH (~ 4 meses de edad) todos los animales fueron esterilizados quirúrgicamente independientemente del grupo al que pertenecían. Los testículos fueron mantenidos en hielo (-4°C aprox.) antes de ser procesados para el análisis histopatológico.

Tras retirar la túnica vaginalis y el epidídimo, se evaluó el volumen testicular utilizando el método del desplazamiento de agua utilizando una probeta graduada. Muestras de tejido testicular (aprox. 0.5 cm³) fueron fijadas en 4% de formaldehído durante 48h para finalmente ser almacenadas en etanol al 70% (4 °C). Las muestras se procesaron mediante una serie de pasos de deshidratación en etanol al 70% (30 min. x 2), etanol al 96% (30 min x 2), etanol al 100% (30 min. x 2), xileno (45 min. x 2) y finalmente se realizó una infiltración de parafina en un procesador de muestras para histología (Slee MTM, Mainz, Alemania). Una vez que la parafina quedó solidificada se realizaron cortes de 5 µm de espesor mediante un micrótopo (Cut 6062, Slee, Mainz, Alemania). A continuación las muestras fueron desparafinizadas, teñidas con Hematoxilina de Harris y montadas mediante bálsamo de Canadá (Biopack, Buenos Aires, Argentina). El tejido testicular se analizó en términos de morfología general, estereología y parámetros morfológicos específicos. Las imágenes fueron tomadas con una videocámara (Tucsen Imaging Technology Co., Ltd, Beijing, China) para su posterior análisis. La densidad de volumen de los compartimentos testiculares (túbulos seminíferos y los espacios intersticial e intertubular) fueron estimados a partir de una grátula de 30 puntos (separación entre puntos de 195-µm) superpuesta de forma digital de forma aleatoria sobre imágenes tomadas del tejido testicular correspondientes a los tratamientos llevados a cabo. Se tomaron un total de 20 imágenes por muestra contando en cada una de ellas 600 puntos específicos. El diámetro de los túbulos seminíferos se realizó a partir de mediciones digitales siendo calculado como la media entre los ejes mayor y menor de cada túbulo elegido aleatoriamente. Los diámetros tubulares (aprox. 55 por muestra) fueron medidos y evaluados mediante el software Image-J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). La determinación del estadio de desarrollo espermatogénico (espermatogénesis) en los túbulos que mostraron presencia de espermatozoides se realizó según la metodología llevada a cabo en ovino por Bilaspuri y Guraya (1986).

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la utilización del software SPSS v. 17 para Windows. Tras una previa exploración de los datos, se procedió a la aplicación del test ANOVA de una vía para la comparación de las medias obtenidas a partir de los análisis estereológico y morfométrico. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$. Cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas se llevaron a cabo análisis estadísticos basados en comparaciones múltiples mediante el test post hoc de Bonferroni.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se reportan las diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los parámetros de morfología testicular (longitud, anchura, volumen y volumen total) entre ambos grupos (control e inmunizado contra GnRH) ($p < 0,05$). En la Tabla 2, se reportan las diferencias estadísticamente significativas en cuanto al diámetro de los túbulos seminíferos, n° de espermatogonias por testículo y presencia de espermatozoides entre ambos grupos (control e inmunizado contra GnRH) ($p < 0,05$).

Tabla 1. Parámetro de morfometría testicular tras la aplicación de la vacuna anti-GnRH en corderos prepúberes al final del período experimental en el grupo control (no inmunizado) y en el grupo tratado (inmunizado).

Morfometría Testicular	Grupo 1 (Control)	Grupo 2 (Inmunizados)
Longitud (mm)		
Media ±SEM	12.0±0.18 ^a	5.7±0.42 ^b
Anchura (mm)		
Media ±SEM	5.4±0.19 ^a	2.3±0.15 ^b
Volumen (mm ³)		
Media ±SEM	186.9±15.00 ^a	17.4±3.43 ^b
Volumen Total (D+I, mm ³)		
Media ±SEM	377.8±29.09 ^a	2.3±0.15 ^b

Todos los individuos (n= 20) eran prepúberes y sin patologías clínicas. Los diferentes superíndices (a-b) en cada fila indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0,05$). Edad de los animales al final del período experimental = ~ 4 meses. El volumen fue estimado usando los parámetros longitud y anchura mediante la fórmula matemática del esferoide prolato.

