

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL)



TESIS DOCTORAL

**Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada:
Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la
fisiología de la reproducción**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Sara de la Riva Andrés

DIRECTORAS

Pilar Millán Pastor
Pilar García Rebollar

Madrid, 2018



Este trabajo de tesis realizado en la Universidad Complutense de Madrid es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas que deseo agradecer en este apartado.

A la Dra. María Pilar Millán Pastor Directora de esta Tesis, cuya constante dedicación, rigor, así como sus consejos y ayuda, han hecho posible la realización de la misma. El trabajo a su lado es un continuo aprendizaje, además de constituir un motivo de orgullo.

A la Dra. Pilar García Rebollar Directora de este trabajo, que ha intervenido con su meticulosidad y su gran sentido crítico en el desarrollo de las distintas partes del mismo.

Al Dr Juan Carlos Illera catedrático del Departamento cuyas enseñanzas han sido para mí siempre un estímulo.

A los técnicos de laboratorio Bene y Carmen por su constante ayuda y su participación, con su bien hacer en la preparación del material para la realización de la parte experimental de esta Tesis, alimentación de los animales, limpieza de los mismos y de los utensilios utilizados.... ¡¡¡ Gracias!!!!.

A mi hermano Enrique que me asesoró con la maquetación de este trabajo así como continuamente me ha venido ofreciendo su apoyo.

A mi tía Macu, por su tesón, gran voluntariedad y capacidad de sacrificio, que me ha ayudado a la redacción por su larga experiencia como docente universitaria y médica.

Los miembros del departamento, y demás componentes, quiénes han participado en la resolución de problemas que han ido surgiendo durante la realización de este trabajo. Trabajar con ellos ha sido realmente agradable, además de un motivo de satisfacción. Además de quién recibí colaboración supliéndome en mi labor cuando lo necesité.



Todos mis amigos, estén donde estén, se merece muchas y buenas palabras, ya que con ellos he compartido despacho, laboratorio e incontables horas de trabajo y buenos ratos, lo cual no tiene precio. Por todo el tiempo que me han dado, por las conversaciones científicas de las que tanto he sacado, por respaldo y la Amistad. Gracias.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo y el cariño que me dieron mis padres y mi marido, que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. Que a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado para saber cómo iba mi proyecto. Las palabras nunca serán suficientes para testimoniar mi aprecio y mi agradecimiento.

Finalmente a mi madre, por haber sido capaz de comprender lo incompresible.

En especial a mi Hija Alejandra quien siempre me recibió con una sonrisa, y con su frase favorita ¡¡¡ Mama parque!!!!...



La actividad gonadal está bajo el control del hipotálamo, que secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), decapeptido que estimula la liberación de LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículoestimulante) por parte de la adenohipófisis. Estas gonadotropinas actúan sobre las gónadas masculina y femenina. Los niveles de GnRH, LH y FSH están regulados por mecanismos de retroalimentación de los estrógenos y andrógenos, liberados por las gónadas que actúan en el hipotálamo e hipófisis. El control de la fertilidad, tiene gran importancia en el manejo de los animales domésticos, así como en aquellos casos en los que se quiere inhibir la ovulación o el desarrollo reproductivo. Para ello se han usado tratamientos quirúrgicos que resultan poco económicos si se quieren regular grandes poblaciones de animales y distintos procedimientos hormonales que, aunque eficaces, tienen muchos efectos secundarios. En estos últimos años, los estudios focalizados en la inhibición de la función de la GnRH por su capacidad para dirigir el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) han sido fundamentales para controlar la fertilidad de los mamíferos, siendo la inmuoesterilización, una de las alternativas más eficaces. Así como en medicina humana para el tratamiento de aquellas enfermedades que necesitan la inhibición de la función del aparato reproductor (cáncer de mama, cáncer de próstata...).

El objetivo general de esta Tesis Doctoral, es la utilización del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) para estudiar los efectos de la administración de una vacuna anti-GnRH sobre: 1) la respuesta humoral, 2) el eje HHG y 3) el desarrollo gonadal, tanto masculino como femenino, con la finalidad de poder emplearlo como modelo animal para el estudio de disfunciones reproductivas en otras especies, incluida la humana.

Para alcanzar este objetivo se utilizaron 48 conejos híbridos de las razas Blanco de Nueva Zelanda x California, 24 machos y 24 hembras, ambos en edad prepuberal (11 semanas). Se hicieron 4 grupos de 6 animales del mismo sexo cada uno que recibieron dosis de 0, 25, 50 y 100 µg/ml de un inmunógeno anti-GnRH (Improvac®, Lab. Pfizer España) a las 11 y 15 semanas de edad denominados GMC, GMV25, GMV50 y GMV100 en el caso de los machos, y GHC, GHV25, GHV50 y GHV100 en el de las hembras, respectivamente. El inmunógeno se administró por vía subcutánea en dos dosis. Para determinar la respuesta inmune de los animales y la respuesta endocrina del



eje HHG se tomaron muestras de sangre los días de la administración del inmunógeno y después, semanalmente, desde la semana 16 a la 25 de edad del animal. En este momento, todos los animales recibieron 20µg/mL de gonadorelina, un análogo de GnRH (Inducel-GnRH, Lab. Ovejero, España), vía IM, a modo de estimulación hipofisaria, y se tomaron muestras sanguíneas a los 0, 60, 120 y 180 minutos post-estimulación. En las muestras sanguíneas se estudió: 1) la respuesta inmune humoral determinando el título de anticuerpos anti-GnRH generado en los animales y 2) la respuesta endocrina estudiando las secreciones hipofisaria (LH) y gonadal (testosterona en los machos; estradiol y progesterona en las hembras) antes y después de la estimulación con gonadorelina. Finalmente, en la semana 26, los animales se sacrificaron y se procedió a aislar las gónadas para su posterior estudio macroscópico (peso y dimensiones) y microscópico (cortes histológicos teñidos y analizados con un analizador de imágenes). Tanto para la evaluación de la respuesta humoral, determinando el título de anticuerpos, como de las concentraciones hormonales se utilizó la técnica de enzimoimmunoanálisis. Para el análisis estadístico de los resultados se realizaron análisis de varianza de medidas repetidas para estudiar el efecto del tratamiento inmunológico y el tiempo sobre la evolución del título de anticuerpos, de las hormonas y del peso de los animales. En el estudio de las gónadas se realizaron análisis de varianza con el tratamiento como efecto principal. Las medias se compararon con una t de Student.

Los niveles de anticuerpos anti-GnRH en los machos ascendió significativamente en los tres grupos inmunizados a partir de las 16 semanas de vida, una vez aplicada la segunda dosis de vacuna. Esta respuesta fue disminuyendo de la misma forma en los tres grupos a medida que avanzó el periodo experimental. Al final del en el grupo GMV25 el título de anticuerpos decayó hasta umbrales negativos. A nivel hormonal, todos los valores de LH observados desde la semana 11 hasta la semana 25 antes de la estimulación con GnRH fueron basales. Sin embargo, una vez aplicada dicha estimulación, los niveles de LH en el grupo GMC (no inmunizado) ascendieron significativamente a los 60 min y a los 120 min con respecto a los otros tres grupos inmunizados, que no mostraron incremento alguno y siguieron presentando valores mínimos. Asimismo, el valor más elevado de testosterona se observó en el grupo GMC



a los 60 min tras la estimulación de GnRH, disminuyendo a los 180 min y llegando a valores basales a la semana siguiente, mientras que los grupos inmunizados no experimentaron ninguna respuesta.

En el aspecto morfológico, al final del experimento, no se observaron variaciones en cuanto al peso ni tamaño del animal. Sin embargo, se observó una disminución significativa del peso y dimensiones de la gónada, así como de su peso relativo. En el análisis microscópico se apreciaron reducciones significativas en el diámetro de los túbulos seminíferos que fueron en función de la dosis aplicada, así como una disminución en la presencia de espermátidas.

Por su parte, en las hembras la titulación de anticuerpos en todos los grupos ascendió a porcentajes muy próximos al 100% en la semana 16 del periodo experimental. Esta respuesta fue descendiendo en los 3 grupos de la misma manera hasta la semana 17 y 18. Posteriormente, los grupos GHV100 y GHV50 mantuvieron respuestas más altas que la del grupo GHV25, y sobre todo, destacó el grupo GHV100 que se mantuvo en porcentajes del 80% al final del experimento. Tanto los grupos inmunizados como el control presentaron concentraciones de LH basales hasta las 25 semanas de edad. Una vez tratados con gonadorelina, sólo en el grupo control se observó un pico máximo de LH y progesterona a los 60 min post-estimulación y una disminución posterior típicas de la respuesta hipofisaria y ovárica al análogo de GnRH. Sin embargo, en los grupos inmunizados no se observaron cambios estadísticamente significativos en las concentraciones séricas de LH ni de progesterona a lo largo de todo el periodo experimental, y en la semana 26 los valores de los cuatro grupos fueron similares. Las concentraciones de 17β estradiol de las conejas antes de la estimulación con gonadorelina, fueron similares en todos los grupos. Más tarde, tras la estimulación, no se determinaron grandes variaciones en el grupo GHC, a diferencia de los grupos inmunizados, en los que se observó una disminución significativa del estradiol sérico desde el minuto 0 hasta el 180 de dicho periodo. En la semana 26, todos los animales inmunizados manifestaron un ligero aumento de las concentraciones de estradiol con respecto a la semana anterior. A nivel histológico se observaron diferencias en los diámetros de los folículos ováricos en los primeros estadios de desarrollo y en la



presencia de cuerpos lúteos, así como en los tamaños y pesos de las gónadas, pero no del peso del animal.

En conclusión, en esta Tesis Doctoral se ha demostrado que el conejo podría ser empleado como un modelo animal adecuado para el estudio de alteraciones en las que la funcionalidad del eje HHG esté comprometida, ya que se ha comprobado que cualquiera de la 3 concentraciones empleadas y aplicadas en 2 dosis separadas 4 semanas desencadenaron: 1) una importante respuesta inmune humoral, 2) una disminución de la respuesta hipofisaria de la LH y de la secreción esteroidogénica gonadal, y 3) afectaron negativamente al peso, dimensiones y desarrollo tisular de las gónadas, todo ello claramente indicador de la eficacia de este tratamiento inmunológico para inhibir el eje HHG.



Gonad activity is controlled by the hypothalamus, which secretes the hormone that releases gonadotropins (GnRH), a decapeptide that stimulates release of LH (luteinizing hormone) and FSH (follicle-stimulating hormone) by the adenohypophysis. These gonadotropins act on the male and female gonads. The levels of GnRH, LH and FSH are regulated by feedback mechanisms with the estrogens and androgens, released by the gonads that act on the hypothalamus and hypophysis. Fertility control has a major importance in managing pets, as well as cases in which one wishes to inhibit ovulation or reproductive development. To that end, surgical treatments have been used that are not financially feasible if one wishes to regulate major populations of animals and different hormonal proceedings that, although effective, have many secondary effects. In recent years, studies that focus on inhibiting the GnRH, due to its capacity to direct the hypothalamus-hypophysis-gonad (HHG) have been fundamental to control the fertility of mammals, in which immunosterilization is one of the most effective alternatives. This is the case in human medicine for treatment of illnesses that require inhibition of the function of the reproductive apparatus (breast cancer, prostate cancer ...

The general aim of this Doctoral Thesis is use of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) to study the effects of administering an anti-GnRH vaccine on: 1) the immune response, 2) the HHG axis and 3) gonad development, both male and female, in order to be able to use it is an animal model for study of treatments of reproductive diseases in other species, including the human one.

To achieve that objective, 48 hybrid rabbits of the White New Zealand x Californian breed were used, 24 males and 24 females, both in prepubertal age (11 weeks). Four groups were formed with 6 animals of the same sex each, that received doses of 0.25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of an anti-GnRH immunogen (Improvac®, Lab. Pfizer Spain) at 11 and 15 weeks of age, called GM0, GM25, GM50 and GM100 in the case of the males, and GH0, GH25, GH50 and GH100 in the case of the females, respectively. The immunogen was administered subcutaneously in both doses. In order to determine the immune response of the animals and the endocrine response of the HHG, blood samples were taken on the day of administering the immunogen and afterward, weekly, from week 16 to 25 of the animal's age. At that moment, all the animals received 0.02 ml of



gonadorelin, a GnRH analog (Inducel-GnRH, Lab. Ovejero, Spain), via IM, to stimulate the hypophysis, and blood samples were taken at 0, 60, 120 and 180 min. post-stimulation. The blood samples were used to study: 1) the humeral immune response determining the titer of anti-GnRH antibodies generated in the animals and 2) the endocrine response by studying the secretions from the hypophysis (LH) and gonads (testosterone in the males; estradiol and progesterone in the females) before and after stimulation using gonadorelin. Finally, in week 26, the animals were sacrificed and the gonads were isolated for subsequent macroscopic (weight and dimensions) and microscopic study (dyed histological sections, analyzed using an image analyzer). The enzymeimmunoanalysis technique was used both for evaluation of the humeral response, antibody titer, as well as hormonal concentrations. When studying the gonads, variance analysis was performed with the treatment as main effect. The averages were compared with a Student's t-distribution.

The anti-GnRH antibody titer in the males rose significantly in the three immunized groups as of 16 weeks of life, after the second dose of vaccine was applied. That response gradually decreased to the same extent in the three groups as the experimental period advanced. At the end of the experiment in group GMV25 the antibody titer fell to negative thresholds. At hormonal level, all the LH values observed from week 11 to week 25 prior to stimulation with GnRH were basal. However, once that stimulation was applied, the LH levels of the GMC (non immunized group) rose significantly after 60 min. and 120 min. compared with the other three immunized group, that showed no increase whatsoever and continued to show basal values. Likewise, the highest testosterone value was observed in group GMC within 60 min. after the GnRH stimulation, decreasing to 180 min. and reaching base values in the following week, while the immunized groups showed no response whatsoever. In the morphological aspect, at the end of the experiment, no variations were seen with regard to the weight or size of the animal. However, a significant decrease was observed in the weight and dimensions of the gonad, as well as its relative weight. In the microscopic analysis, significant reductions were appreciated in the diameter of the seminiferous tubules in proportion to the dosage applied, as well as a decrease in the presence of spermatids.



On their part, the antibody titer in all the groups of females rose to percentages very near to 100% in week 16 of the experimental period. That response gradually dropped in the 3 groups in the same way until week 17 and 18. Subsequently, GHV100 and GHV50 maintained higher responses than in group GHV25, and above all, group GHV100 was outstanding in that it maintained percentages of 80% at the end of the experiment. Both the immunized groups as well as the control one had base LH concentrations up to 25 weeks of age. After treatment with gonadorelin, a maximum peak of LH and progesterone was only observed in the control group at 60 min. post-stimulation, and subsequent decrease typical of the hypophysis and ovary response to the GnRH analog. However, in the immunized groups, no statistically significant changes were observed in the serum concentrations of LH, nor of progesterone throughout the whole experimental period and, in week 26, the values of the four groups were similar. The concentrations of 17β estradiol in the female rabbits before stimulation with gonadorelin were similar in all the groups. Later, after the stimulation, no major variations in the GHC group were determined, on the contrary to the immunized groups, in which a significant decrease in serum estradiol was observed from minute 0 to 180 of that period. In week 26, all the animals immunized showed a slight increase in estradiol concentrations compared with the previous week. At histological level, differences were observed in the diameters of the ovarian follicles and in the presence of corpus lutea, as well as in the sizes and weights of the gonads, but not in the weight of the animal.

To conclude, this Doctoral Thesis has proven that rabbits may be used as an adequate animal model to study diseases in which the functionality of the HHG axis is compromised, as we have proven that any of the 3 concentrations used and applied in 2 doses separated by 4 weeks triggered 1) an important humeral immune response, 2) a decrease in the hypophysis response to LH and the gonadal steroidogenic secretion, and 3) negatively affected the weight, dimensions and tissue development of the gonads, all clearly indicating the efficiency of this immunological treatment to inhibit the HHG axis.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de los diferentes momentos importantes del periodo experimental.

Figura 2. Curva de Respuesta de un pul alto de anticuerpos anti-GnRH.

Figura 3. Curva de Respuesta de diferentes pules de anticuerpos anti-GnRH

Figura 4. Evolución de los porcentajes de positividad de anticuerpos producidos por conejos inmunizados con 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25(GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH entre las 11 y 26 semanas de edad. (a,b) $p < 0,05$. (n=6). Dilución 1/4.000.

Figura 5. Evolución de las concentraciones de LH séricas (ng/mL) de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25(GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH entre las 11 y 26 semanas de edad e inducidos en la semana 25 con 20 μg de gonadorelina. (a,b) $p < 0,05$. (n=6).(media \pm esm).

Figura 6. Evolución de las concentraciones de LH séricas (ng/mL) de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25(GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH entre las 11 y 26 semanas de edad e inducidos en la semana 25 con 20 μg de gonadorelina. (a,b) $p < 0,05$. (n=6).(media \pm esm).

Figura 7. Evolución de las concentraciones de testosterona sérica (ng/mL) de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH y estimulados en la semana 25 de edad con 20 μg de gonadorelina. *** $p < 0,001$. (n=6). (media \pm esm).

Figura 8: Evolución de los porcentajes de positividad de conejas inmunizadas con 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25(GHV25) de inmunógeno anti-GnRH $\mu\text{g/mL}$ entre las 11 y 26 semanas de edad. Las letras indican diferencias entre grupos en cada momento. (a,b) $p < 0,05$. (n=6). Dilución 1/ 4.000.

Figura 9. Evolución de las concentraciones de LH séricas (ng/mL) de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) $\mu\text{g/mL}$ de



inmunógeno anti-GnRH entre las 11 y 26 semanas de edad e inducidas en la semana 25 con 20 μ g de gonadorelina. Las letras distintas indican diferencias entre grupos en cada momento (a,b,c,d) $p < 0,05$. (n=6).(media \pm esm).

Figura 10. Evolución de las concentraciones de progesterona sérica (ng/mL) de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) μ g/mL de inmunógeno anti-GnRH y estimulados en la semana 25 con 20 μ g de gonadorelina. ***: $p < 0,001$. (n=6). (media \pm esm).

Figura 11. Evolución de las concentraciones de estradiol séricas (pg/mL) de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) de inmunógeno anti-GnRH entre las 15 y 26 semanas de edad e inducidas en la semana 25 con 20 μ g de gonadorelina. (a,b,c) $p < 0,05$. (n=6).(media \pm esm).



ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Hipotálamo Hipófisis. Silverthorn, (2008a). Fuente: www.medicapanamericana.com/materialesComplementarios/Silverthorn-6/visor.aspx.

Imagen 2. Sistema Porta Hipotálamo-Hipófisis. Fuente: McKean et al., Copyright: The McGraw Hil Companies, Inc.

Imagen 3. Secreción pulsátil de LH y su correspondencia con la secreción pulsátil de GnRH. Fuente: Levine et al., en: <https://www.elsevierelibrary.es/pdfreader/berne-y-levy-fisiologa-student-consultcom>.

Imagen 4. Vista del pene (♂), sacos escrotales (*) y desembocadura de las glándulas inguinales (§) en un conejo adulto en decúbito supino. Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.

Imagen 5. Vista dorso lateral de las glándulas vesiculares (gv), la próstata (p) y la vejiga de la orina (vu) de un conejo adulto. Fuente: Dimitrov et al. (2013).

Imagen 6. Testículo (1), epidídimo (2) y plexo pampiniforme (3) de un conejo adulto extraído del saco escrotal. Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.

Imagen 7. Túbulo seminífero. Silverthorn, (2008b). Fuente: www.medicapanamericana.com/materialesComplementarios/Silverthorn-6/visor.aspx.

Imagen 8. Espermatogénesis. Fuente: Carlson, 2004 en: Berne y Levy. Fisiología. Ed., Elsevier Health Sciences Spain 6ª ed.

Imagen 9. Control hormonal de la espermatogénesis. Silverthorn. (2008b). Fuente: <http://www.medicapanamericana.com/materialesComplementarios/Silverthorn-6/visor.aspx>

Imagen 10. Esteroidogénesis y conversión de testosterona. Fuente: En: Berne y Levy. Fisiología. Ed., Elsevier Health Sciences Spain 6ª ed.



Imagen 11. Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo. Fuente: En: Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Ed. Elsevier Health Sciences Spain.

Imagen 12. Ovarios de coneja adulta con cuerpos lúteos de 8 días (*), Corpus albicans (+), y folículos ováricos (□) en su superficie. Los círculos punteados señalan el estigma. Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.

Imagen 13. Vista dorsal del tracto reproductor de coneja. 1) ovario, 2) oviducto, 3) cuerno uterino, 4) cérvix uterino doble, 5) fondo de la vagina. Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.

Imagen 14. Vulva (*), apertura de glándulas inguinales (□) y ano (⌘) de coneja adulta. Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.

Imagen 15. Corte histológico de ovario de coneja. Abundantes folículos primordiales y primarios. HE.

Imagen 16. Corte histológico de ovario de coneja con dos folículos primarios en crecimiento. HE.

Imagen 17. Corte histológico de ovario de coneja. Folículo secundario. HE.

Imagen 18. Corte histológico de ovario de coneja. Folículo preovulatorio con el ovocito en el centro del folículo. HE.

Imagen 19. Corte histológico de ovario de coneja. Folículo con cuerpos de Call-Exner. HE.

Imagen 20. Corte histológico de ovario de coneja con dos cuerpos lúteos. HE

Imagen 21. Regulación de la secreción de LH y FSH por la frecuencia de pulsos de GnRH. Larsen et al. En: Berne y Levy. Fisiología. Ed., Elsevier Health Sciences Spain 6ª ed.

Imagen 22. Fases del ciclo ovárico. En: Fisiología Humana: un enfoque integrado. Ed., Editorial Médica Panamericana, 6ªed.



Imagen 23. Eje Hipotálamo- Hipófisis-Ovario. En: Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Ed. Elsevier Health Sciences Spain.

Imagen. 24. Modelo de dos células para la esteroidogénesis en el folículo dominante (Modificado de : Porterfield Sp, Whyte Ba: Endocrine Physiology, 3ª ed., Filadelfia, Mosby, 2007.)

Imagen 25. Arteria central de la oreja del conejo

Imagen 26. Método de sujeción de conejos

Imagen 27. Esquema Elisa Indirecto

Imagen 28. Esquema Elisa de competición

Imagen 29. Últimas fases Elisa de competición.

Imagen 30. Elisa de competición de hormona esteroide

Imagen 31. Testículos de dos conejos de 26 semanas de edad: A) inmunizado con 100µg/mL del inmunógeno anti-GnRH y B) control.

Imagen 32: Testículo de un conejo del grupo GMV50. Túbulo seminífero con células de Sertoli y escaso desarrollo de la línea germinal. H&E 1: Espermátida degenerada; 2: Célula de Sertoli; 3: Espermatozoides 1º.

Imagen 33. Testículo de un conejo del grupo control. Túbulo seminífero con desarrollo completo de las células de la línea germinal. H&E.

Imagen 34. Testículo de un conejo del grupo GMV50. Túbulo seminífero con células de Sertoli y alguna espermatogonia. H&E.

Imagen 35. Testículo de un conejo del grupo control. Túbulo seminífero con células de Sertoli y alguna espermatogonia, rodeados de una membrana basal normal. PAS X20

Imagen 36. Testículo de un conejo del grupo GMV100. Túbulo seminífero con escaso desarrollo de las células de la línea germinal, rodeados de una gruesa membrana basal. PAS X20.



Imagen 37. Folículo de coneja GHV100 con cuerpos de Carll- Exner. GHV100. H&E.

Imagen 38. Cuerpo Lúteo de una coneja control.

Imagen 39. Ovario de una coneja inmunizada del grupo GHV50. H&E. 1: folículo preantral; 2: folículo atrésico; 3: folículos primordiales .



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Evolución del peso (kg) de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH desde las 11 a las 26 semanas de edad. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la misma columna se consideran diferentes estadísticamente ($p < 0,05$). (media \pm esm).

Tabla 2. Peso (g) y dimensiones de los testículos de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH a las 26 semanas de edad.

Tabla 3. Diámetro de los túbulos seminíferos de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH y sacrificados a las 26 semanas de edad. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la fila se consideran diferentes estadísticamente ($p < 0,0001$).

Tabla 4. Porcentaje de animales con presencia de espermátidas en la luz de los túbulos seminíferos de conejos machos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH y sacrificados a las 26 semanas de edad. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la fila se consideran diferentes estadísticamente ($p < 0,0003$). (media \pm esm).

Tabla 5. Evolución del peso (kg) de conejas inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH desde las 11 a las 26 semanas de edad. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la misma columna se consideran diferentes estadísticamente ($p < 0,05$). (media \pm esm).

Tabla 6. Peso (g) y dimensiones de los ovarios de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH a las 26 semanas de edad.



Tabla 7. Número de cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos en los cortes histológicos de ovarios de conejas inmunizadas y controles. CL: Cuerpos Lúteos; CH: Cuerpos Hemorrágicos.

Tabla 8: Diámetro (μm) de los folículos observados en los cortes histológicos de los ovarios de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH. (FPDIAL: F. primordial; FPT: F. primario temprano; FP: F. primario; FPC+PA: F. primario en crecimiento + preantral; FA: F. antral) y número de folículos con cuerpos de Call-Exner (CE). Las medias ($\mu\text{m} \pm \text{esm}$) seguidas de letras distintas dentro de la misma columna y fila, se consideran diferentes estadísticamente ($p < 0,05$).



ABP: Androgen Binding Protein

AMPC: Adenosin Monofosfato Cíclico.

BSA: Bovine serum Albumin

CL: Cuerpo Lúteo

CV: Coeficiente de Variacion

DO: Densidad óptica

DE: Desviación Estándar

EIA: Enzyme Inmuno Assay

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FPDIAL: Folículo primordial

FPT: Folículo Primordial Temprano

FP: Folículo Primario

FPC +PA: Folículo Primario en crecimiento + Preantral

FA: Folículo antral.

FSH: Follicle Stimulating Hormone

GnRH: Gonadotrophin Releasing Hormone

GMC: Grupo Machos Control

GMV100: Grupo Machos vacunado 100µg/mL

GMV50:Grupo machos Vacunados 50 µg/mL

GMV25: Grupo machos Vacunados 25 µg/mL

GHC: Grupo hembras control



GHV100: Grupo Hembras Vacunadas 100 $\mu\text{g/mL}$

GVV50: Grupo Hembras Vacunadas 50 $\mu\text{g/mL}$

GHV25: Grupo Hembras Vacunadas 25 $\mu\text{g/mL}$

HE: Hematoxilina- Eosina

HHG: Hipotálamo Hipófisis Gónada

IM: Intramuscular

LOD: Límit of Detection

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

P4: Progesterona

PBS: Phosphate Buffer Saline

PP: Porcentaje de Positividad

PNO: Procedimiento Normalizado de Operación

SC: Subcutáneo

SHBG: Steroid Hormone Binding Globulin

T4: Testosterona

TSH: Tirotropina

TMB: 3,3',5,5'- tetrametil benzidina

UCM: Universidad complutense de Madrid

UPM: Universidad Politécnica de Madrid



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

SUMARY

TABLAS, FIGURAS E IMÁGENES

ABREVIATURAS

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| I. ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADA..... | 5 |
| II. ESTRUCTURAS REPRODUCTORAS DEL CONEJO MACHO..... | 9 |
| 1.- Anatomía..... | 9 |
| 2.- Histofisiología Masculina | 12 |
| 2.1.- Espermatogénesis | 14 |
| 3.- Control Hormonal de la Reproducción en el Macho..... | 16 |
| 3.1.- Características, Acciones y Control de la Hormona Luteinizante en el Macho | 16 |
| 3.2.- Características, Acciones y Control de la Hormona Foliculoestimulante en el Macho | 17 |
| 3.3.- Hormonas Testiculares..... | 19 |
| 4.- Pubertad y Comportamiento Sexual del Conejo Macho..... | 24 |
| III. ESTRUCTURAS REPRODUCTORAS DE LA CONEJA..... | 25 |
| 1.- Anatomía Fisiológica | 25 |
| 2.- Oogénesis y Foliculogénesis..... | 28 |
| 3.- Ovulación y Luteinización..... | 32 |
| 4.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario..... | 34 |
| 5.- Control Hormonal | 35 |
| 5.1.- Características, Acciones y Control de la Hormona Luteinizante y Foliculoestimulante en el Hembras | 35 |
| 6. La Pubertad de la Coneja..... | 39 |
| 7. El ciclo estral de la Coneja | 42 |
| IV. INMUNOESTERILIZACIÓN ANIMAL..... | 43 |
| JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 51 |



| | |
|--|----|
| MATERIAL Y MÉTODOS | 54 |
| I. ANIMALES..... | 55 |
| 1. Elección del Animal | 55 |
| 2. Condiciones de Alojamiento y Alimentación | 55 |
| 1. Experimento I: Administración de un Inmunógeno anti-GnRH en Conejos Macho Prepúberes | 56 |
| 1.1.- Grupos Experimentales y Tratamiento de los Machos | 57 |
| 2. Experimento II: Administración de un Inmunógeno anti-GnRH en Conejos Hembra Prepúberes | 57 |
| 2.1.- Grupos Experimentales y Tratamiento de las Hembras | 57 |
| 3. Período Experimental de los Experimentos I y II..... | 57 |
| 3.1. Fase Pre-Experimental | 57 |
| 3.2. Fase Experimental | 58 |
| III DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS Y METODOLOGÍA UTILIZADA..... | 60 |
| 1. Determinación de la Titulación de Anticuerpos anti-GnRH en Conejos | 60 |
| 1.1. Fundamento de la Técnica ELISA Indirecto | 60 |
| 1.2. Pasos previos para el desarrollo de la técnica | 61 |
| 1.3. Desarrollo de la Técnica ELISA Indirecto | 62 |
| 1.4. Procesado de los resultados: Normalización de los valores | 64 |
| 1.5. Validación de la técnica..... | 64 |
| 2. Determinación de la Concentración Sérica de LH de Conejo..... | 67 |
| 2.1. Fundamento de la Técnica ELISA de Competición | 67 |
| 2.2. Pasos previos para el desarrollo de la técnica | 68 |
| 2.3. Trazado de la curva estándar: rango de concentración de la curva. | 69 |
| 2.4. Desarrollo de la Técnica ELISA de Competición | 69 |
| 2.5. Procesado de los resultados..... | 72 |
| 3. Determinación de la Concentración Sérica de Progesterona, Testosterona y Estradiol | 73 |
| 3.1. Fundamento de la técnica..... | 73 |
| 3.2. Tratamiento de las muestras..... | 73 |
| 3.3. Desarrollo de la Técnica ELISA de Competición | 74 |
| IV.- Análisis Macro y Microscópico de los Tejidos..... | 76 |
| V.- Análisis estadístico..... | 77 |



| | |
|--|-----|
| RESULTADOS | 79 |
| I. Experimento 1: Efecto de la administración de un Inmunógeno anti-GnRH en conejos machos prepúberes..... | 80 |
| 1. Efectos del inmunógeno: Estudio de la Titulación de Anticuerpos..... | 80 |
| 2. Efectos de la Vacuna sobre las Hormonas de la Reproducción en Machos: LH y Testosterona. | 81 |
| 2.1.- Concentraciones de LH Sérica..... | 81 |
| 2.2.-Concentraciones de Testosterona Sérica..... | 82 |
| 3. Efectos morfológicos..... | 84 |
| 3.1.- Peso Corporal..... | 84 |
| 3.2.- Medidas Testiculares | 84 |
| 4. Estudio Histológico de los testículos..... | 86 |
| II. Experimento 2: Efecto de la administración de un Inmunógeno anti-GnRH en conejas hembras prepúberes..... | 92 |
| 1. Efectos del inmunógeno: Estudio de la Titulación de Anticuerpos..... | 92 |
| 2. Efectos de la Vacuna Sobre las Hormonas de la Reproducción en Hembras: LH, Progesterona y Estradiol. | 93 |
| 2.1.- Concentraciones de LH Sérica | 93 |
| 2.3.- Concentraciones de 17 β estradiol sérica | 95 |
| 3. Efectos Morfológicos..... | 96 |
| 3.1.- Peso Corporal..... | 96 |
| 3.2.- Medidas Ováricas..... | 97 |
| 4. Estudio Histológico de los ovarios..... | 98 |
| DISCUSIÓN..... | 102 |
| CONCLUSIONES | 112 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 114 |

INTRODUCCIÓN



I. ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADA

El hipotálamo es una estructura relativamente pequeña que se encuentra en la parte central de la base del cerebro. Está dividido en dos partes por el tercer ventrículo, formando la base y las paredes laterales del mismo. El hipotálamo tiene grupos neuronales, colectivamente denominados núcleos, que secretan hormonas mayoritariamente peptídicas importantes para controlar la actividad de la hipófisis. La hipófisis está unida al hipotálamo mediante el tallo hipofisario y se encuentra localizada en la silla turca del esfenoides. La glándula hipofisaria se divide en dos partes: un lóbulo anterior denominado adenohipófisis o *pars distalis*, y uno posterior denominado neurohipófisis o *pars nervosa*. Ambos lóbulos tiene un origen embrionario muy diferente. El primero es de origen epitelial mientras que el posterior es de origen nervioso. Entre ambos lóbulos existe una zona intermedia o *pars intermedia* con diferente importancia según la especie animal (Stevens y Lowe, 2006; Klein, 2013) (Imagen 1). Las hormonas hipotalámicas se dirigen hacia la hipófisis, bien directamente a través de los axones neuronales en la neurohipófisis o bien mediante un sistema porta de circulación en la adenohipófisis. La hipófisis responde sintetizando hormonas fundamentales para el control de las funciones metabólicas en todo el organismo.

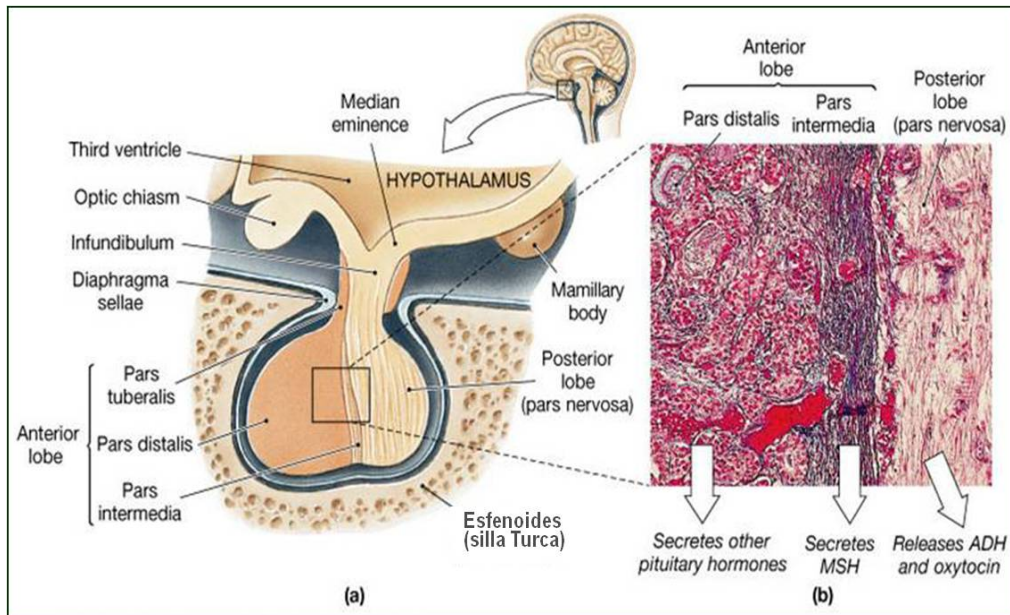


Imagen 1. Hipotálamo Hipófisis. Silverthorn, (2008a).

Fuente: www.medicapanamericana.com/materialesComplementarios/Silverthorn-6/visor.aspx

El tema sustancial de este trabajo, se centra en el estudio del eje Hipotálamo-Hipófisis y su relación con las gónadas masculinas y femeninas, de tal forma, que se enfocará esta parte de la introducción en este punto.

La conexión del hipotálamo con la adenohipófisis no implica el paso directo de axones a través del infundíbulo, sino que se realiza mediante un sistema porta venoso que conecta la eminencia media del hipotálamo con la adenohipófisis y transporta sustancias hipotalámicas que controlan la misma como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), de naturaleza peptídica. Los axones de las células neuroendocrinas, transportan dicha hormona desde el sistema parvocelular hipotalámico hasta la eminencia media, desde donde se liberan al sistema porta hipotálamo-hipofisario, en el plexo capilar primario procedente de la arteria hipofisaria superior. La síntesis de GnRH implica la producción de una molécula precursora mayor, con una región terminal de 56 aminoácidos denominada péptido asociado a GnRH. La GnRH liberada en el sistema porta es un péptido de 10 aminoácidos y es la hormona esencial para la liberación de gonadotropinas hipofisarias (Hadley, 1997a) (Imagen 2).

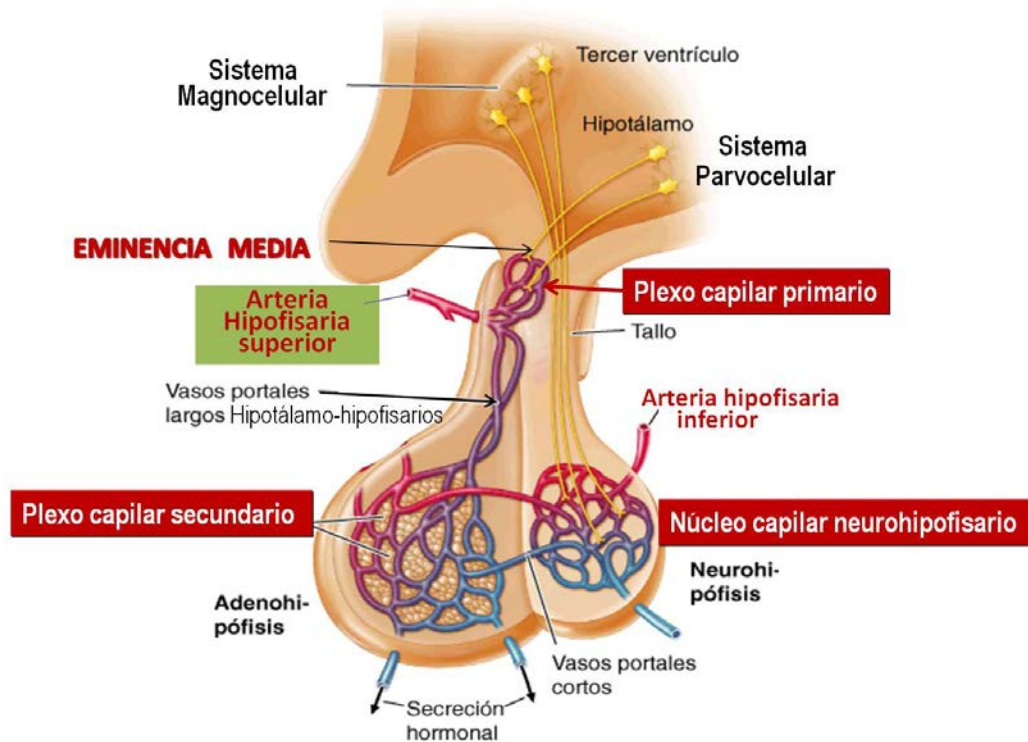


Imagen 2. Sistema Porta Hipotálamo-Hipófisis.
Fuente: McKean et al., Copyright: The McGraw Hil Companies, Inc.

La GnRH llega a las células gonadotropas hipofisarias a través del vaso largo portal, uniéndose a los receptores de membrana acoplados a la proteína G de la superficie celular, provocando la secreción y liberación de gonadotropinas (Schally *et al.*, 1971) al plexo capilar secundario, que verterá a la vena adenohipofisaria y de ahí a la circulación general, llegando a los órganos diana (Lechan y Toni, 2000).

La actividad gonadal está bajo el control del hipotálamo y de la adenohipófisis. La adenohipófisis secreta hormonas peptídicas de gran importancia en el control de la reproducción, como son, las gonadotropinas hormona folículo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

Recientemente, el hallazgo de genes Kiss-1 en el hipotálamo, ha revolucionado el concepto clásico de la intervención de diferentes neuropéptidos en el control de la liberación de GnRH. Existen dos poblaciones de neuronas que secretan kisspeptinas, una localizada en el núcleo arcuato y otra en el área dorsolateral preóptica del



hipotálamo, con diferentes acciones. Al parecer, las neuronas del núcleo arcuato son las encargadas de controlar la retroalimentación de los estrógenos (negativa y positiva) sobre las neuronas productoras de GnRH. El mecanismo de retroalimentación transitorio positivo que causa la oleada preovulatoria de LH es precedido por el aumento en la expresión del gen Kiss-1 y los altos niveles de kisspeptina en el núcleo arcuato. Así mismo, los efectos de retroalimentación negativos están asociados con la expresión reducida de Kiss-1 y con los bajos niveles de kisspeptina en el núcleo arcuato. El gen hipotalámico Kiss-1 también está implicado en el control metabólico de la fertilidad, por su papel en fenómenos claves reproductivos, que incluyen, entre otros, la diferenciación sexual del cerebro, la activación del sistema GnRH en el momento de la pubertad, el control retroactivo que ejerce en la secreción de gonadotropinas y en la oleada preovulatoria de LH. La kisspeptina, y su receptor GPR54, perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G, han emergido como elementos clave en la regulación de la secreción de GnRH. Las kisspeptinas fueron originalmente identificadas como péptidos supresores de metástasis tumorales. Sin embargo, mutaciones del gen GPR54 se han correlacionado tanto a la ausencia del inicio de la pubertad, como a hipogonadismo hipogonadotrópico. El corte proteolítico del producto primario Kiss-1 genera el decapeptido kisspeptina-10, el cual ejerce un efecto extraordinariamente potente en el desencadenamiento de la liberación de LH. La función de células kisspeptina en el área preóptica puede ser diferente a la de las células del núcleo arcuato, porque el nivel de expresión de receptores a estrógenos es inferior en esta región. La importancia de las kisspeptinas en el inicio de la pubertad, la estacionalidad de ciclos estrales en diferentes animales y las alteraciones como el hipogonadismo hipogonadotrófico, es un reto a estudiar en profundidad (George y Seminara, 2012; Marques *et al.*, 2000).