Tabla 2. Parámetros de morfometría de túbulos seminíferos tras la aplicación de la vacuna anti-GnRH en corderos prepúberes al final del período experimental en el grupo control (no inmunizado) y en el grupo tratado (inmunizado)

Morfometría Túbulos Seminíferos	Grupo 1 (Control)	Grupo 2 (Inmunizados)
Diámetro (µm)	180.6± 3.09 ^a	51.0± 1.03 ^b
Media ±SEM		
Espermatogonias por testículo (× 10 ¹²)	22.8± 1.8	1.08± 0.16
Media ±SEM		
Presencia espermatoz. (+ presencia/- ausencia)	+	.*

Los diferentes superíndices (a-b) en cada fila indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0,05$). *Presencia negativa de espermatozoides (60% efectividad). Edad de los animales al final del período experimental = ~ 4 meses.

Tabla 3. Concentraciones hormonales tras la aplicación de la vacuna anti-GnRH en corderos prepúberes al final del período experimental en el grupo control (no inmunizado) y en el grupo tratado (inmunizado)

Concentración hormonal	Grupo 1 (Control)	Grupo 2 (Inmunizados)
FSH (ng/mL)		
Media ±SEM	0.9±0.04	0.9±0.02
LH (ng/mL)		
Media ±SEM	0.3±0.01	0.3±0.01
Testosterona (ng/mL)		
Media ±SEM	0.0±0.00	0.1±0.00
Cortisol (ng/mL)		
Media ±SEM	0.2±0.00	0.7±0.10

Se tomaron muestras de sangre de todos los individuos (n=20) para realizar los diferentes análisis hormonales. No se

observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p > 0,05$). Edad de los animales al final del período experimental = ~ 4 meses.

En la Tabla 3 se muestran detalladamente los diferentes resultados obtenidos respecto a las concentraciones plasmáticas hormonales tras la aplicación de la vacuna anti-GnRH en el presente estudio. Como podemos comprobar en la Tabla 3., no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración hormonal (FSH, LH, testosterona y cortisol) obtenida a partir del plasma seminal entre los grupos control y vacunado contra la GnRH ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Desde hace décadas se han llevado a cabo estudios con el fin de regular la actividad reproductiva en animales domésticos y salvajes (Bradley *et al.*, 1999). Entre otros, la inmunización activa anti-GnRH se ha considerado una posible alternativa a la esterilización mediante procedimientos quirúrgicos convencionales. De esta manera, aprovechando la ventaja fisiológica de que el desarrollo a nivel gonadal en esta etapa aún no alcanza una funcionalidad completa, se aplicó el tratamiento con el fin de inmunizar individuos prepúberes y ver los efectos morfológicos a nivel testicular, histopatología y las respuestas endocrinas a nivel plasmático. Los resultados mostraron que hubo un efecto parcial en el grupo tratado en cuanto a la supresión del proceso de espermatogénesis así como la ausencia de efecto en el perfil hormonal a nivel plasmático de la FSH, LH, testosterona y cortisol a lo largo de todo el protocolo experimental. Este efecto en algunos individuos del grupo tratado puede deberse a factores intrínsecos y extrínsecos que afectarían al proceso espermatogénico (Pareek *et al.*, 2007). Un posible factor que pudo influir en los resultados hormonales fue la baja frecuencia en la toma de muestras de sangre realizada en el presente estudio (cada 15 días), debido a que en las primeras semanas de vida, los individuos prepúberes muestran ondas episódicas de liberación hormonal de forma aleatoria a lo largo del tiempo (Hernandez-Medrano *et al.*, 2012).