El principal patrón de liberación de gonadotropinas es pulsátil y está determinado por la secreción de GnRH desde el hipotálamo (Carmel *et al.*, 1976; Maeda *et al.*, 2010). La importancia de este sistema de liberación lo demuestran estudios donde se administró GnRH de forma continua. Una ocupación continuada de los receptores de GnRH en las células gonadotrópicas interrumpió la señal intracelular para la síntesis y

liberación de gonadotropinas, por desensibilización del receptor (Johnson *et al.*, 1976) (Imagen 3).

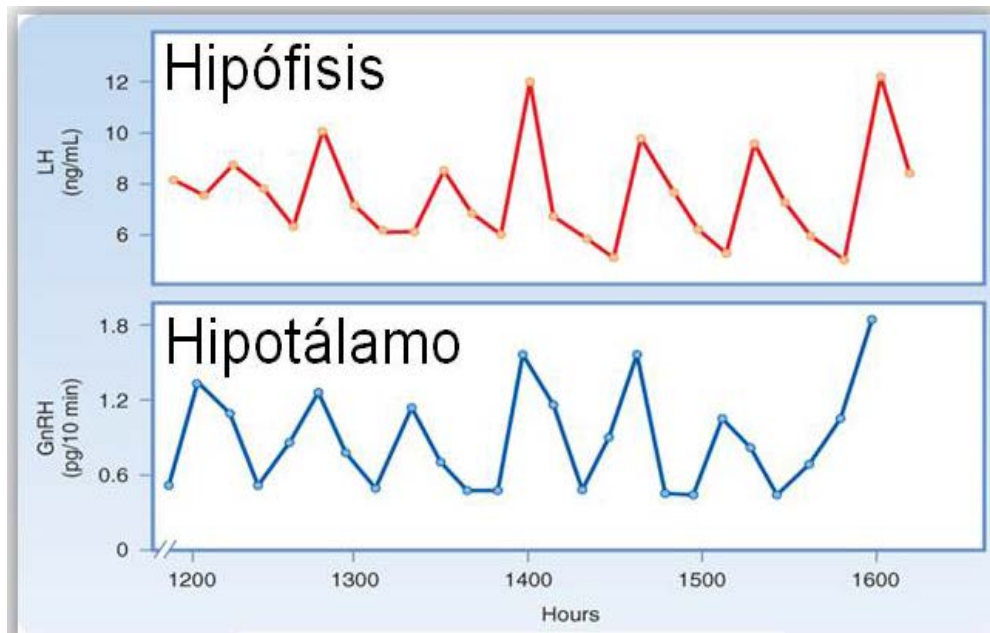


Imagen 3. Secreción pulsátil de LH y su correspondencia con la secreción pulsátil de GnRH.

Fuente: [/www.elsevierelibrary.es/pdfreader/berne-y-levy-fisiologa-student-consultcom](http://www.elsevierelibrary.es/pdfreader/berne-y-levy-fisiologa-student-consultcom).

II. ESTRUCTURAS REPRODUCTORAS DEL CONEJO MACHO

1.- Anatomía

El conejo posee dos testículos de forma ovoide alargada, con una longitud en el adulto de 30 a 40 mm y una anchura de 10 mm. Están situados en sacos escrotales, a ambos lados de la línea media inguinal. Como conductos excretores presenta el epidídimo y el conducto deferente que desembocan en las ampollas deferentes. El conducto excretor desemboca junto con el de la vesícula seminal constituyendo el conducto eyaculador. El pene es cilíndrico con 40 a 50 mm de longitud y reduce su diámetro hacia su extremidad. No posee glándula y en reposo se sitúa en el prepucio,

situado ventralmente, en cuya abertura se localizan dos parejas de glándulas inguinales sudoríparas y sebáceas (Imagen 4).

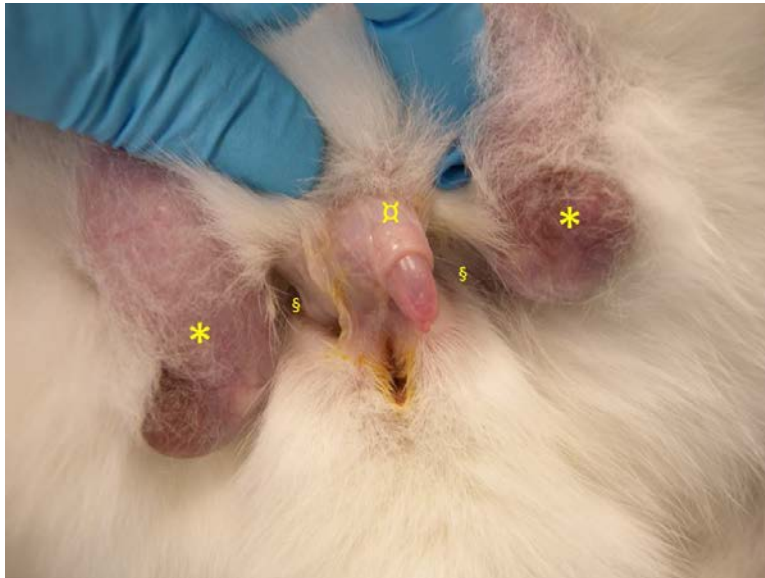


Imagen 4. Vista del pene (⊠), sacos escrotales (*) y desembocadura de las glándulas inguinales (§) en un conejo adulto en decúbito supino.
Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.

Como glándulas accesorias presenta: la vesícula seminal, impar y bilobulada, la glándula vesicular seminal, impar y situada en la cara dorsal de la vesícula seminal, la glándula prostática, por debajo de la anterior y con 4 a 6 canales excretores que desembocan en la pared del colector seminal, glándulas paraprostáticas, en la pared lateral de las ampollas deferentes y la glándula bulbouretral o de Cowper sobre la parte posterior de la uretra (Holtz and Foote, 2005).



Imagen 5. Vista dorso lateral de las glándulas vesiculares (gv), la próstata (p) y la vejiga de la orina (vu) de un conejo adulto.

Fuente: Dimitrov et al. (2013).

El testículo está cubierto de una cápsula de tejido conjuntivo dividiéndose en lóbulos (Imagen 6). Dentro de cada lóbulo se encuentran los túbulos seminíferos, conectados entre ellos por una serie de túbulos anastomosados denominada *rete testis*. La *rete testis* continúa con una serie de pequeños conductos, denominados conductos eferentes, que son los encargados de transportar el espermatozoide del testículo al epidídimo, empezando por su cabeza, cuerpo y por último la cola, llegando por último al conducto deferente.

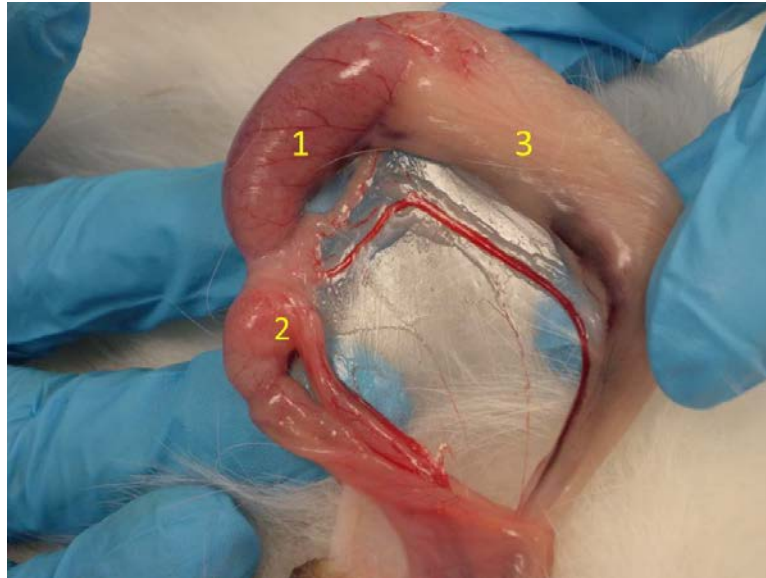


Imagen 6. Testículo (1), epidídimo (2) y plexo pampiniforme (3) de un conejo adulto extraído del saco escrotal.

Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.

2.- Histofisiología Masculina

El túbulo seminífero presenta dos compartimentos o espacios: el intratubular y el peritubular (Imagen 7).

El compartimiento intratubular está recubierto del propio epitelio seminífero compuesto de dos tipos celulares: las células espermáticas en diferentes estadios de espermatogénesis y las células de Sertoli de contornos celulares imprecisos, de forma piramidal, llegando casi hasta la luz del túbulo, presentando un núcleo en la zona basal. La espermatogénesis es la suma de los procesos que en el adulto terminan con la producción de espermatozoides, gracias a la activación del eje hipotálamo-hipófisis y a la secreción de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y de la hormona luteinizante (LH).

Las células de Sertoli rodean a los espermatozoides en desarrollo, dándoles soporte estructural y nutricional estableciendo uniones con ellos y ayudando a que progresen hacia la luz del túbulo conforme avanzan en su desarrollo. Las células de Sertoli tienen uniones estrechas entre ellas, dividiendo el espacio intratubular en una

zona basal, donde se encuentran las espermatogonias y los espermatocitos primarios, y una zona adluminal que contiene espermatocitos más desarrollados. Las células de Sertoli son las células principales del epitelio espermático y las que expresan el receptor de andrógenos y de FSH, necesiéndose ésta hormona para conseguir la producción máxima de espermatozoides. Estas células se van a encargar también de la producción de inhibina, hormona cuya producción es estimulada por la FSH, que a su vez ejerce una retroalimentación negativa sobre las células hipofisarias gonadotropas para inhibir la producción de FSH.

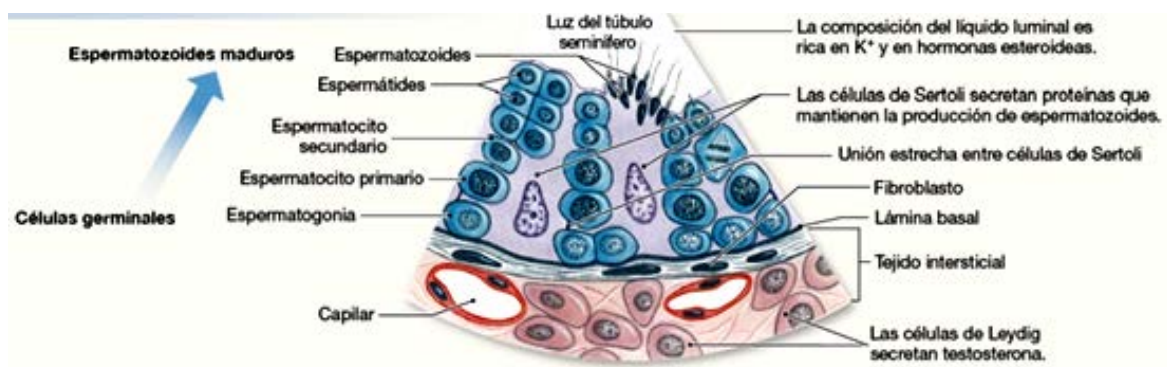


Imagen 7. Túbulo seminífero. Silverthorn, (2008b).

Fuente: www.medicapanamericana.com/materialesComplementarios/Silverthorn-6/visor.aspx.

El compartimento peritubular está formado por células de tejido conjuntivo, fibroblastos, capilares peritubulares y las células de Leydig cuya principal función es la producción de testosterona. Las células de Leydig están situadas en el tejido intersticial exterior de los túbulos seminíferos, presentan una forma redondeada aunque algunas son fusiformes (formas inmaduras) y un núcleo redondeado con uno o dos nucléolos. En el citoplasma se encuentran inclusiones de lípidos y diversas enzimas. La LH puede estimular a las células de Leydig hasta experimentar hipertrofia, mientras que en ausencia de LH se produce una gran reducción del tamaño de las células de Leydig y dejan de producir testosterona.

Alrededor de los túbulos se encuentra la lámina propia formada por tejido conjuntivo y unas células con capacidad contráctil, células mioideas, que contribuyen a la



progresión del líquido tubular y los espermatozoides a lo largo del túbulo seminífero (Silverthorn, 2008b; Koeppen, 2011a).

2.1.- Espermatogénesis

Las células madre de la espermatogénesis se denominan espermatogonias, las cuales mediante diferentes divisiones van a formar en primer lugar espermatogonias hijas que a su vez se volverán a dividir dando lugar a los espermatozoides haploides, cuando se complete la división meiótica. Las espermatogonias se localizan junto con las células de Sertoli, en la lámina basal del túbulo seminífero e irán migrando hacia la luz del mismo. Pueden ser de tipo A o de tipo B. Las espermatogonias de tipo A son menos numerosas y de forma aproximadamente oval, parcialmente rodeadas por las células de Sertoli. El núcleo es oval y el citoplasma es pálido, presentando una fina granulación. Su división es por mitosis y casi la mitad de las células hijas permanecen como tipo A que actúan como células madre, mientras que el resto se transforma en espermatogonias de tipo B.

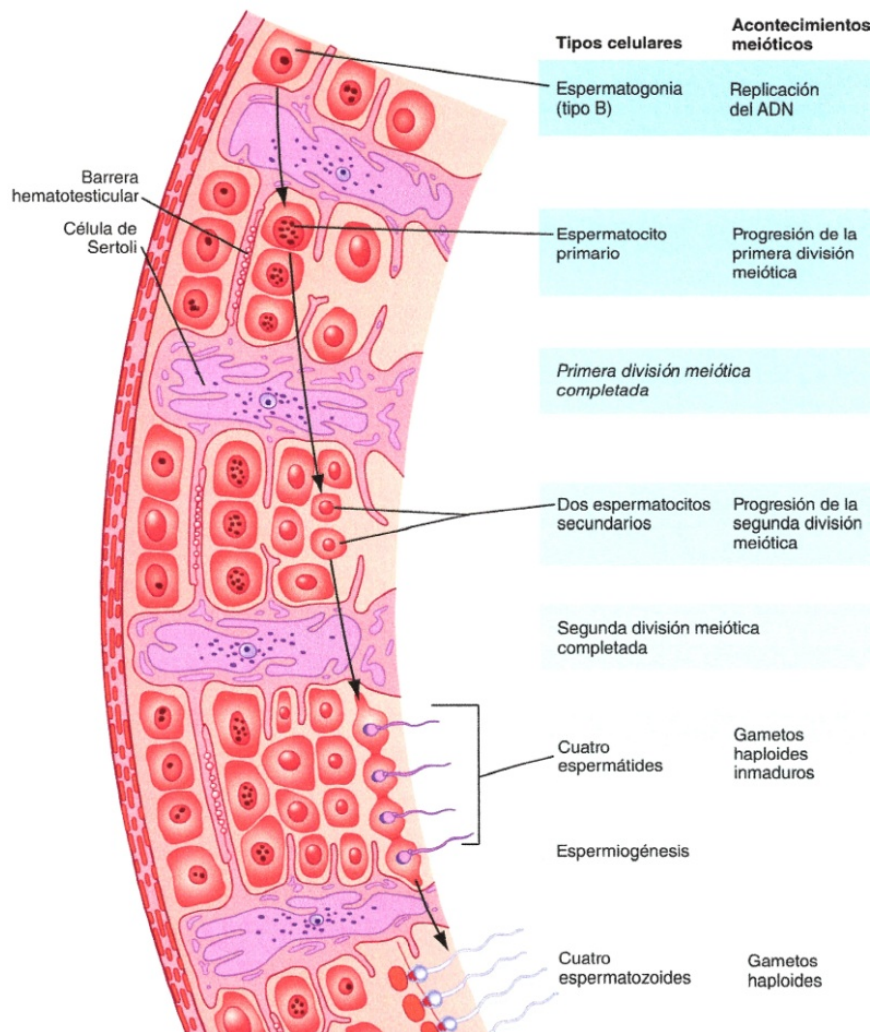


Imagen 8. Espermatogénesis.

Fuente: Carlson, 2004 en: Berne y Levy. Fisiología. Ed., Elsevier Health Sciences Spain 6ª ed.

Las espermatogonias de tipo B son mucho más numerosas y se localizan también parcialmente rodeadas por las células de Sertoli, o en contacto con otras espermatogonias de tipo B. El cuerpo celular es redondeado con un núcleo esférico. Durante los estadios de división de las espermatogonias se van a obtener los espermatocitos, en primer lugar primario, y posteriormente secundario. Los espermatocitos primarios son las células espermatogénicas más grandes del epitelio tubular y están localizadas en una posición intermedia entre las espermatogonias y las espermátidas. Por último se encuentran las espermátidas que pueden ser de núcleo



redondo o de núcleo elongado, de las cuales tras diferentes estadios de desarrollo denominados espermiogénesis, darán lugar a los espermatozoides adultos.

Posteriormente se producirá la espermiación con la liberación de los espermatozoides a la luz tubular junto con el líquido tubular que contiene grandes cantidades de testosterona, productos nutritivos, agua e iones que ayudarán a la movilidad de los nuevos espermatozoides para llegar al epidídimo donde se completará la maduración. Si los espermatozoides llegan al tracto reproductor femenino, en él se producirá la capacitación espermática haciéndolo apto para la fecundación (Young y Heath, 2000a; Koeppen, 2011a; Hall, 2016a).

3.- Control Hormonal de la Reproducción en el Macho

3.1.- Características, Acciones y Control de la Hormona Luteinizante en el Macho

En la adenohipófisis se secretan LH, FSH y tirotropina (TSH), las tres son glucoproteínas y están formadas por dos subunidades alfa y beta. En las tres hormonas, la subunidad alfa es idéntica entre sí dentro de la misma especie, siendo la subunidad beta la que proporciona la identidad de las tres diferentes hormonas.

La subunidad alfa de la LH es un polipéptido de entre 92 y 96 aminoácidos dependiendo de la especie animal. La subunidad beta muestra diferentes secuencias de aminoácidos dentro y entre especies. La subunidad beta de la LH está compuesta de 110-112 residuos, los residuos específicos de esta hormona, son los que contribuyen a la interacción con los receptores del tejido diana y por tanto, proporcionan la especificidad hormonal. La LH estimula la síntesis de andrógenos, principalmente testosterona, por las células de Leydig, las cuales responden directamente a la unión de la LH con su receptor. El receptor de LH en el macho, se encuentra en la superficie de las células de Leydig, es miembro de la superfamilia de siete dominios transmembrana acoplados a las proteínas G que ejercerá su acción intracitoplasmática a través de la activación de la Proteín Kinasa A dependiente del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (Dufau, 1988). Además de estimular la formación de testosterona, actúa indirectamente en el control de la espermatogénesis ya que la testosterona es necesaria para la maduración de las células germinales (Hadley, 1997a).



Desde hace tiempo se conoce que la testosterona, estradiol y dihidrotestosterona inhiben la secreción de LH. Al parecer, la testosterona actúa a nivel hipotalámico disminuyendo la frecuencia del pulso de GnRH, pero no la amplitud. Por otra parte, el estradiol actúa en la hipófisis disminuyendo la amplitud del pulso de LH pero no la frecuencia (Santen,1975; Tilbrook *et al.*, 1991). Sin embargo, hay cierta controversia ya que otros autores concluyen que el estradiol ejerce una retroalimentación negativa actuando en el hipotálamo disminuyendo la frecuencia pulsátil de GnRH (Hayes *et al.*, 2000).

3.2.- Características, Acciones y Control de la Hormona Foliculoestimulante en el Macho

Como se indicó anteriormente, es una glucoproteína con dos subunidades alfa y beta. Ésta última está compuesta por 117-121 aminoácidos entre los que, al igual que LH, destacan cadenas que se unirán al receptor específico, proporcionando las funciones determinadas de esta hormona. El receptor de FSH en el macho, se encuentra en la superficie de las células de Sertoli de los túbulos del testículo. El tipo de receptor también pertenece a la superfamilia de siete dominios transmembrana acoplados a las proteínas G. La unión al receptor da lugar a la producción de proteínas necesarias para las acciones de la FSH.

La FSH en el macho, es responsable de las primeras etapas de la maduración de las espermátidas. Por otra parte, estimula la producción en las células de Sertoli de proteínas de unión a andrógenos. La FSH es capaz de incrementar el número de receptores de LH en las células de Leydig haciéndolas más sensibles a sus efectos y actúa de forma sinérgica con la LH para estimular la espermatogénesis (Hadley, 1997a).

Desde hace mucho tiempo se conoce que la testosterona y el estradiol son capaces de inhibir la secreción de FSH. Posteriormente, se demostró que una glicoproteína dimerica denominada inhibina (inhibina A y B) producida en el testículo, actúa específicamente como inhibidor de la secreción de FSH en la hipófisis por un mecanismo de retroalimentación negativo. Por el contrario, una variación sobre los



3.3.- Hormonas Testiculares

Las células de Leydig se encuentran en el espacio peritubular del testículo y producen andrógenos. Los esteroides constituyen una clase de hormonas (estrógenos, progestágenos y andrógenos), con una estructura de 17 carbonos en cuatro anillos. Se producen a partir del colesterol a través de la ruta de la esteroidogénesis. Los pasos que involucran esta conversión están catalizados fundamentalmente por la familia enzimática del citocromo P450 (Inano *et al.*, 1990).

La testosterona secretada se libera desde las células de Leydig hacia los túbulos seminíferos vasos sanguíneos y linfáticos. En los túbulos seminíferos se concentra y se une a la proteína de transporte de andrógenos (ABP) necesaria para la espermatogénesis normal. Parte de la testosterona se dirige a la circulación periférica unida a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) convirtiéndose en estrógenos, fundamentalmente en tejido adiposo, y en dihidrotestosterona (Koeppen, 2011a) (Imagen 10). Los estrógenos son importantes en la maduración ósea (Karsenty, 2012), en la sensibilidad a la insulina y además, controla la producción de testosterona por un mecanismo de retrofuncionalidad negativa. La dihidrotestosterona es un andrógeno potente que está relacionado con la mayoría de las características sexuales secundarias de los machos.

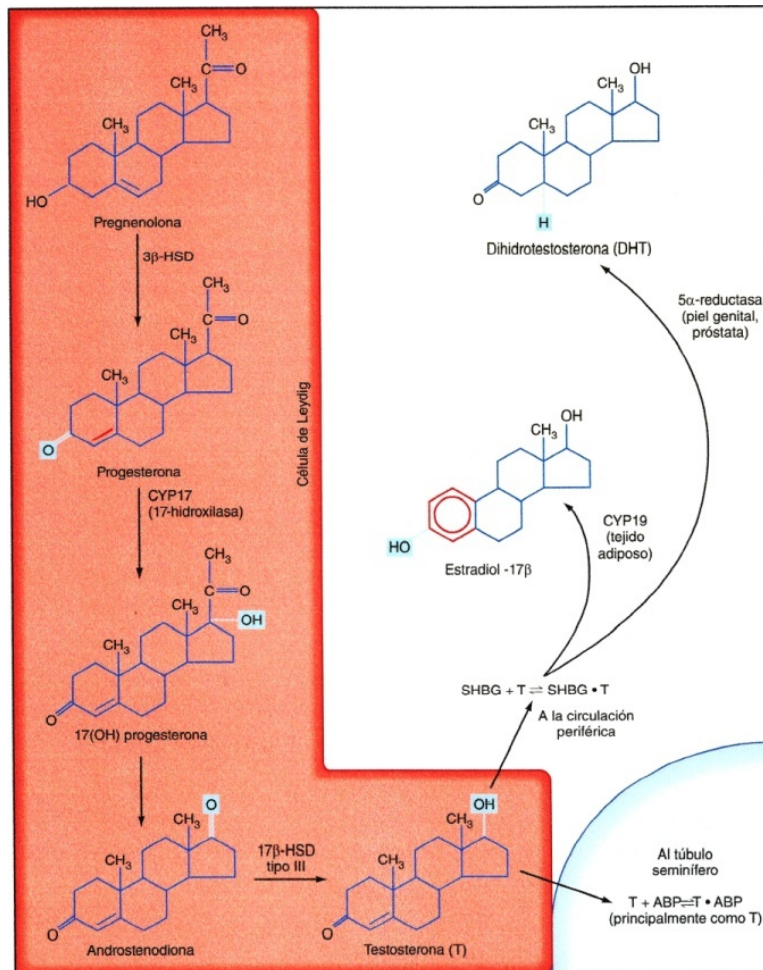


Imagen 10. Esteroidogénesis y conversión de testosterona.

Fuente: En: Berne y Levy. Fisiología. Ed., Elsevier Health Sciences Spain 6ª ed.

Por otro lado, la FSH no participa en la producción de esteroides gonadales, pero es esencial para la producción de espermatozoides normales. Las células de Sertoli, que expresan receptores de FSH de superficie celular, se extienden desde la membrana basal hasta la luz de los túbulos seminíferos, y envuelven a los espermatozoides en desarrollo, que emigran entre dichas células hacia la luz del túbulo. Las uniones estrechas entre las células de Sertoli forman una barrera hematotesticular.

La FSH es importante en el establecimiento de la población de células de Sertoli, actuando desde el periodo posnatal incrementando su proliferación y posteriormente, manteniendo el número necesario de este tipo celular e incluso en su morfología y su



disponibilidad para mantener el máximo número de células germinales (Abel *et al.*, 2008; Ruwanpura *et al.*, 2010). Aunque no se comprenden a fondo los mecanismos por los cuales la FSH favorece la espermatogénesis, dicha hormona parece estimular a las células de Sertoli para que sintetizen muchas de las proteínas y nutrientes que necesitan los espermatozoides en maduración (O'Shaughnessy *et al.*, 2009). Otra consecuencia importante de los efectos de la FSH es el incremento de la síntesis de proteína de unión a andrógenos. Si bien esta última se libera en la circulación general, también se secreta de modo directo en la luz de los túbulos seminíferos. En ese sitio, sirve para proporcionar concentraciones locales altas de andrógenos, donde se necesitan para el desarrollo de los espermatozoides.

La testosterona secretada por los testículos en respuesta a la LH tiene el efecto recíproco de inhibir la secreción hipofisaria de LH. Es probable que la mayor parte de esta inhibición sea consecuencia de un efecto directo de la testosterona sobre el hipotálamo, con inhibición de la secreción de GnRH. Este efecto, a su vez, reduce la liberación de LH y FSH por la adenohipófisis y la liberación de LH disminuye la secreción de testosterona por los testículos. Por tanto, cuando la secreción de testosterona es excesiva, este efecto automático de retroalimentación negativa, que opera a través del hipotálamo y la adenohipófisis, hace que disminuya su producción hasta valores basales (Hall, 2016a) (Imagen 11).

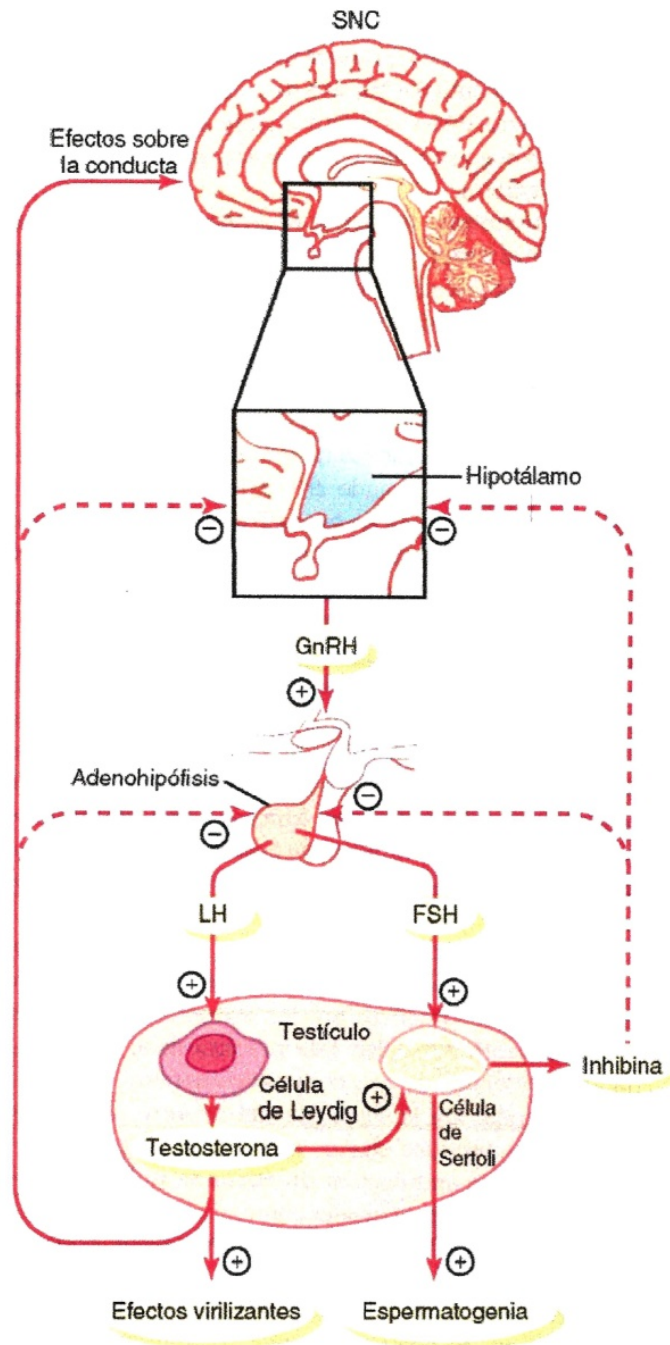



Imagen 11. Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo.
Fuente: En: Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Ed. Elsevier Health Sciences Spain.

3.3.1.- Acciones, Transporte y Metabolismo de los Andrógenos

Las hormonas sexuales masculinas en conjunto reciben la denominación de andrógenos. Las más importantes son testosterona, dihidrotestosterona y androstenodiona, entre ellas, la que se produce en mayor cantidad es la testosterona. La

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p>INTRODUCCIÓN</p> | |

testosterona se produce en las células de Leydig y parte de ella, se libera a la circulación. En ciertos tejidos como próstata o piel de los genitales externos masculinos, se convierte en dihidrotestosterona mediante la actuación de la 5 alfa reductasa. Esta hormona es más activa y también se produce en las glándulas adrenales (Moreno *et al.*, 2011a).

A nivel celular, la testosterona actúa en la célula efectora aumentando la síntesis de proteínas. La testosterona, y en general las hormonas esteroideas, se unen en la célula diana a su receptor de andrógenos intracelular. Los esteroideos son de naturaleza lipídica y son capaces de atravesar la membrana celular. Cuando el esteroide se une a su receptor, migra hacia el núcleo uniéndose a una parte específica del ADN denominada elementos de respuesta hormonal (HRE), induciendo cambios en el ADN activando la transcripción de ciertos genes, dando lugar a un ARNm que, tras la unión a los ribosomas, formará nuevas proteínas (Hall, 2016a).

Desde las células de Leydig, la testosterona se concentra en la luz del túbulo y actúa como promotora de la espermatogénesis y regula la función de las células de Sertoli. A nivel periférico, tanto testosterona como dihidrotestosterona tras la unión a los receptores de andrógenos, actúan desarrollando el sistema reproductor masculino, interviniendo en efectos metabólicos en el tejido adiposo, influyendo en la eritropoyesis, en el crecimiento óseo e incluso, actuando como anabolizante a nivel muscular. En definitiva, son responsables de las características sexuales secundarias de los machos (Koeppen, 2011a).

Cuando la testosterona se libera a la circulación, se une a proteínas de transporte como albúmina y con mayor afinidad a la SHBG. La testosterona se fija a los tejidos diana o se degradará en sus metabolitos para posteriormente, ser excretados. En el hígado, la testosterona se convierte en androsterona y dehidroepiandrosterona, se conjugan con glucurónidos o sulfatos y se liberan al intestino a través de la bilis o en orina a través del riñón (Moreno *et al.*, 2011b).



4.- Pubertad y Comportamiento Sexual del Conejo Macho

El conejo macho presenta al nacer los testículos en posición abdominal. Su descenso a los sacos escrotales coincide con la pubertad, pudiendo regresar a la cavidad abdominal en periodos estacionales de inactividad sexual, como ocurre en el conejo salvaje.

Según estudios realizados por Miro's *et al.*, (1980), la fase peripuberal empieza a los 40 días de edad y se caracteriza por una aparición simultánea de células de Leydig maduras en los testículos, un sorprendente incremento en los niveles de FSH y testosterona y un pequeño incremento en los niveles de LH a la vez que se observa una brusca aceleración en el crecimiento de los testículos que se mantiene de forma apreciable hasta los 8 meses de edad. Esta fase incluye un rápido crecimiento de las vesículas seminales.

El establecimiento de la espermatogénesis tiene lugar de forma variable hacia los 70 días de edad (Berger *et al*, 1982), según la raza, condiciones ambientales y de manejo. Berger *et al.* (1982) afirman que los primeros espermatozoides aparecen a los 60 días, aunque sólo a los 84 días todos los túbulos seminíferos habrán iniciado su actividad, apareciendo en ellos los primeros espermatozoides fértiles entre los 120 y los 150 días de edad.

En el macho adulto la duración de la espermatogénesis, tiempo necesario para que se desarrolle un espermatozoide a partir de una espermatogonia, es de 38 a 41 días. Una espermatogonia da lugar a 16 espermatocitos primarios, de cada uno de los cuales se obtiene una media de 3.1 espermátidas, lo que indica una cierta degeneración durante las divisiones de reducción y maduración. Los espermatozoides atraviesan en 7-10 días el epidídimo, donde maduran a falta de la capacitación espermática que sufren en el tracto reproductor de la hembra. La producción diaria de espermatozoides se estima en 30 a 40 millones por gramo de testículo, es decir, un total diario de hasta 150 millones, con variaciones raciales y estacionales (Revisado por Rebollar, 1993).

III. ESTRUCTURAS REPRODUCTORAS DE LA CONEJA

1.- Anatomía Fisiológica

Las estructuras reproductoras de la coneja son los ovarios, oviducto, útero, vagina y vulva.

1.1.- Ovarios.

La estructura del ovario normal varía enormemente con la edad y la fase del ciclo estral. Estos órganos en la coneja tienen una forma alargada y elíptica; son de color amarillento, apareciendo frecuentemente rodeados de grasa. Estructuralmente, los ovarios contienen folículos en distintas fases de desarrollo y si la coneja ha ovulado incluye cuerpos lúteos (Imagen 12). El ovario tiene como función la formación de oocitos viables para la fecundación. La producción cíclica de oocitos es el resultado del proceso de desarrollo folicular, regulado por la acción coordinada de gonadotropinas (FSH y LH).



Imagen 12. Ovarios de coneja adulta con cuerpos lúteos de 8 días (*), *Corpus albicans* (+), y folículos ováricos (→) en su superficie. Los círculos punteados señalan el estigma.

Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.



El ovario está recubierto de una capa epitelial simple de tipo cúbico o cilíndrico, pero con frecuencia se aplana con la edad y aumenta de tamaño. Es una combinación de glándula exocrina y endocrina, es decir, produce tanto oocitos como hormonas ováricas, principalmente estrógenos y progesterona. Los estrógenos se producen fundamentalmente durante el estro por las células de la granulosa, que convierten los andrógenos secretados por las células de la teca interna en estrógenos. La progesterona es producida principalmente por las células luteínicas grandes durante el metaestro, diestro y gestación y también por la placenta. Es una estructura ovoide dividida en una corteza exterior y una médula interior.

La corteza es una ancha zona que contiene los folículos y los cuerpos lúteos, cubierta por un epitelio de superficie de tipo cuboidal bajo. El estroma cortical está compuesto por un tejido conjuntivo laxo. La túnica albugínea es una gruesa capa de tejido conjuntivo situada inmediatamente por debajo del epitelio de la superficie e interrumpida por el crecimiento de los folículos ováricos y cuerpos lúteos, siendo apenas visible durante los incrementos en la actividad ovárica.

La médula que es el área interior en el que están contenidos los nervios, un gran número de vasos sanguíneos grandes y enrollados y vasos linfáticos. Durante la foliculogénesis se pueden definir folículos en cinco estadios morfológicos, que a su vez, se pueden agrupar en relación al momento en el que se forma el antro folicular en: folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios) y antrales (terciarios y preovulatorios) (Arias-Álvarez *et al.* 2007).

El resto del tracto reproductor se compone del oviducto, útero, vagina y vulva. El oviducto de la coneja permite la captación del ovocito en el momento de la ovulación gracias al infundíbulo que en el caso de la coneja es amplio y con numerosas fimbrias. Éste va seguido de una zona un poco más amplia que es la ampolla tubárica donde se producirá la fecundación. La porción terminal del oviducto es el istmo caracterizado por su pequeño diámetro (Imagen 13). La pared del oviducto está formada por una mucosa interna, capa muscular y serosa externa. La mucosa cuenta con numerosos pliegues ampliados por subpliegues secundarios y terciarios entre los que yacen los capilares

sanguíneos. El epitelio es monestratificado, incluyendo células ciliadas y otras glandulares, cuya proporción varía con los ciclos de maduración folicular.



Imagen 13. Vista dorsal del tracto reproductor de coneja. 1) ovario, 2) oviducto, 3) cuerno uterino, 4) cérvix uterino doble, 5) fondo de la vagina.

Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM

En la coneja, el útero no presenta prácticamente cuerpo y está compuesto por dos cuernos y dos cuellos completamente independientes que forman un útero doble. El endometrio es glandular, el miometrio tiene dos estratos de musculatura lisa circular y longitudinal, separados por un estrato vascular que irriga el órgano. En el centro de los cuellos uterinos se encuentra el canal cervical cuya mucosa carece de glándulas.

La vagina es un órgano cilíndrico, musculoso y con pliegues longitudinales. Tiene una longitud de 14-19 cm y en el suelo de la misma se encuentra el orificio uretral (Dal Bosco *et al.*, 2011). La vulva es la parte externa del tracto reproductor con 1-2 cm



de longitud (Imagen 14). Tiene dos gruesos labios y dispone de glándulas sebáceas, sudoríparas a ambos lados. El color de la vulva indica el grado de receptividad sexual de la hembra.



Imagen 14. Vulva (*), apertura de glándulas inguinales (→) y ano (⊠) de una coneja adulta.
Fuente: Rebollar PG. UPM-UCM.

2.- Oogénesis y Foliculogénesis

El desarrollo del oocito, denominado oogénesis, se produce simultáneamente al crecimiento folicular o foliculogénesis. La oogénesis es el proceso por el cual células diploides experimentan meiosis para producir gametos haploides altamente diferenciados y especializados.

Según Hutt *et al.* (2006), los folículos de la coneja se pueden clasificar conforme se expone a continuación.

Folículo primordial. El oocito se encuentra rodeado de una capa de células de la granulosa planas conectadas entre sí y al oocito mediante uniones en hendidura, las cuales permiten el intercambio de pequeñas moléculas, señales y nutrientes (Kidder y Mhawi, 2002). El diámetro del folículo y del oocito en este estadio en la coneja está en torno a 30-44 μm (Hutt *et al.*, 2006). Los folículos primordiales son la reserva ovárica de oocitos primarios. El folículo primordial puede quedar en estado de reposo o entrar en desarrollo a modo de oleadas, progresando a los siguientes estadios. El porqué algunos comienzan su desarrollo es aún un proceso que está por clarificar.

Folículo primario temprano. Comienza el inicio del desarrollo folicular transformándose algunas células de la granulosa planas en cuboides. En este momento el oocito está rodeado de una mezcla de células planas y cuboides.

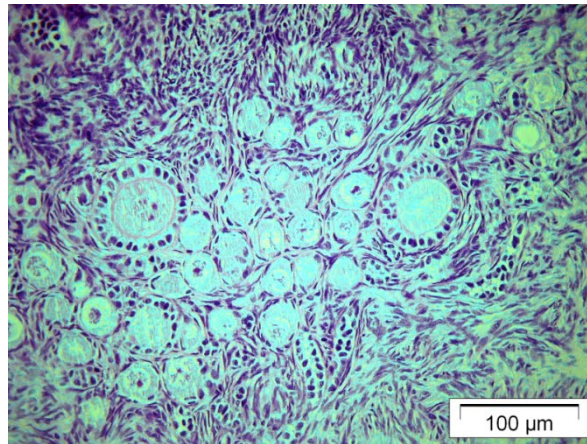


Imagen 15. Corte histológico de ovario de coneja. Abundantes folículos primordiales y primarios. HE.

Folículo primario. En este momento, el oocito está rodeado de una única capa de células de la granulosa cúbicas.

Folículo primario en crecimiento. El folículo continúa su crecimiento observándose un oocito rodeado de una o dos capas de células de la granulosa apoyadas sobre una membrana basal que está rodeada de las primeras células de la teca.

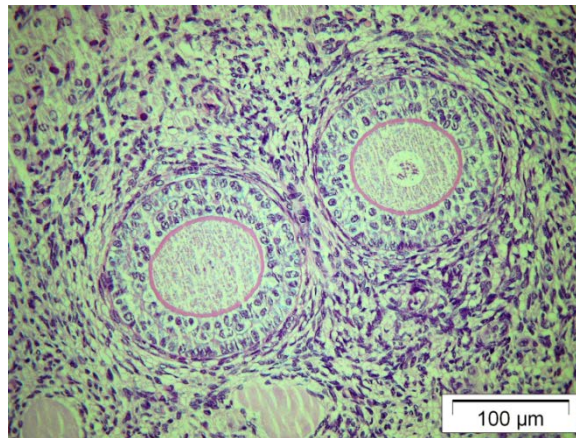


Imagen 16. Corte histológico de ovario de coneja con dos folículos primarios en crecimiento. HE.

Folículo secundario. Las células de la granulosa comienzan a proliferar formando dos o más capas alrededor del oocito que también incrementa su tamaño. También pueden observarse más claramente las células de la teca.