Otro factor que puede influir en los resultados está relacionado con la variación inter-individual de la respuesta inmunológica, que a su vez puede estar influenciada por el genotipo de cada individuo e incluso por interferencias con los anticuerpos de origen materno (Niewiesk, 2014). También se han descrito interacciones hormonales tales como el efecto de feed-back negativo ejercido por otras hormonas tales como la testosterona o la inhibina sobre la liberación de FSH, sin embargo en el presente estudio esta situación es poco probable debido a que este hecho suele suceder en animales sexualmente maduros (Simoni *et al.*, 1999). Así, la hormona GnRH es la hormona clave para la liberación de FSH y LH durante la fase prepuberal en mamíferos (Clayton, 1985; Clarke y Pompolo, 2005). Sin embargo, hay evidencias del efecto refractario de la FSH, LH y testosterona plasmáticas en los individuos inmunizados de forma activa contra la testosterona en la fase prepuberal, unido a un feedback reducido a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal que resulta en una mayor estimulación gonadotrófica a nivel del tejido testicular (Han *et al.*, 2014). En el presente estudio, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el efecto de la inmunización anti-GnRH no siguió un patrón endocrino clásico de retroalimentación (Ferris y Shupnik, 2006), al menos durante la fase prepuberal en la especie ovina. Además, los niveles hormonales endocrinos observados debido a la

inmunización podrían no estar solamente influenciados por la neutralización de la hormona GnRH, sino también probablemente por las modificaciones de la respuesta de los receptores de gonadotropinas a nivel del tejido testicular (Auclair *et al.*, 1995). Así, una secreción residual de FSH inesperada junto con una baja concentración de testosterona sérica podría ser suficiente para mantener una población marginal de espermatogonias que conserven el proceso espermatogénico (Hernandez-Medrano *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2014).

Por otro lado, tras la vacunación anti-GnRH, se produjeron cambios acentuados a nivel morfológico testicular en todos los individuos. El cambio más evidente fue observado en la reducción del diámetro de los túbulos seminíferos. La regresión testicular no fue solamente a nivel local sino que ambos espacios tubular e intertubular tuvieron una considerable reducción de sus dimensiones, mostrando de forma general que la inmunización anti-GnRH induce a un bloqueo del desarrollo normal de la espermatogénesis en corderos prepúberes. Sin embargo, no podemos olvidar que en algunos animales se detectó la presencia de espermatozoides en la luz del túbulo, lo que determina que el efecto de la vacuna anti-GnRH tenga un efecto parcial individuo-dependiente.

Otro resultado interesante fue la obtención de una reducción en el número de espermatogonias y otras células germinales en los animales vacunados, sin excepciones entre individuos y por tanto, podemos decir que aunque de manera parcial en algunos individuos, en todos hubo un inmunobloqueo de la GnRH que pudo afectar a la liberación de FSH y LH. A pesar de la reducción de la población de espermatogonias en el presente estudio, no sabemos el origen que puede tener esta población residual, pudiendo provenir de células madre espermatogénicas fisiológicamente activas tras los efectos del tratamiento de inmunización anti-GnRH. Por lo tanto, no deberíamos descartar realizar test funcionales en el futuro respecto a la actividad de estas células madre espermatogénicas (Aponte, 2015). La distribución de GnRH y sus receptores a nivel testicular tienen un papel fundamental en el control de la esteroidogénesis y en el desarrollo de las células germinales y su liberación en el lumen de los túbulos seminíferos (Ferris y Shupnik, 2006). Sin embargo, de las dos funciones, probablemente sólo la función esteroidogénica afectó a los receptores de GnRH en el presente estudio, debido a que este tipo de receptores sólo se han detectado en células germinales maduras dentro de la barrera hemato-testicular en el compartimento adluminal de los túbulos seminíferos (Ferris y Shupnik, 2006). Además, no podemos olvidar que en ausencia de la señalización celular disparada por la testosterona, el proceso de la espermatogénesis queda bloqueado durante la meiosis y la onda de producción de espermátidas se reduce considerablemente (Yeh *et al.*, 2002). De hecho, el bloqueo de la meiosis puede tener diferentes orígenes fisiológicos, y estos pueden coexistir para ejercer un efecto sinérgico. Un ejemplo de ello son las células de Sertoli que pueden inhibir indirectamente la secreción de GnRH en el compartimento adluminal mediante los receptores de andrógenos, o incluso los anticuerpos anti-GnRH que podrían neutralizar a la GnRH a nivel del intersticio (Ferris y Shupnik, 2006).