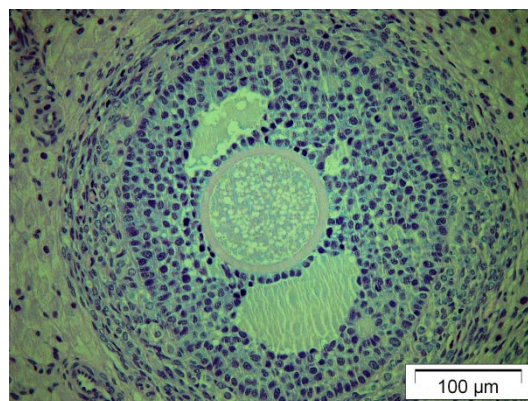


Imagen 17. Corte histológico de ovario de coneja. Folículo secundario. HE.

Folículo preantral. El oocito está rodeado de varias capas de células de la granulosa y se observa claramente la zona pelúcida.

Folículo antral pequeño. Estos folículos presentan espacios ocupados por líquido folicular, producidos por el metabolismo de las células foliculares.

Folículo antral grande. El oocito crece hasta unos 133-135 μm presenta de seis a nueve capas de células de la granulosa. Las pequeñas cavidades llenas de líquido

folicular comienzan a coalescer formando un antro de mayor tamaño. Estas células de la granulosa van a expresar el receptor de FSH, aunque van a depender sobre todo de los factores del oocito para crecer. (Jelinkova *et al.*, 1994)

Folículo preovulatorio o de Graff. El antro aumenta de tamaño y acumula gran cantidad de factores de crecimiento, hormonas peptídicas y esteroideas, proteínas, metabolitos energéticos y otras sustancias desconocidas (Sutton *et al.*, 2003). Las células de la teca interna y externa están completamente formadas, estas células expresan el receptor de LH y producen andrógenos. Las células de la granulosa poseen receptores para LH y FSH y producen progesterona y son capaces de aromatizar los andrógenos procedentes de las células de la Teca y convertirlos en estrógenos. Durante este periodo, el oocito apenas aumenta su tamaño.

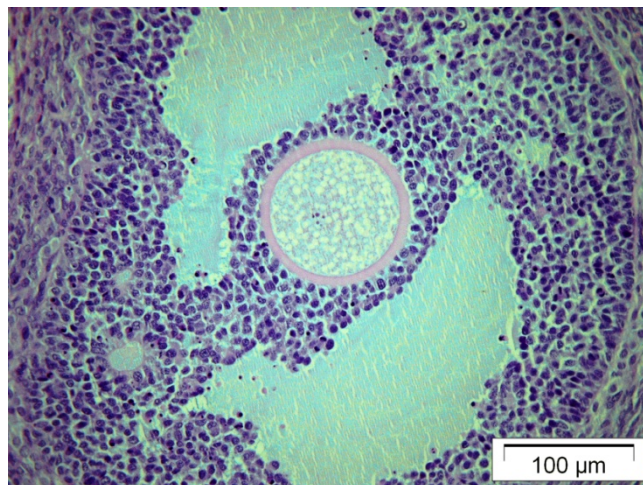


Imagen 18. Corte histológico de ovario de coneja. Folículo preovulatorio con el ovocito en el centro del folículo . HE.

Cuerpos de Call-Exner

Son células de la granulosa dispuestas ordenadamente alrededor de un espacio de fluido eosinofílico.

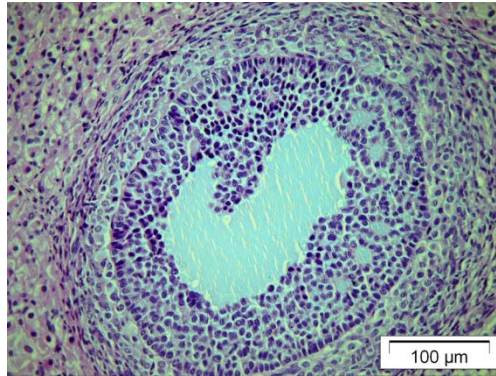


Imagen 19. Corte histológico de ovario de coneja. Folículo con cuerpos de Call-Exner. HE.

En la coneja adulta, el tiempo medio que tarda un folículo primario en alcanzar el tamaño preovulatorio sería de unos 97 días (Mariana *et al.*, 1989). Si no se produce el coito, las oleadas de desarrollo y regresión folicular son constantes, siendo la dinámica habitual del ovario. Esto supone que los ciclos se superponen parcialmente cada 4-6 días. En particular, durante el periodo post-parto, Díaz *et al.* (1987), señalaron que aparecía una primera oleada folicular al final de la gestación, coincidiendo con la caída de los niveles de progesterona circulantes en los días 29 y 30 de la misma.

3.- Ovulación y Luteinización

Tras la ovulación, el resto de la cavidad antral se rellena de sangre procedente de los vasos lesionados del estigma, dando lugar al cuerpo hemorrágico. En poco tiempo, los hematíes y restos celulares son eliminados por los macrófagos, y la cavidad antral se llena de fibroblastos con una matriz extracelular de aspecto hialino. En el cuerpo lúteo maduro, las células de la granulosa, que se transformen en células luteínicas, aumentan de tamaño y se llenan de lípidos.

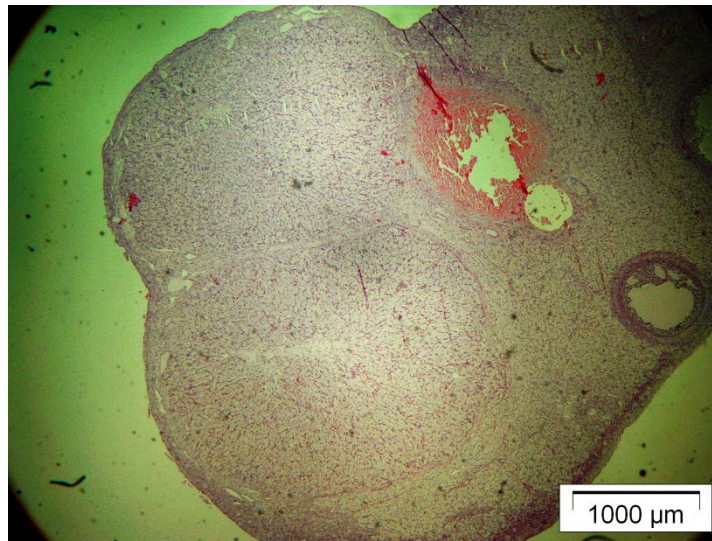


Imagen 20. Corte histológico de ovario de coneja con dos cuerpos lúteos. HE

El cuerpo lúteo (CL) se forma a partir de la pared del folículo, que se destruye y pliega después de la ovulación. La rotura del folículo conduce a una degradación de los tejidos que rodean la granulosa, sobre todo de la membrana propia, y a la liberación de la sangre de los vasos de la teca en el interior de la cavidad. Los pliegues tisulares que protruyen hacia el interior de ésta contienen células de la teca y de la granulosa y, fundamentalmente, el sistema vascular que servirá de soporte y crecimiento y diferenciación celular. Aunque las células de la granulosa son predominantes en el CL, las de la teca también contribuyen de manera significativa a la composición de su estructura. Ambos tipos celulares se transforman y luteinizan, incrementando de tamaño e incorporando gran cantidad de lípidos en su interior. La principal función del cuerpo lúteo es la de secretar progesterona, para preparar al útero para el inicio y mantenimiento de la gestación. Las células de la granulosa producen progesterona y son capaces de convertir los andrógenos producidos por las células de la teca en estrógenos gracias a la actividad aromatasas. Posteriormente el cuerpo lúteo involucre transformándose en tejido conjuntivo, denominado cuerpo albicans, que se hunde en la médula del ovario donde será reabsorbido.

4.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

La acción tanto de la hormona folículo estimulante FSH, como de la LH es esencial para el desarrollo de dichos folículos antrales. A su vez, el pico preovulatorio de la LH provoca la luteinización de las células de la granulosa del folículo preovulatorio y éstas entonces comienzan a sintetizar mayoritariamente progesterona (Van der Hurk y Zao, 2005).

En la mayoría de los animales, el sistema generador de pulsos para la liberación de gonadotropinas se incrementa en la fase folicular y disminuye en la fase luteínica del ciclo estral (Marshall et al., 1991). Una elevada frecuencia de GnRH estimula la secreción de LH, mientras que una frecuencia menor, induce la secreción de FSH.

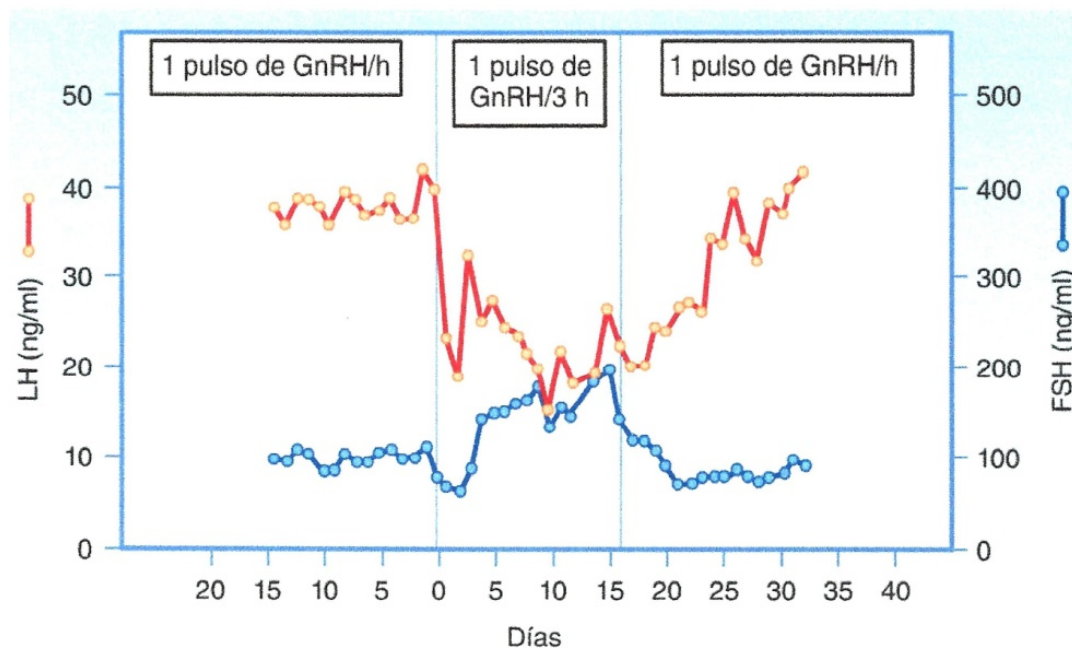


Imagen 21. Regulación de la secreción de LH y FSH por la frecuencia de pulsos de GnRH. Larsen *et al.*
En: Berne y Levy. Fisiología. Ed., Elsevier Health Sciences Spain 6ª ed.

5.- Control Hormonal

Al parecer, en la mayoría de los mamíferos, en las etapas donde se producen los folículos primordiales, no hay una clara acción hormonal. A partir de la activación de estos folículos, la acción hormonal tiene un papel importante, lo cual sucede en la pubertad.

5.1.- Características, Acciones y Control de la Hormona Luteinizante y Foliculoestimulante en el Hembras

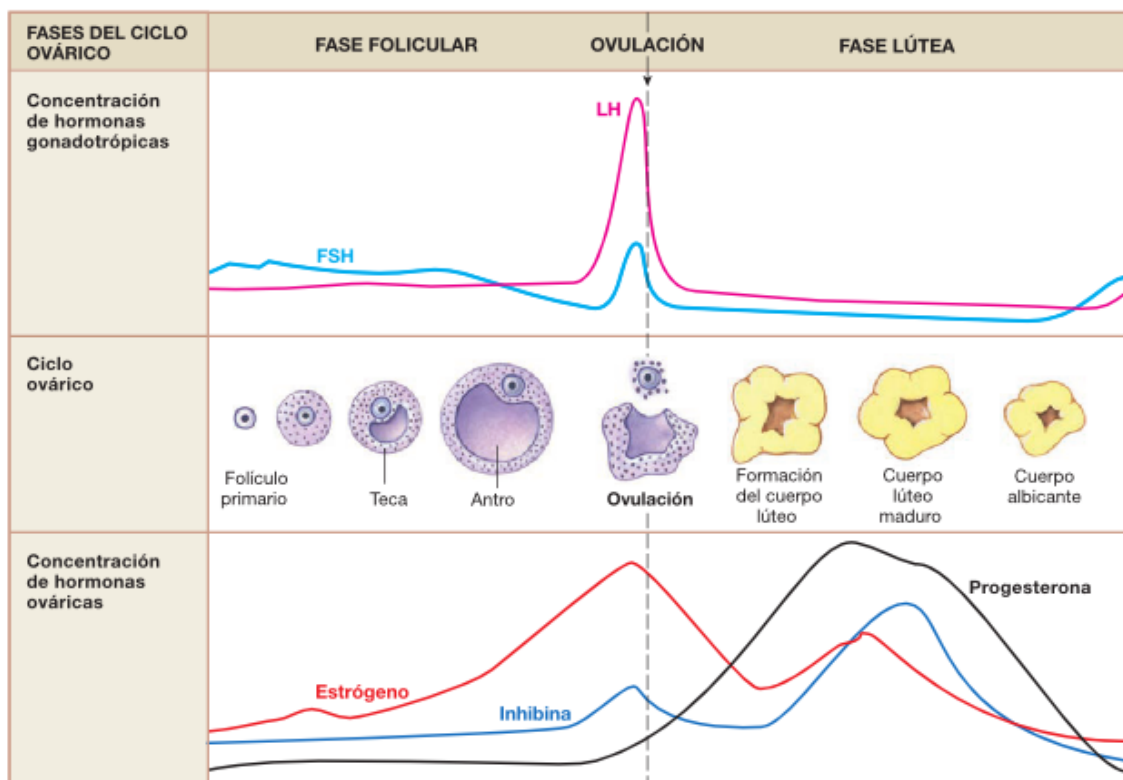


Imagen 22. Fases del ciclo ovárico.

En: Fisiología Humana: un enfoque integrado. Ed., Editorial Médica Panamericana, 6ªed.

La FSH y la LH actúan de forma sinérgica en el desarrollo de los folículos ováricos y en la ovulación. La primera tiene un papel más importante durante el crecimiento folicular,

mientras que la LH predomina en los estadios finales desde la maduración hasta la ovulación. La LH induce la ovulación en la hembra y es necesaria para el desarrollo inicial del cuerpo lúteo. La FSH es la responsable del desarrollo inicial del folículo ovárico en la hembra, interactuando con las células de la granulosa. Durante la fase de crecimiento folicular, se incrementan las concentraciones, en primer lugar de FSH y posteriormente de LH. La FSH acelera el crecimiento de algunos folículos primarios, proliferando rápidamente las células de la granulosa y además, las células fusiformes del estroma se agrupan formando dos capas celulares: la teca interna y la teca externa muy vascularizada.

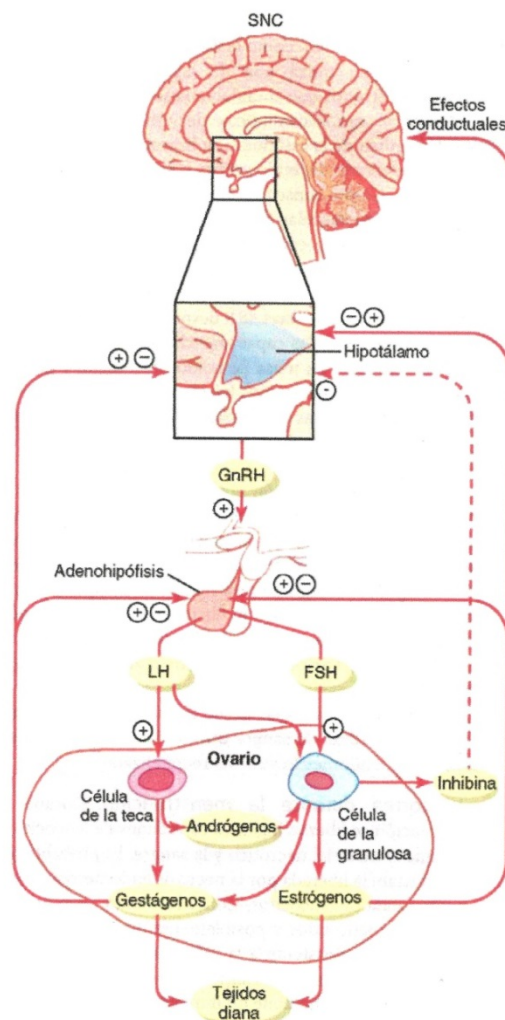


Imagen 23. Eje Hipotálamo- Hipófisis-Ovario.
En: Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Ed. Elsevier Health Sciences Spain.



Las células de la granulosa, comienzan a sintetizar grandes cantidades de líquido folicular con una alta concentración de estrógenos. Este proceso hace que las células de la granulosa expresen receptores de FSH muy sensibles a los estrógenos. Tanto FSH como los estrógenos, estimulan a los receptores de LH de las células de la granulosa. La gran concentración de estrógenos y el incremento de LH, provocan la proliferación de las células tecaes y de su secreción (Hall, 2016b).

El hipotálamo y la adenohipófisis son capaces de responder a un aumento sostenido de la secreción de estrógenos, incrementando la de gonadotropinas, mecanismo de acción que se conoce con el nombre de retroalimentación positiva o feedback positivo. El aumento de las concentraciones de estrógenos, que ocurre en la fase final del desarrollo del folículo antral, provoca un incremento de la secreción de gonadotropinas mediante el aumento de la frecuencia de liberación pulsátil de GnRH. El objetivo del aumento súbito de gonadotropinas es la inducción de cambios dentro del folículo que conduzcan a su ruptura provocando la ovulación. En momentos preovulatorios, se produce un incremento de FSH y una mayor elevación de las concentraciones de LH, denominada Pico preovulatorio de la LH.

Los estrógenos disminuyen a medida que los folículos responden al pico preovulatorio de LH. Este particular mecanismo fisiológico que marca el inicio de la ovulación, es eficaz porque permite al folículo comunicar su estado de madurez al hipotálamo y a la adenohipófisis mediante los niveles de estrógenos, que aumentan al progresar la maduración folicular (Marques *et al.*, revisado 2015).

La producción de estradiol en las células de la granulosa implica la conversión de los andrógenos sintetizados en las células de la teca. La LH controla la síntesis de andrógenos en las células de la teca. Los andrógenos son aromatizados a estrógenos por las enzimas aromatasa bajo el control de la FSH en las células de la granulosa. El estradiol estimula la liberación de líquido folicular desde estas células. Además el estradiol inhibe la biosíntesis de progesterona en el folículo actuando para favorecer la biosíntesis de andrógenos en vez de pregnenolona. Sin embargo cuando el folículo

alcanza su tamaño máximo, la FSH induce la formación de receptores de LH en las células de la granulosa. Después de la oleada de LH, la ocupación de estos receptores por la LH dirige una parte de la síntesis de esteroides a la producción de progesterona. La producción de progesterona de las células foliculares que quedan después de la ovulación es importante para que se consolide el Cuerpo lúteo (Hall, 2016b).

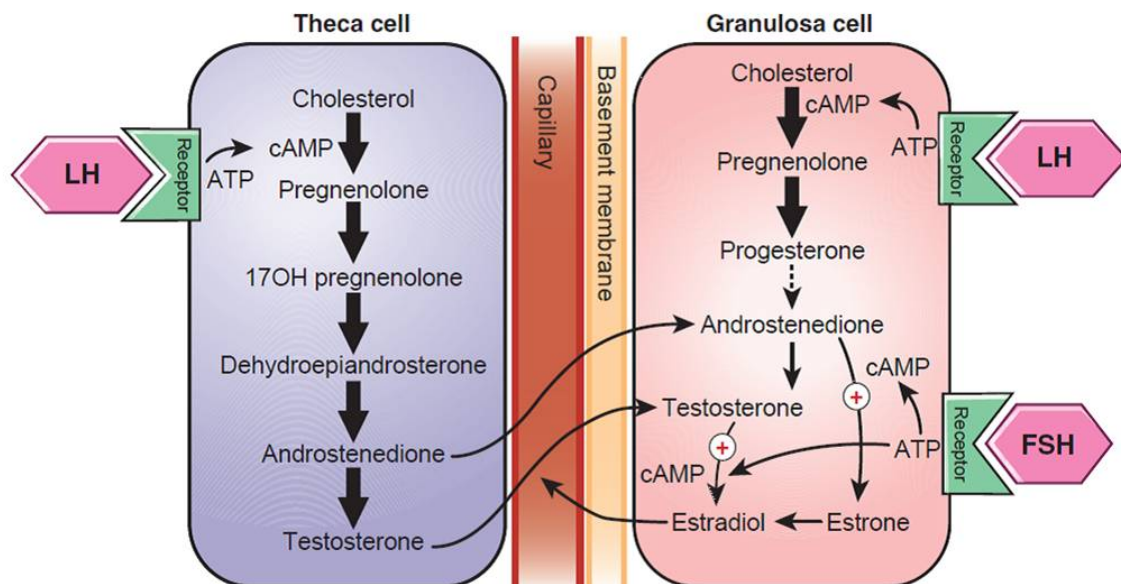


Imagen. 24. Modelo de dos células para la esteroidogénesis en el folículo dominante
 (Modificado de : Porterfield Sp, Whyte Ba: Endocrine Physiology, 3ª ed., Filadelfia, Mosby, 2007.)

Los estrógenos disminuyen la amplitud del pulso y la progesterona disminuye la frecuencia de secreción de gonadotropinas, lo que significa que durante la fase folicular, la frecuencia del pulso aumenta por la ausencia de progesterona, mientras que la amplitud del pulso disminuye por la presencia de estrógenos. Esta combinación de aumento de la frecuencia y disminución de la amplitud de los pulsos es importante en la fase final de crecimiento del folículo antral en desarrollo (Marques *et al.*, revisado 2015).



Debido a que la progesterona afecta a la frecuencia de los pulsos de gonadotropinas, se piensa que su efecto modulador se realiza a nivel del hipotálamo. Se cree que los estrógenos ejercen su efecto a nivel de la hipófisis y del hipotálamo. Aunque existen diferencias en el sitio de acción según las especie, parece ser que el lugar donde la progesterona y los estrógenos actúan en el hipotálamo para producir la retrofuncionalidad negativa de la secreción gonadotrópica, se encuentra en el núcleo arcuato. Es probable que el sitio donde los estrógenos estimulan la liberación de gonadotropinas se localice en una posición más anterior en concreto, en la región preóptica anterior del hipotálamo.

Otra hormona, la inhibina, también inhibe la secreción de la gonadotropinas, en particular de la FSH, durante las fases finales del desarrollo folicular.

6. La Pubertad de la Coneja

En el momento del nacimiento, las gonadotropinas son indetectables aumentando tras el nacimiento, gracias al descenso de los estrógenos y la progesterona previamente proporcionados por la placenta. A continuación permanecen altas durante algunos meses, pero después disminuyen y quedan suprimidas hasta la pubertad.

Durante el crecimiento prenatal, los precursores de los oocitos, conocidos como oogonias (células germinales) sufren mitosis. En torno al nacimiento, la oogonia entra en la profase de la primera división meiótica, denominándose entonces oocito. Los oocitos permanecen en reposos hasta la pubertad, después de la meiosis se reanuda de modo secuencial en unas pocas células en el ciclo estral.

El crecimiento temprano de los folículos es independiente de la actividad hormonal. Junto con el crecimiento folicular temprano las células de la granulosa elaboran una membrana mucopolisacárida, la zona pelúcida, alrededor del oocito.

El crecimiento folicular se detecta antes de la pubertad; sin embargo, este crecimiento no culmina en la ovulación hasta la pubertad.



La pubertad en la coneja es comúnmente considerada como el periodo de tiempo en que comienza la función gonadal cíclica. Según Teplitz y Ohno, (1963) y (Peters *et al.*, 1965), en la coneja las divisiones oogoniales comienzan el día 21 de la vida fetal, las oogonias se transforman en oocitos al final de la segunda semana de vida postnatal y hacia la 3ª semana éstos alcanzan la fase de diplotene, permaneciendo en dicho estado hasta el inicio de la ovulación.

De modo general se admite que las conejas alcanzan la pubertad hacia las 20 semanas de vida y cada vez las hembras destinadas a reproducción son cubiertas más precozmente. Así a principios de los años 60, la primera cubrición se efectuaba a los 5,5 y 6 meses de vida mientras que 20 años más tarde se realizaba a los 4 meses tal y como ocurre en la actualidad (Rebollar *et al.*, 2014).

El estudio de los procesos por los cuáles las conejas llegan a ser sexualmente maduras, ha llevado a observar que la concentración de las gonadotropinas hipofisarias empieza a aumentar entre los 30 y 50 días de vida (YoungLai, 1986), unas semanas antes de que en realidad la coneja haya alcanzado la madurez sexual (Hulot *et al.*, 1982; observó que las conejas tienden a copular 1 ó 2 meses antes de que sean capaces de ovular.

La hipófisis de la coneja es capaz de responder a la GnRH con un aumento de los niveles de LH a partir del día 22 de vida; este hecho demostró que el eje hipotálamo-hipofisario es funcional a partir de esta edad, pero esto no quiere decir que los niveles de LH encontrados a estas edades (22 a 100 días) sean suficientes para provocar la ovulación (Younglai, 1989).

Sin embargo el examen del ovario a las 11 semanas de edad muestra la existencia de folículos con "antrum" bien desarrollado (Levasseur, 1979), que son capaces de responder a la acción de las gonadotropinas y susceptibles de excretar esteroides. El estado de madurez que presenta el ovario a las 11 semanas sería suficiente para permitir un comportamiento de estro (Hulot *et al.*, 1982).

Sin embargo el comportamiento estral a las 11 semanas no significa que esas conejas tengan capacidad para ovular. Esta aptitud sobreviene más tarde (14 semanas) y de modo progresivo. Así, en conejas de 12 semanas de edad la inyección de GnRH no



provocó ovulación, aunque incrementó los niveles de LH circulantes en todos los animales tratados (YoungLai, 1985). Según Hulot *et al*, 1982, el peso del animal influye en la capacidad ovulatoria, de modo que en conejas de raza California se precisa un peso mínimo medio de 3 kg (3/4 del peso adulto) para obtener un porcentaje normal de hembras ovulantes.

En conejas California se ha encontrado que a las 14 semanas presentan un número de folículos preovulatorios inferior a las de 17 y 20 semanas. No obstante las conejas de 14 semanas son muy sensibles a la estimulación de los intentos de monta en días sucesivos, de modo que sus rendimientos reproductivos son equivalentes a los de edades superiores, cuando la 1ª cubrición tiene lugar al menos un día después de un intento de monta (Díaz, 1987).

El fotoperiodo y la temperatura ambiental también influyen sobre la edad a la que se alcanza la pubertad.

Experimentalmente se ha constatado que existe relación entre el desarrollo de las poblaciones foliculares y el comportamiento sexual (Lefevre y Caillol, 1978; Gosalvez, 1985; Castrovilli y col. 1986). La distribución de los folículos de conejas que aceptan la monta se caracteriza por un mayor número de gruesos folículos preovulatorios, en particular los que superan las 1.500 μ .

Por otro lado, existe una relación inversamente proporcional entre los niveles plasmáticos de progesterona y el comportamiento sexual, de modo que cuanto más bajos son dichos niveles, mayor es la probabilidad de que la coneja acepte al macho (Stoufflet y Caillol, 1986; Forcada y Abecia, 1990).

También se ha observado una relación importante entre la lactación y el comportamiento estral de la coneja, de forma que tanto la fase de lactación como el número de gazapos lactantes influyen significativamente sobre la tasa de aceptación a la monta. Según Theau-Clement and Roustan 1992), las conejas menos receptivas se presentaron sobre todo en torno a los días 3-5 de lactación y tenían un número de gazapos lactantes significativamente mayor que las conejas más receptivas.




7. El ciclo estral de la Coneja

La mayor parte de los mamíferos domésticos presentan fenómenos cíclicos de actividad, los cuales se repiten al final de una fase de actividad sexual máxima denominada celo, estro. La coneja, es un animal que no presenta un ciclo regular o, por lo menos éste ofrece variaciones muy acentuadas. Para algunos, el ciclismo ovárico está muy vinculado a las condiciones ambientales y nutricionales.

La variabilidad con que se presentan los fenómenos sexuales han sugerido dos teorías al respecto: una que niega la existencia de un ciclismo ovárico como tal y otra, que se muestra partidaria del mismo.

1.- Teoría de la no existencia de un ciclo sexual.- Hill y White, citados por Lleonart *et al*, 1980 considerando las teorías de Hammond, pensaron que la coneja carecía de ciclo estral, afirmando que están en un estado de celo continuo cuando las condiciones nutritivas les son favorables. Para estos autores los ciclos de maduración folicular se producían en oleadas de 7 a 10 días e ininterrumpidamente. En fin, al no ser la ovulación en esta especie una consecuencia directa de la culminación del desarrollo folicular, la coneja no presenta ciclo estral, por lo que se requiere de la estimulación coital para desencadenar la descarga ovulante de GnRH.

2.- Teoría del ciclo estral.- Diversos autores mantienen que la coneja presenta un ciclo estral de 16-17 días, a lo largo de los cuales sería fecundable durante 13. Lane Peter, citado por Lleonart *et al*, 1980 manifiesta que el ciclo dura 16 días, de los cuales resultan fecundables del segundo al décimo cuarto. La duración de la fase de anestro oscila, según diversos autores de 46-48 horas, durante las cuales las conejas rechazan sistemáticamente el coito. La totalidad de los autores partidarios de la teoría del ciclismo en la coneja, consideran que se trata de un ciclo incompleto, pues la ovulación no se da espontáneamente, sino que en realidad es inducida por el contacto sexual; por lo que en definitiva, es un ciclo estral monofásico bloqueado en la fase de celo.


| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">INTRODUCCIÓN</p> | |

IV. INMUNOESTERILIZACIÓN ANIMAL

La búsqueda del método contraceptivo no quirúrgico ideal para los animales se ha llevado a cabo durante todo el siglo XX y continúa en la actualidad. El producto adecuado debe ser seguro, fiable, reversible, de fácil aplicación y, a ser posible, económico. Pese a que se han descrito procedimientos tan variados como inyecciones intratesticulares o intraepididimales, vacunas antiproteínas de la zona pelúcida o antirreceptores de la LH o de la GnRH, los tratamientos hormonales son los más frecuentemente utilizados.

Los progestágenos son los fármacos más habitualmente utilizados para inducir una esterilización química tanto en el macho (acetato de ciproterona o de delmadinona) como en la hembra (acetato de megestrol o de medroxiprogesterona, proligestona). Si bien son altamente eficaces, también son conocidos por sus efectos secundarios tales como el desarrollo de piometra e hiperplasia glándulo-quística del útero, acción diabetógena, aumento del riesgo de aparición de tumores de mama y del resto del aparato genital, alteración de forma permanente de la calidad del semen, etc. Los andrógenos como la mibolerona en la hembra o el danazol u otros derivados de la testosterona en el macho también pueden ser utilizados, aunque implican efectos secundarios como vaginitis, hipertrofia del clítoris y hepatotoxicidad. Si bien, el método más popular para el control de la reproducción es la esterilización quirúrgica, este procedimiento, aplicado a programas masivos, resulta de alto costo. Además, Olson y Johnston (1993) y Olson (2002) señalan que la necesidad de regular las poblaciones de animales abandonados, con el objeto de disminuir los costos que implican la captura, mantención y eutanasia de los mismos, ha estimulado la búsqueda de nuevas opciones anticonceptivas para caninos y felinos.

La necesidad de encontrar tratamientos alternativos a estos fármacos y alternativas quirúrgicas, ha hecho que el trabajo de los últimos años se haya focalizado en la modificación de la función de la GnRH que por su capacidad para dirigir el eje hormonal de la función reproductiva, actualmente está considerada como la piedra

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p>INTRODUCCIÓN</p> | |

angular del control de la fertilidad en los mamíferos. Hasta la fecha, existen tres posibles tratamientos para modificar la funcionalidad de la GnRH:

1-Antagonista competitivo de los receptores de GnRH: son productos que bloquean el celo cuando se administran durante los tres primeros días del proestro, para posteriormente volver a entrar en celo 20 días después.

2-Agonistas de la GnRH: Aquellos que debido a su escasa vida media deben ser administrados mediante un implante subcutáneo (desloreidina o nafarelina) que los libera de forma sostenida.

Estos implantes actúan como una bomba osmótica que libera el producto de forma constante, produciendo un doble efecto. Durante los 2 a 4 primeros días provocan un aumento marcado de la secreción de FSH y LH conocido como el efecto “flare up” que induce una hipertestosteronemia marcada en el macho y la aparición del celo en las hembras. Pasado este tiempo, se produce una desensibilización de los receptores que hace que las concentraciones plasmáticas de FSH y LH vuelvan a sus niveles basales al cabo de 9 días y que exista una verdadera esterilización química a los 15 días de media.

Cualquiera que sea el agonista de GnRH utilizado, el diámetro testicular disminuye alrededor de 3 veces respecto del volumen inicial durante el transcurso de las 5 primeras semanas tras la implantación. Los valores de FSH, LH y testosterona aumentan bruscamente a partir de los 20 primeros minutos, y todos vuelven a sus valores iniciales en unas 5 horas. Las experiencias realizadas con el implante de 4,7 mg de desloreidina muestran que el nivel de testosterona del 80% de los perros es basal al cabo de 17 días, aunque esta respuesta es muy variable, oscilando entre 6 y 25 días, e incluso en un perro esto no ocurrió hasta pasados 32 días (Trigg *et al*, 2008).

La fertilidad disminuye de forma progresiva, de forma que, a los 35 días de administración del implante, existe un aumento de entre el 7% y el 70% de las anomalías espermáticas y la inmensa mayoría de perros son completamente azoospermicos al cabo de las 4 a 6 primeras semanas. Sin embargo, las observaciones



descritas por (Hoffmann , 2005), indican que estos animales pueden continuar mostrando interés por las hembras en celo.

En el caso de los gatos, el comportamiento sexual, el marcaje, la agresividad y el riesgo de fuga suelen ser tan engorrosos para el propietario que al no existir alternativas satisfactorias, la inmensa mayoría de gatos de raza son castrados quirúrgicamente a pesar de sus cualidades como reproductores. Los agonistas de la GnRH pueden suponer la solución a este problema. El único estudio realizado hasta la fecha muestra como los niveles de testosterona en el gato son inferiores a 0,1 ng/ml entre los 30 y 60 días posteriores a la implantación, permaneciendo basales durante al menos 390 días. El volumen testicular disminuye entre 3 y 4 veces y el comportamiento de macho desaparece casi por completo durante todo el tiempo en que la testosterona permanece basal (Romagnoli *et al*, 2010).

La utilización de los agonistas GnRH en la hembra tiene como inconveniente que puede desencadenar el celo según el estado del ciclo en que son implantados. En un estudio realizado por (Trigg *et al*, 2006), ninguna de las perras prepuberales de 4 meses de edad mostró signos de celo durante los 9 meses posteriores a la implantación. Por otro lado, existen muchas menos probabilidades de desencadenar el celo cuando se pone el implante durante la fase de diestro temprano o medio, sin que exista ningún efecto secundario ni siquiera en perras preñadas, que no parecen presentar ningún problema a la hora del parto (Trigg *et al*, 2001).

Existe muy poca información bibliográfica por el momento, en gran parte debido a que la ovulación en la gata debe ser inducida, con lo que los parámetros hormonales son más difícilmente controlables. Los estudios muestran que el efecto “flare up” hace aumentar la tasa de estrógenos durante unos 30 días, para luego permanecer basal durante 8 a 14 meses con los implantes de 6 mg de desloreidina y durante más de 18 meses con los implantes de 9,4 mg.



Ninguna gata implantada con 20 mg de nafarelina presentó signos de celo durante 3 años y sólo dos mostraron un aumento de la progesterona a 2,5 años mientras estaban permanentemente en contacto primero con machos vasectomizados.

Estos implantes ofrecen unas perspectivas muy prometedoras en el área de la reproducción, tanto por su inocuidad como por su gran variedad de aplicaciones. Además de la esterilización química y el retardamiento de la pubertad, los agonistas de la GnRH pueden ser utilizados para tratar todo tipo de patologías ligadas a las hormonas sexuales como problemas comportamentales (agresividad, marcaje urinario, riesgo de fuga), patologías prostáticas, hiperplasia vaginal, riesgo de aparición de tumores de mama, incontinencia...

Por otro lado, el efecto “flare up” es un arma de doble filo. Si bien la inducción del celo es muy interesante en reproducción asistida, en el contexto de esterilización química de la hembra es un efecto secundario que limita su utilización y para el que aún no se ha encontrado una solución totalmente eficaz. Además, en teoría puede agravar inicialmente los síntomas de ciertas patologías hormono-dependientes, por lo que su uso deberá ser utilizado con precaución.

La reciente introducción en el mercado de los implantes de agonistas de la GnRH abre la puerta a un tratamiento eficaz y sin efectos secundarios, y es una de las mayores revoluciones de los últimos años en el mundo de la reproducción veterinaria de los animales de compañía.

3-Immuno-esterilización: Consiste en administrar un antígeno anti-GnRH para conseguir la producción suficiente de anticuerpos para inhibir la función de la GnRH. Se considera generalmente como una alternativa relativamente favorable al bienestar. En comparación con la castración quirúrgica sin alivio del dolor, evita el dolor agudo y las complicaciones postoperatorias relacionadas con el procedimiento (especialmente criptorquidia o hernia inguinal). El dolor provocado por inmunocastración se limita sólo a la inserción de la aguja durante la vacunación (Prunier et al., 2006). Mientras que algunos autores no han indicado la existencia de reacciones secundarias notables causadas por la vacunación (Einarsson, 2006; Bilskis et al., 2012), observaron una




reacción inflamatoria de tejido local en un número relativamente elevado de animales vacunados.

La inmunocastratación no es aplicable sólo a cerdos pequeños y jóvenes, sino también a animales más viejos (por ejemplo, jabalíes) o hembras (como se practica en cría de raza ibérica), donde las heridas de castración, las complicaciones postoperatorias y el dolor asociado presentan un problema de bienestar, especialmente cuando la aplicación de anestesia / analgesia no se lleva a cabo correctamente. En comparación con la producción masculina entera, la inmunocastración reduce la agresividad y las alteraciones del comportamiento sexual que vienen con el inicio de la pubertad (es decir, 5-6 meses de edad). Poco después de la inmunización eficaz, el comportamiento de los innumizados se vuelve similar al de los castrados quirúrgicos, incluyendo el aumento de la ingesta de alimento (Cronin *et al.*, 2003, Zamaratskaia *et al.*, 2008a, Rydhmer *et al.*, 2010, Fabrega *et al.*, 2010, Albrecht *et al.*, 2012).

El comportamiento más calmado es importante no sólo para el bienestar de los animales, sino también para las canales de los animales y la calidad de la carne (menor incidencia de lesiones cutáneas, como consecuencia de menos combates y monta antes del sacrificio). En este período, los animales son a menudo mezclados, lo que desencadena la agresión relacionada con el establecimiento de la jerarquía social entre los animales (Bolher *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2006). Para los inmunocastratos, en comparación con machos enteros y castrados quirúrgicos se mostró un nivel intermedio de lesiones cutáneas causadas por dientes (es decir, agresión directa) (Škrlep *et al.*, 2011). Presentando las siguientes ventajas:

- Dolor mínimo, sin efectos secundarios.
- Reducción de la agresividad, de las lesiones corporales (en la cría en grupo, en la mezcla de animales desconocidos, especialmente antes del sacrificio).

La vacunación contra la GnRH (inmunocastración) en cerdos afecta la producción de hormonas esteroideas testiculares en los machos resultando en atrofia del tracto

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">INTRODUCCIÓN</p> | |

reproductivo y menor agresividad (Dunshea et al., 2001, Hennessy, 2006; Zamaratskaia et al, 2008a, b), mientras que en las hembras resulta en la supresión de la ciclicidad ovárica y el comportamiento del estro (Hernandez-Garcia et al., 2013). Los cerdos inmunocastados cambian rápidamente el metabolismo a castración, con el aumento del consumo de alimento y la deposición de grasa.

Si los cerdos son sacrificados alrededor de los seis meses de edad, cuanto más largo es el tiempo transcurrido entre la segunda dosis y el sacrificio, mayores son las diferencias entre los inmunocastratos y los machos enteros y la similitud con los castrados quirúrgicos (Lealiifano et al., 2011, Škrlep et al. 2012a).

La eficacia de la vacuna ha sido considerada como "reversible". De acuerdo con los estudios disponibles, no se ha descrito ninguna restitución de la función reproductiva hasta 8 (Kubale *et al.*, 2013), 10 (Brunius *et al.*, 2011) o incluso 16 a 22 semanas (Zamaratskaia *et al.*, 2008a , Einarsson *et al.*, 2009) después de una inmunización eficaz. Incluso hay indicios de que la pérdida irreversible de la capacidad reproductora puede estar asociada con la primera vacunación (Einarsson *et al.*, 2009). El protocolo triple de vacunación ya fue probado y se practica en la cría libre de cerdos ibéricos tanto en machos como en hembras (Hernandez-Garcia et al., 2013, 2015a). Presentan una inmunidad duradera al menos 20 semanas después de la tercera dosis (Dalmau *et al.*, 2015) se beneficia también de un crecimiento más rápido y de lotes más homogéneos en cerdas jóvenes inmunocastradas (Fernández-Moya, 2011).

Aparte de las propiedades beneficiosas de la inmunocastración, también hay varios inconvenientes (Škrlep *et al.*, 2014, Čandek-Potokar *et al.*, 2015). A saber, la vacuna anti-GnRH es eficaz también en otras especies y seres humanos, presentando el peligro de abuso y autoinmunización de los operadores. La autoinyección accidental puede producir efectos en las personas similares a los observados en los cerdos. El riesgo de estos efectos es mayor después de una segunda o posterior inyección accidental que después de una primera inyección (European Medicine's Agency, 2010).



Además, a pesar de la alta eficiencia del método, la inmunocastración no es 100% fiable, siempre hay un cierto número de los llamados "no efectivos" (1-3%) como lo demuestran varios informes (Kubale *et al.* 2013).