CONCLUSION

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que la aplicación de la vacuna anti-GnRH como alternativa a la esterilización quirúrgica convencional en

corderos prepúberes afectó negativamente la actividad y el desarrollo testicular. Sin embargo, la respuesta inmune fue heterogénea y no afectó completamente el proceso de la espermatogénesis ni los niveles endocrinos de FSH, LH, testosterona o cortisol en algunos individuos. Por ello, se necesitan llevar a cabo nuevos ensayos y estrategias antes de recomendar el momento fisiológico de vacunación anti-GnRH así como el protocolo a seguir durante la inmunización en corderos prepúberes.

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a la Secretaría Nacional de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) del Gobierno de Ecuador por hacer posible el presente trabajo de investigación a través de su programa Proyecto Prometeo. También nos gustaría agradecer el esfuerzo de todas las personas y laboratorios que hicieron posible la ejecución de la presente investigación.

CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: MG-R, PMA, JT-S y MG-H
Desarrollo de la metodología: MG-R, PMA y MG-H
Concepción y diseño: MG-R y MG-H
Edición del artículo: PMA y MG-H
Supervisión del estudio: MG-R, PMA y MG-H

REFERENCIAS

- Aponte PM. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2015; 7:669–680.
- Auclair D, Sowerbutts SF, Setchell BP. Effect of active immunization against testosterone on plasma gonadotrophin concentrations, spermatogenic function, testicular blood flow, epididymis mass and mating behaviour in adult rams. *J Reprod Fertil*. 1995; 104:17–26.
- Bilaspuri GS, Guraya SS. The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in rams (*ovis aries*). *Theriogenology*. 1986; 25:485-505.
- Bradley MP, Eade J, Penhale J, Bird P. Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *J Biotechnol*. 1999; 73:91-101.
- Clarke IJ, Pompolo S. Synthesis and secretion of GnRH. *Anim Reprod Sci*. 2005; 88:29–55.
- Clayton RN. Role of GnRH in the maturation of pituitary gonadotroph function. *J Reprod Fertil*. 1985; 75:307–315.
- Goubau S, Silversides DW, Gonzalez A, Laarveld B, Maplettoff RJ, Murphy B D. Immunization of cattle against modified peptides of gonadotropin releasing hormone conjugated to carriers: Effectiveness of Freund's and alternative adjuvants. *Theriogenology*. 1989; 32:557–567.
- Ferris HA, Shupnik MA. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biol Reprod*. 2006; 74:993-998.
- Han XF, Cheng W, Chen ZY, Du XG, Cao XH, Zeng XY. Initiation of active immunization against testosterone during early puberty alters negative feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in rabbits. *Domest Anim Endocrinol*. 2014; 48:126–135.
- Hernandez-Medrano JH, Williams RW, Peters AR, Hannant D, Campbell BK, Webb R. Neonatal immunisation against a novel gonadotrophin-releasing hormone construct delays the onset of gonadal growth and puberty in bull calves. *Reprod Fertil Dev*. 2012; 24:973–982.
- Janett F, Stump R, Burger D, Thun R. Suppression of testicular function and sexual behavior by vaccination against GnRH (Equity) in the adult stallion. *Anim Reprod Sci*. 2009; 115:88-102.
- Kauffold J, Rohrmann H, Boehm J, Wehrend A. Effects of long-term treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin) on sexual function in boars. *Theriogenology*. 2010; 74: 733–740.
- Morton DB. Vaccines and animal welfare. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. 2007; 26:157–163.
- Niewiesk S. Maternal Antibodies: Clinical Significance, Mechanism of Interference with Immune Responses, and Possible Vaccination Strategies. *Front Immunol*. 2014; 5:1-15.
- Occhio MJ, Aspden WJ, Trigg TE. Sustained testicular atrophy in bulls actively immunized against GnRH: potential to control carcass characteristics. *Anim Reprod Sci*. 2001; 66:47–58.
- Pareek TK, Joshi AR, Sanyal A, Dighe RR. Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis*. 2007; 12:1085-100.
- Simoni M, Weinbauer GF, Gromoll J, Nieschlag E. Role of FSH in male gonadal function. *Annales D'endocrinologie*. 1999; 60:102–106.
- Yeh S, Tsai M-Y, Xu Q, Mu X-M, Lardy H, Huan K-E, Lin H, Yeh S-D, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung M-C, Zhang S, Gan L, Chang C, Hung M-C. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *PNAS*. 2002; 99:13498–13503.