Las razones pueden ser puramente técnicas (insuficiencia / falta de aplicación de la vacuna o debido a la verdadera falta de reactividad inmunológica (debido a factores como la mala salud, la severa restricción de alimentación o el estrés), que aún no se ha explorado suficientemente. Una vez vacunados, es difícil evaluar si los cerdos fueron efectivamente inmunizados (sólo en la base de la observación del tamaño de losm testículos). Esto sólo es posible después del sacrificio. Algunos sistemas de cría incluyen períodos de restricción de alimentos, que podrían estar asociados a una menor respuesta de inmunización (Hernández-García *et al.*, 2016), sin embargo esto probablemente podría resolverse mediante la adaptación de los protocolos de alimentación y vacunación.

Ya en los últimos años de este siglo un nuevo producto, como vacuna inmunológica, salió al mercado, dentro de las vacunas frente a GnRH. Es el caso de Improvac Pfizer®, solución inmunológica desarrollada en cerdo para evitar el desarrollo del olor sexual. Este medicamento inmunológico utiliza como antígeno un análogo sintético de la GnRH, unido a una proteína transportadora para que sea inmunógeno, es decir, para ayudar a desencadenar la respuesta inmunitaria. Dicha combinación es bastante similar a la GnRH natural para ayudar a desencadenar la producción de anticuerpos que neutralizan la GnRH, pero lo suficientemente diferente para que no tenga actividad hormonal, ya que no se puede unir al receptor de la hipófisis. Al no unirse al receptor de la hipófisis no se va a inhibir la producción de las hormonas reproductivas.


Los efectos beneficiosos de la inmunización se obtienen por la disminución de la función testicular que resulta de la reducción de la actividad de la GnRH. Esto conduce a la reducción de la producción y concentración de testosterona y otros esteroides testiculares, incluyendo la androstenona, una de las principales sustancias responsables del olor sexual. Después de la segunda vacunación, puede esperarse una reducción del



comportamiento típico de los machos como monta y agresividad cuando se juntan con machos de otros corrales, para lo cual fue desarrollado dicho fármaco.

En este trabajo de investigación se utiliza este producto con el objetivo de valorar su efectividad en el campo de la reproducción, utilizando el conejo como modelo animal.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS


| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</p> | |

El control de la reproducción es una disciplina desarrollada desde hace mucho tiempo y a muchos niveles, tanto en medicina humana como en veterinaria. Para su estudio es necesario conocer la fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, ya que es el responsable de coordinar y mantener las funciones reproductivas. De forma concisa, estas funciones, se pueden describir diciendo que, en respuesta a la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica (GnRH), se produce la síntesis y secreción de las gonadotropinas hipofisarias, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH), que en definitiva, van a modular la función reproductora.

Para el control de la reproducción se venían usando procedimientos muy variados como la esterilización quirúrgica, inyecciones intratesticulares o intraepididimales, vacunas antiproteína de la zona pelúcida o antireceptores de la LH o de la GnRH. Estos tratamientos se han utilizado frecuentemente, pero si bien son altamente eficaces, también son conocidos por sus efectos secundarios indeseados como piómetra, hiperplasia del útero y aparición de tumores entre otros. (Kutzler y Wood, 2006).

Para el estudio de un método eficaz, seguro y económico alternativo a las prácticas habituales desarrolladas hasta la actualidad, se han focalizado esfuerzos en el desarrollo de productos inmunogénicos anti-GnRH con una mayor duración del efecto inmuoesterilizante.

Se planteó este proyecto, para valorar la idoneidad de la utilización del conejo como modelo experimental adecuado para el trabajo de investigación (Fischer *et al.*, 2012). Dentro de los animales utilizados en experimentación los roedores son los más utilizados, sin embargo el conejo presenta una serie de ventajas sobre ellos como son: su tamaño que favorece los procedimientos quirúrgicos y de muestreo, su facilidad de manejo, su coste de mantenimiento, sus características reproductivas (rápido desarrollo sexual, corta duración de la gestación, similitudes placentarias con la mujer, elevada prolificidad, etc.)

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</p> | |

Además, esta especie se viene empleando en estudios de reproducción ya que los embriones de conejo son ampliamente utilizados en la embriología experimental y la medicina reproductiva (Fischer y Meuser-Odenkirchen, 1988). El conejo es una especie que presenta como característica especial una ovulación inducida por el apareamiento o la estimulación hormonal, permitiendo así conocer el momento exacto de los acontecimientos reproductores, por un lado, y el ajuste del trabajo con el animal a las condiciones experimentales, por otro. Así Foote y Carney, (2000) describieron al conejo como modelo para el desarrollo de estudios reproductivos y toxicológicos y Honda *et al.* (2010) lo utilizaron como modelo para el estudio de células madre en el campo de la medicina regenerativa humana.

Esta presente Tesis doctoral ha tenido como objetivo el estudio de los efectos de la administración de una vacuna anti-GnRH (Improvac ® Pfizer), sobre la fisiología de la reproducción del conejo tanto macho como hembra: a nivel: 1) inmunológico, valorando la presencia y evolución de la producción de anticuerpos, 2) endocrino, estudiando la producción de hormonas ligadas a la reproducción en cada sexo y 3) morfológico, determinando los efectos en el peso de los individuos, de sus gónadas así como las consecuencias a nivel histológico. De esta forma, se pretende dejar la puerta abierta a nuevas investigaciones sobre posibles acciones terapéuticas de aquellos procesos patológicos que necesiten una inhibición de la función del aparato reproductor en medicina humana (Ezaki *et al.*, 2015), como pueden ser los estudios de reproducción asistida, (Neuspiller *et al.*, 2005) hipogonadismo hipogonadotrófico (Ibañez *et al.*, 2002), retraso de la pubertad, ovario poliquístico, (Ibañez *et al.*, 2002). En veterinaria puede aplicarse como, un método de control de camadas indeseadas (Xing-fa *et al.*, 2013), para la disminución de la agresividad, para la mejora del comportamiento animal y de la calidad de la canal además de un aumento del bienestar animal (Van den Broeke *et al.*, 2016).

MATERIAL Y MÉTODOS



I. ANIMALES

1. Elección del Animal

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado un total de 48 conejos 24 machos y 24 hembras, híbridos de la estirpe Blanco de Nueva Zelanda x Californiano procedentes de la granja experimental cunícola sita en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid. Se ha elegido, el conejo, por ser una especie animal con adecuadas características reproductivas para este tipo de estudios, y además por ser de fácil manejo gracias a su docilidad y tamaño y por tener grandes vasos sanguíneos que facilitan la obtención de muestras.


Todos los animales habían sido desparasitados con (Febendazol, 10-20mg/kg PO) y vacunados frente a mixomatosis y enfermedad vírica hemorrágica.

2. Condiciones de Alojamiento y Alimentación

Todos los procedimientos realizados en este proyecto fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la UCM (nº de expediente 12/2013) y de la UPM (Ref. PROEX302/15).

Los animales fueron alojados en las habitaciones del animalario del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, que reúne los requisitos exigidos por la Comunidad de Madrid y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Animalario registrado con el número EX-011-U).

Las condiciones de alojamiento fueron las siguientes: se utilizaron jaulas individuales de acero inoxidable de 48 x 61 x 46 cm; la comida se administró en forma de pellet comercial específico para lagomorfos (NANTA SL) con 533g/kg de fibra, 16 g/kg de proteína, 31,5g/kg de grasa y 16,4MJ/kg de energía a razón de 150 g/día. El agua de bebida se administró "*ad libitum*", con la utilización de bebederos automáticos. La habitación se mantuvo con ambiente controlado: temperatura de 20-22°C, humedad relativa del aire 50-55% y 10-15 renovaciones de aire por hora.

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">MATERIAL Y MÉTODOS</p> | |

La iluminación de la habitación se reguló automáticamente utilizando un ciclo de luz/oscuridad de 12/12h, durante toda la experimentación. En estas condiciones permanecieron los animales durante el periodo de aclimatación de 15 días y el periodo experimental. Todos los animales fueron explorados y examinados diariamente para comprobar su estado de salud.

II PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN

1. Experimento I: Administración de un Inmunógeno anti-GnRH en Conejos Macho Prepúberes.

Este experimento se llevó a cabo con 24 machos prepúberes. Los animales presentaron unos pesos comprendidos entre los dos kilos y medio al principio del estudio y una edad de 1mes hasta cuatro kilos al final del experimento y una edad de 6 meses.

Todos los animales se identificaron por microchip (lado izquierdo del cuello) para un mayor control sanitario e identificación en todo momento. Antes de proceder a la inmunización se rasuró y desinfectó el dorso de todos los animales.

El producto empleado para la inmunización es una anti-GnRH que contiene un péptido conjuado de GnRH en una base acuosa como adjuvante (Improvac®) Pfizer Animal Health SA. En todos los animales se inyectó vía SC el inmunógeno en diferentes zonas y en dos momentos: a las 11 semanas de edad y un mes más tarde, a las 15 semanas de vida del animal. Las dosis que se han utilizado en este trabajo de investigación fueron obtenidas de los trabajos realizados por Xingfa Han et al, 2014 y por Xingfa Han et al, 2013 ya que es la bibliografía más reciente, a pesar que la vacuna utilizada no es la misma.

Los animales se agruparon de forma aleatoria en cuatro lotes dependiendo de la dosis que se les iba a administrar. De esta forma los animales se dividieron en los siguientes grupos:



1.1.- Grupos Experimentales y Tratamiento de los Machos

GMV100: Machos inmunizados con una concentración de inmunógeno de 100 µg/mL.

GMV50: Machos vacunados con una concentración de inmunógeno de 50 µg/mL.

GMV25: Machos vacunados con una concentración de inmunógeno de 25 µg/mL.

GMC: Machos control a los que se les administró de la misma forma, suero fisiológico.

2. Experimento II: Administración de un Inmunógeno anti-GnRH en Conejos Hembra Prepúberes

2.1.- Grupos Experimentales y Tratamiento de las Hembras

A todas las hembras se les administró el inmunógeno con la misma pauta que a los machos y estos son los grupos experimentales:

GHV100: Hembras vacunadas con una concentración de inmunógeno de 100 µg/mL.

GHV50: Hembras vacunadas con una concentración de inmunógeno de 50 µg/mL.


GHV25: Hembras vacunadas con una concentración de inmunógeno de 25 µg/mL.

GHC: Hembras control a las que se les administró de la misma forma, suero fisiológico.

3. Período Experimental de los Experimentos I y II

3.1. Fase Pre-Experimental

La duración de esta etapa fue de 15 días durante la cual, los animales fueron inspeccionados y controlados sanitariamente para facilitar su correcta adaptación a las

| | |
|---|---|
| <p>Immunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p>MATERIAL Y MÉTODOS</p> | |

nuevas condiciones de alojamiento, consiguiendo así, que sus contantes fisiológicas se mantuvieran estables y minimizar el posible estrés que pudieran presentar.

3.2. Fase Experimental

Durante este periodo todos los conejos fueron pesados semanalmente para comprobar su estado de nutrición y salud.

3.2.1.- Protocolo de recogida de muestras sanguíneas

Para la realización de este estudio se han tomado muestras sanguíneas a todos los animales, desde la semana 11 hasta la semana 19 de vida, efectuando la extracción siempre a la misma hora (9:00 am), para evitar variaciones debidas al ritmo circadiano hormonal. Tal y como muestra la figura 1, las tomas de muestras sanguíneas denominadas T-1, T0, T1, T2, T3, T4 y T5, se efectuaron siguiendo un cronograma diseñado para obtener la mayor información posible. La T -1 fue realizada a las 11 semanas de vida (etapa prepuberal) de los animales e inmediatamente antes de la administración de la primera dosis del tratamiento inmunogénico en las diferentes concentraciones según el grupo y la inoculación de suero salino a los grupos control, tanto de machos como de hembras. La T0 se efectuó a las 15 semanas de vida e inmediatamente antes de la inoculación de la segunda dosis de. El muestreo sanguíneo de T1 a T5, se realizó semanalmente.

A las 25 semanas de vida se realizó una estimulación hipofisaria mediante la administración de, gonadorelina, un análogo sintético de GnRH (Inducell GnRH®, Laboratorios Ovejero, León, España), vía intramuscular. Las extracciones sanguíneas se realizaron en los minutos 0, 60, 120 y 180 post-inyección (Tomas 6, T7, T8, y T9). La última muestra (T10) se extrajo en la semana 26 de edad e inmediatamente se procedió al sacrificio de los animales.

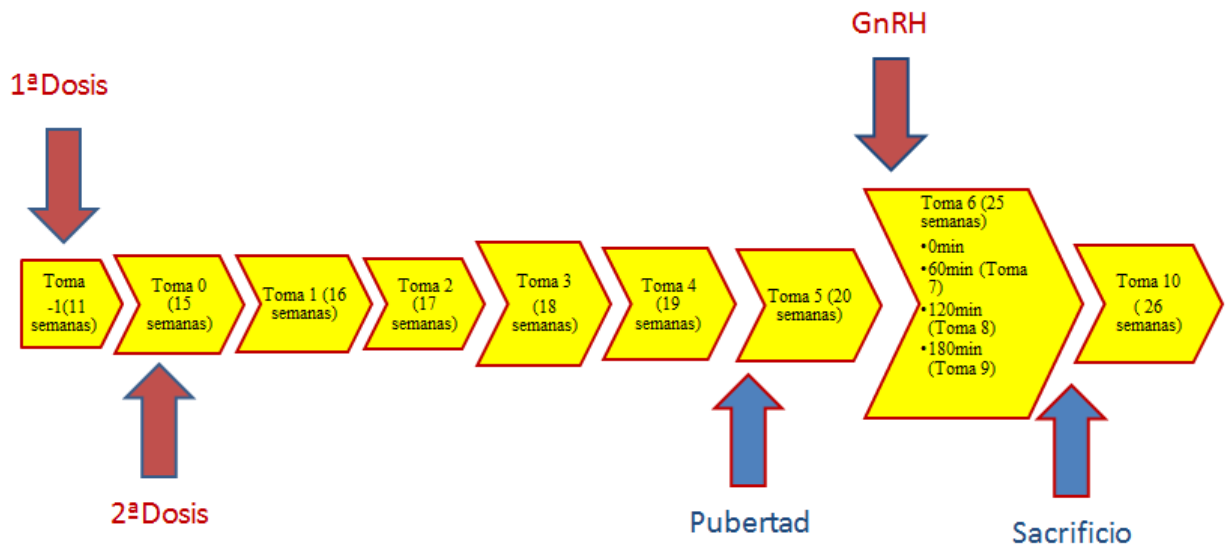


Figura 1: Esquema de los diferentes momentos importantes del periodo

La extracción se realizó en la arteria central de la oreja con agujas de 21G y con la ayuda de cepos blandos (Bolsa de contención, Mole) para la sujeción e inmovilización de los animales, utilizando el método de Illera (1990), mediante el cual se consiguen cantidades suficientes de sangre evitando la lesión del vaso y sin forzar la salida de sangre para no provocar hemólisis.



Imagen 25: Arteria central de la oreja del conejo



Imagen 26: Método de sujeción de conejos



3.2.2.- Protocolo de recogida de muestras tisulares

En la semana 26 de vida, los animales fueron eutanasiados mediante la administración por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja, de un preparado farmacológico (T 61® Intervet International GMBH, Alemania) específico para ello y siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el sacrificio de los animales de cada grupo, se aislaron diferentes órganos y tejidos de interés de cada uno de ellos, tanto de machos como de hembras.

En los machos una vez extraídos los testículos, se separaron del epidídimo y de la grasa que les rodeaba. Se pesaron con una báscula de precisión (Adam ACB plus-300), se midieron con un palmer milimetrado y se etiquetaron.

Los ovarios de las hembras se separaron de los tejidos adyacentes y también se pesaron y midieron. Además, se contaron los cuerpos lúteos, hemorrágicos y folículos que se observaron en la superficie del ovario. Posteriormente las gónadas se incluyeron en formol (Formaldehído 3,7- 4,0% tamponado a pH=7 y estabilizado con metanol. DC Panreac) para su posterior análisis histológico.

III DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS Y METODOLOGÍA UTILIZADA

1. Determinación de la Titulación de Anticuerpos anti-GnRH en Conejos

1.1. Fundamento de la Técnica ELISA Indirecto

La técnica ELISA Indirecto se basa en la reacción entre el antígeno fijado a una fase sólida y el anticuerpo específico que se encuentra en la muestra problema. Para revelar esta unión antígeno-anticuerpo se necesita la adición de un segundo anticuerpo anti-especie unido a una enzima. Se produce una segunda reacción de unión entre los dos anticuerpos. A continuación, se mide la fracción del anticuerpo secundario unido al complejo mediante la reacción del sustrato-cromógeno con la enzima, lo cual se traduce en la oxidación del cromógeno produciéndose una reacción coloreada cuya intensidad será directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos de la muestra problema.



1.2. Pasos previos para el desarrollo de la técnica

En primer lugar se tuvo que desarrollar, poner a punto y validar esta nueva técnica ya que no existen kits comerciales para determinar el título de anticuerpos específicos anti-GnRH de conejo. Los resultados de la validación, se expondrán en el apartado de “resultados” los cuales fueron satisfactorios para la utilización de nuestra técnica.

Todos los pasos realizados para la validación de la técnica, siguieron las recomendaciones de las Normas de Validación de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

1.- Dilución de las muestras

Primeramente, se eligieron muestras de suero de los animales tratados que se consideraron altamente positivas y se realizaron diluciones seriadas desde pura hasta 1/64.000. Posteriormente se eligieron aquellas que dieron una respuesta específica, suficientemente fuerte. En nuestro caso, se optó por aquellas diluciones que tuvieron las máximas densidades ópticas de muestras indudablemente positivas, sin llegar al límite superior que es capaz de discriminar el espectrofotómetro.

2.- Controles

Se realizaron diferentes pools de sueros negativos procedentes de animales no vacunados y de varios pools de sueros positivos que se presupusieron correspondientes a niveles bajos, medios y altos de anticuerpos anti-GnRH. En todas las placas se incluyeron controles positivos y negativos.

3.- Curva estándar

Ante la imposibilidad de obtener anticuerpos anti-GnRH específicos de conejo, se decidió realizar una curva estándar con un pool positivo que se consideró de niveles medios. Los resultados se ajustaron utilizando un algoritmo de 5 parámetros logísticos.



1.3. Desarrollo de la Técnica ELISA Indirecto

1.- Inmovilización del antígeno, en este caso GnRH (GNRH1 Protein antibodies-online, Alemania), a la fase sólida, placa de poliestireno de 96 pocillos de alta absorción, (Ninety-six-well EIA high-binding. Corning Inc, Corning NY USA), a una dilución 1/200 en tampón carbonato bicarbonato 0,2 M pH 9,6 (Coating buffer) (BupH™ Carbonate-Bicarbonate Buffer Packs. Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), añadiendo 100 µL en todos los pocillos, excepto aquellos que actuaron como blanco, durante 1 hora a 37°C y en agitación (Shaker dts-4 sky line, ELMI).

2.- Fase de Bloqueo. Se añaden 300 µL/pocillo de una solución tampón fosfato salino (PBS) con 1% de albúmina sérica bovina (BSA), pH 7,4 (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) (Blocking buffer) durante 8 horas a 4°C.

3.- Adición de 100 µL/pocillo, por duplicado, de controles positivos y negativos y de las diluciones de las muestras (1/2.000, 1/4.000; 1/8.000) en buffer EIA compuesto por una solución tampón PBS (Buffer fosfato salino) con 0,1% de BSA, pH 7,4. Se dejaron en incubación durante 1 hora a 37° C en agitación.

4.- Adición del anticuerpo secundario. Se dispensaron 100 µL a todos los pocillos de una dilución con buffer EIA (1/10.000), de un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Goat anti-rabbit IgG-HRP. Southern Biotech. Birmingham, AL, USA). Se mantuvieron en incubación durante 1 hora a 37° C en agitación.

5.- Adición de 100 µL a todos los pocillos del sustrato y cromógeno TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) (1-Step Ultra TMB-ELISA. Pierce Biotechnology. Rockford, IL, USA). La reacción se produce en 5 a 10 minutos comprobando el adecuado desarrollo del color.

6.- Frenado de la reacción enzimática, utilizando ácido sulfúrico al 10% añadiendo 100 µL a cada pocillo.

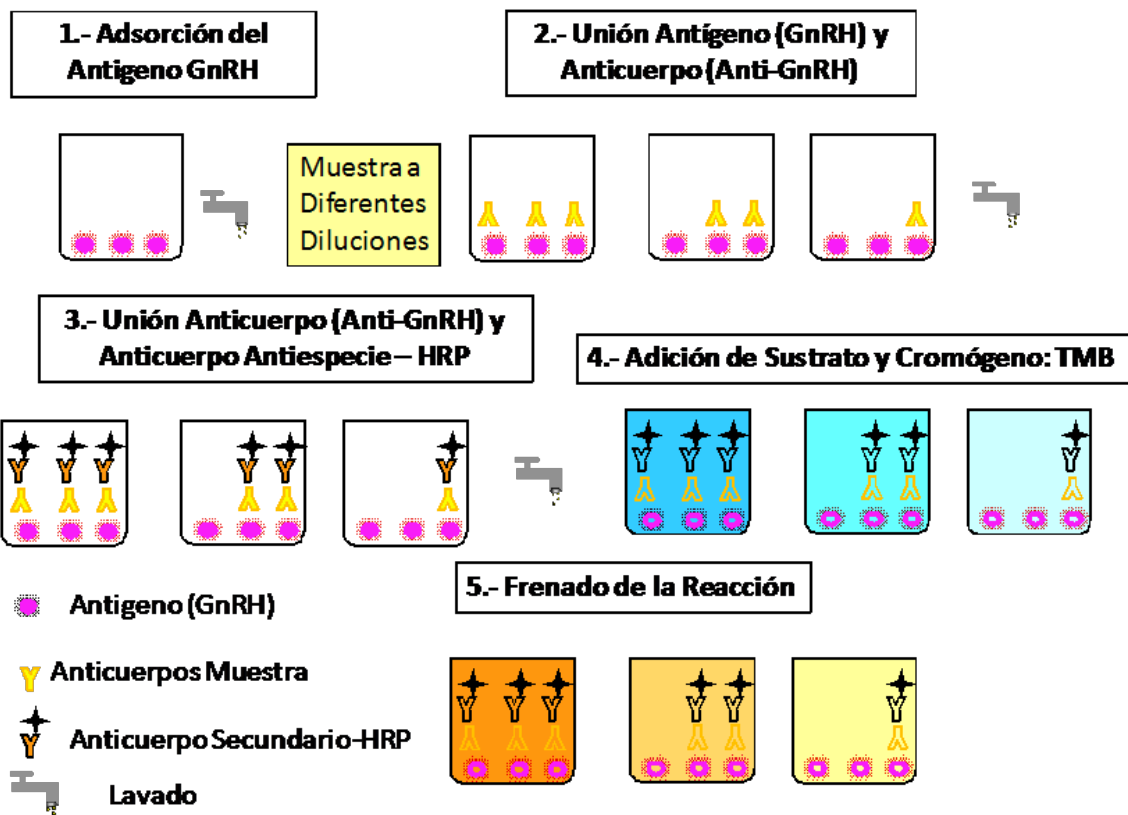



Imagen 27 : Esquema Elisa Indirecto

7.- Lectura de las placas en un espectrofotómetro para placas ELISA (Stat Fat® 3200. Awareness Technology Inc, USA), a una longitud de onda bicromática de 450-630 nm que realiza una doble lectura eliminando el color producido por una posible reacción inespecífica de fondo.

Entre etapas, excepto entre la 5 y 6, se realizó un lavado de la placa utilizando una solución de lavado preparada como solución concentrada 10X. Para 1.000 ml de dicho reactivo, se necesitan 87,66 g de NaCl 1,5 M y 5 mL de Tween-20 (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA o Madrid, España) al 0,5%. Para ello se utilizó un lavador automático de placas (LT-3000 microplate washer, Labtech) que administra, aspira y seca la solución de lavado eliminando así el exceso de reactivos no adheridos al pocillo. Las placas, en todos los procesos de incubación, se sellaron con films de acetato adherentes (Sarstedt, Barcelona, España) y se mantuvieron en agitación y a temperatura

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">MATERIAL Y MÉTODOS</p> | |

constante de 22°C como temperatura ambiente en un incubador (Shaker dts-4 sky line, ELMI Thermostat).

1.4. Procesado de los resultados: Normalización de los valores

En el ELISA, una lectura de la densidad óptica (DO) es una medición de la intensidad de color, que está en función de la cantidad de anticuerpo presente en la muestra, que se corresponde con una reacción entre enzima y sustrato en presencia de un cromógeno. Por lo tanto, los resultados en cada momento dependerán de factores externos como la temperatura, el tiempo de reacción, etc. La comparación de los resultados de DO obtenidos con una misma muestra entre distintas ejecuciones de una prueba, carece de precisión debido a dichas variaciones. Por lo tanto, los resultados de DO de las muestras problema tienen que ajustarse de acuerdo con las DO de uno o más patrones de referencia de cada ejecución de la prueba. Este proceso se denomina “normalización” de los resultados del ELISA (Norma de Validación de la OIE; Sección A.2.7).

Un método sencillo y muy utilizado consiste en expresar todos los valores de DO como porcentaje de un solo suero control positivo fuerte que se incluye en cada placa. Los valores “normalizados” se pueden expresar como en porcentaje de un control positivo. Para la interpretación de las lecturas, las DO fueron transformadas en porcentajes de positividad (PP). El control positivo de cada placa se consideró con un 100% de PP.

1.5. Validación de la técnica

El desarrollo de la prueba se realizó siguiendo las Recomendaciones de la OIE para la validación 2014 (Capítulo 3.6.1 Desarrollo y optimización de las pruebas de detección de anticuerpos). Se analizaron los siguientes parámetros: especificidad, precisión, sensibilidad, paralelismo y linealidad de la nueva técnica.

1.5.1.- Selección de las condiciones óptimas de ensayo

Se realizó la estandarización del ELISA Indirecto para la determinación de



anticuerpos séricos anti-GnRH, variando parámetros como concentración de tapizado del antígeno GnRH, tipo y condiciones de bloqueo y diluciones del conjugado, con el fin de seleccionar en cada caso la mayor respuesta para el control positivo, los menores valores para el control negativo y el blanco.

1.5.2.- Parámetros de validación

El ELISA se realizó según las condiciones óptimas alcanzadas en la estandarización y descritas en el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) No: 12-264.

1.- Especificidad

Este parámetro depende de las características del antígeno. Este parámetro está valorado por el suministrador del mismo (GNRH1 Protein, antibodies-online, Alemania)

2.- Precisión

La precisión de la técnica se evalúa calculando la repetibilidad de las concentraciones medidas por la técnica en el mismo ensayo o en ensayos diferentes. Para lo cual se calculan los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo. Se estimó titulando tres muestras de suero de alto, medio y bajo título de anticuerpos. Cada muestra se analizó en todas las placas del proyecto. Los resultados que se obtuvieron fueron de 7,32 %, 5,27% y 7,45% respectivamente.

3.- Sensibilidad

Se puede calcular mediante el límite de detección (LOD). El límite de detección es una medida de la sensibilidad analítica de una prueba. El LOD es la cantidad estimada de anticuerpos en una matriz determinada que produciría un resultado positivo. Para ello se analizaron 3 pools de suero negativo en todas las placas analizadas. Se tomó como estimado del límite de detección el valor promedio, más tres veces la desviación estándar. Los resultados fueron del 30 % tras normalizarlos.



4.- Interval de funcionamiento de la prueba

El intervalo de funcionamiento de una prueba es el intervalo de concentraciones o títulos del análisis en el cual el método aporta una exactitud y precisión idóneas. Para determinar formalmente este intervalo, se selecciona una muestra considerada positiva alta y se lleva a cabo una dilución seriada de esta muestra. Los resultados se trazan en una “curva de respuesta”, la densidad óptica es función de las diluciones de la muestra.

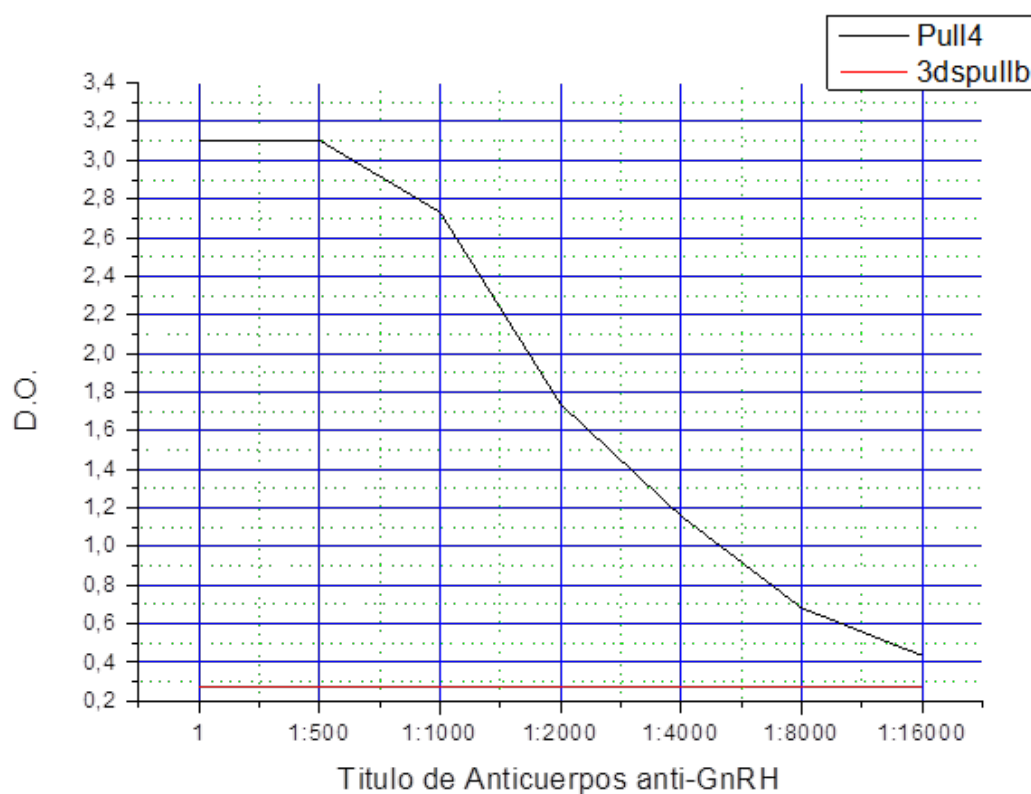


Figura 2. Curva de Respuesta de un pul alto de anticuerpos anti-GnRH

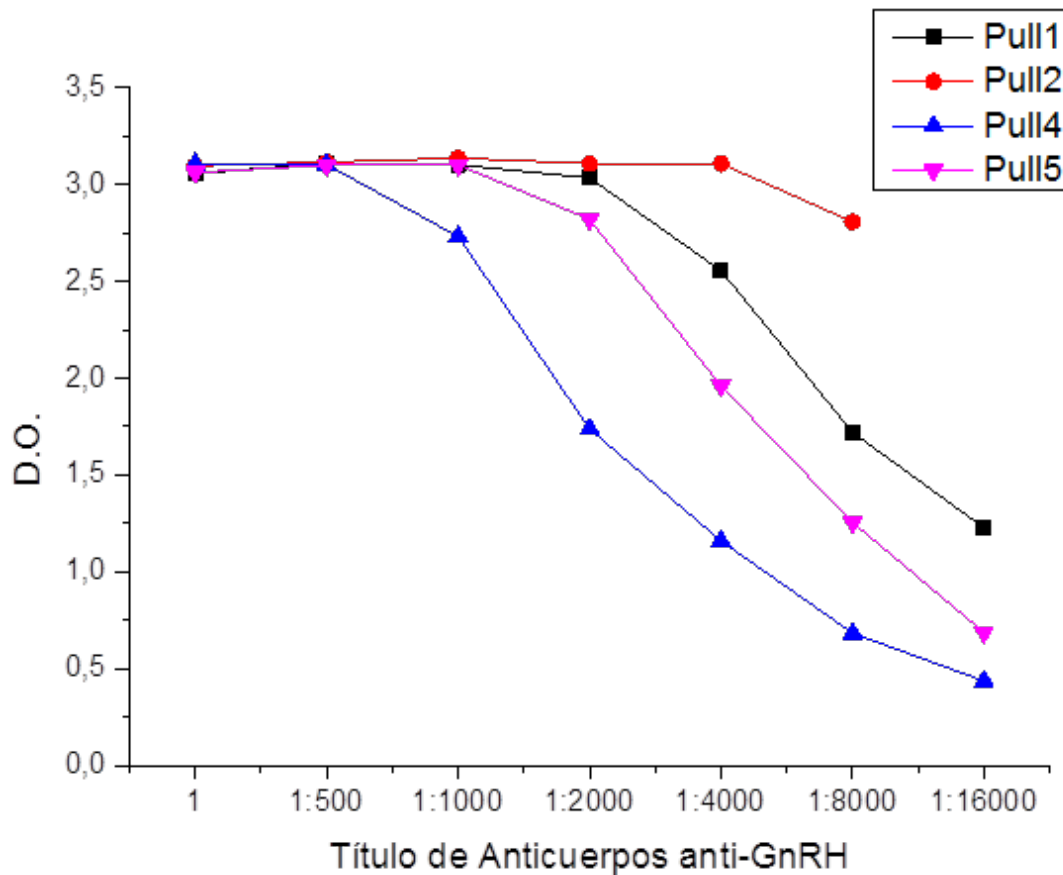



Figura 3. Curva de Respuesta de diferentes pules de anticuerpos anti-GnRH

Tras los resultados obtenidos, se eligió la dilución 1:4.000 para todas las muestras.

2. Determinación de la Concentración Sérica de LH de Conejo

2.1. Fundamento de la Técnica ELISA de Competición

La técnica ELISA de competición se basa en la reacción entre un anticuerpo específico, generalmente policlonal, fijado a una fase sólida y una muestra problema o estándar (sin marcar) y el conjugado (hormona marcada con una enzima). Se produce una reacción de competición entre la hormona marcada y sin marcar por los lugares de unión al anticuerpo. A continuación, se mide la fracción de la hormona marcada unida al anticuerpo, mediante la reacción del sustrato-cromógeno con la enzima, lo cual se traduce en la oxidación del cromógeno produciéndose una reacción coloreada cuya

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">MATERIAL Y MÉTODOS</p> | |

intensidad será inversamente proporcional a la cantidad de hormona sin marcar de la muestra (problema o estándar).

2.2. Pasos previos para el desarrollo de la técnica

1.- Purificación de anticuerpos policlonales frente a LH


El anticuerpo específico de LH de conejo (anti-RbLH, AFP-3120489), fue proporcionado por el NIDDK's National Hormone and Pituitary Program y el prof. A.F. Parlow (National Hormone and Pituitary Program, Harbor- Ucla Medical Center, Torrance CA, USA). El anti-RbLH está producido en cobaya y no presenta reactividad cruzada significativa frente a FSH, TSH, GH y Prolactina de conejo según información del Dr. Parlow.

Para evitar posibles interferencias con componentes del suero de cobaya, una vez reconstituido se procedió a su purificación mediante cromatografía con un sistema de purificación Melon gel IgG (Melon™ Gel IgG Purification Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Éste método ha resultado ser muy eficaz, sencillo y rápido con resultados de recuperación del 90% sin necesidad de precipitación con sulfato de amonio ni proceder a diálisis. La purificación se efectuó siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.- Biotinación de LH de conejo

La LH de conejo (RbLH, AFP7818C) proporcionada igualmente por A.F. Parlow (NHPP, USA), está obtenida de extractos de hipófisis de conejo y altamente purificada teniendo el "grado de iodización". Este antígeno se utilizó como estándar específico y para la preparación del conjugado marcado con biotina necesario para la reacción de competición.

La biotina es una pequeña molécula que posee una elevada afinidad por la avidina o proteínas semejantes a ella. Debido a su pequeño tamaño, puede conjugarse a las proteínas sin alterar su actividad biológica. El reactivo utilizado es el sulfo-NHS-biotin (EZ-Link™ Micro Sulfo-NHS-LC-Biotinylation. Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), que reaccionará con los grupos amino primarios de las proteínas

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">MATERIAL Y MÉTODOS</p> | |

formando uniones amidas estables. La LH tiene suficientes grupos amino primarios para poder ser “marcada” con biotina e incrementar los sitios de unión a la avidina o a la

estreptavidina lo que incrementa la señal y permite el desarrollo de un EIA más sensible. El exceso de biotina fue eliminado utilizando columnas de intercambio de tampón. Todo el proceso de biotinación se realizó según indicó el fabricante.

2.3. Trazado de la curva estándar: rango de concentración de la curva.

Se trazó una curva estándar o patrón para la hormona LH específica de conejo, con concentraciones conocidas que fueron desde 400 ng/mL hasta 0,782 ng/mL. Las concentraciones estándar se disolvieron en buffer EIA compuesto por una solución tampón fosfato salino (PBS) con 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA), pH 7,4 (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). Seguidamente se añadió la dilución elegida de conjugado y con ellas se realizó la técnica EIA. Finalmente, se midió la densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro para placas ELISA (Stat Fat® 3200. Awareness Technology Inc, USA) a 450-600 nm. Se ensayaron diversas curvas con el fin de poder determinar tanto las concentraciones basales de la hormona como las concentraciones más elevadas cuando se produce el “pico” preovulatorio de la LH.

2.4. Desarrollo de la Técnica ELISA de Competición

Para incrementar la especificidad de esta técnica que determina una proteína específica de especie, utilizamos un anticuerpo anti especie anti-IgG de cobaya producida en cabra (Goat anti guinea pig IgG, Southern Biotech. Birmingham, AL, USA) como anticuerpo secundario que se adhirió a la placa de poliestireno de 96 pocillos de alta absorción (Ninety-six-well EIA high-binding. Corning Inc, Corning NY USA).

1.- Inmovilización del anticuerpo anti-especie, a la fase sólida (placa) a una dilución 1/200 en tampón carbonato bicarbonato 0,2 M pH 9,6 (Coating buffer) (BupH™ Carbonate-Bicarbonate Buffer Packs. Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), añadiendo 100µL en todos los pocillos durante 8 horas a 4°C.

2.- Etapa de bloqueo. Se añaden 300 μ L de tampón PBS con un 1% de BSA pH 7,4 (Blocking buffer) durante 2 horas a temperatura ambiente.

3.- Adición del 100 μ L a todos los pocillos, excepto a los que actúen de blanco, de anticuerpo anti-RbLH a una dilución 1/200.000 en buffer EIA, durante 8 h a 4°C.

4.- Adición de muestras, estándares y conjugado, fase de competición entre la hormona marcada y sin marcar por los sitios de unión del anticuerpo anti LH de conejo durante 3 horas a temperatura ambiente. Para ello se añadió la misma cantidad de muestra y estándares que de una dilución 1/20.000 de LH de conejo marcada con biotina (LH-B) en buffer EIA. Tras la mezcla de la hormona marcada y sin marcar, se añadieron 100 μ L en los diferentes pocillos. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

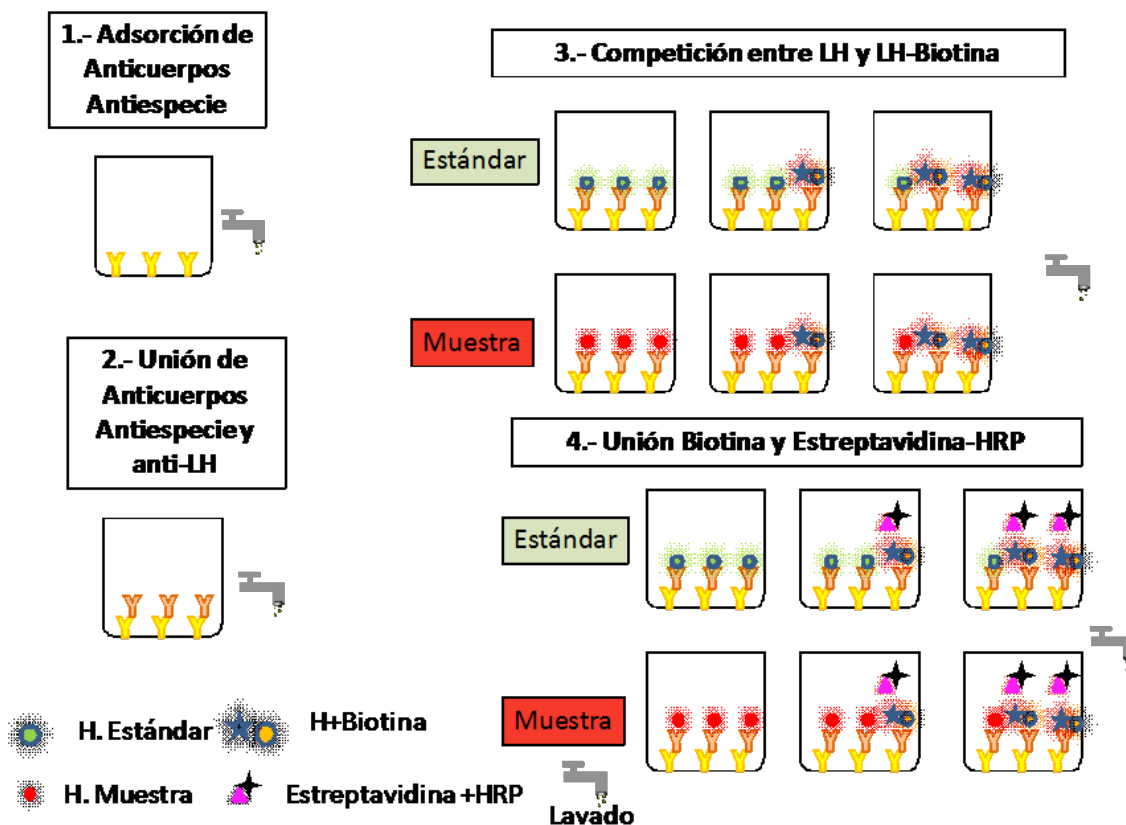


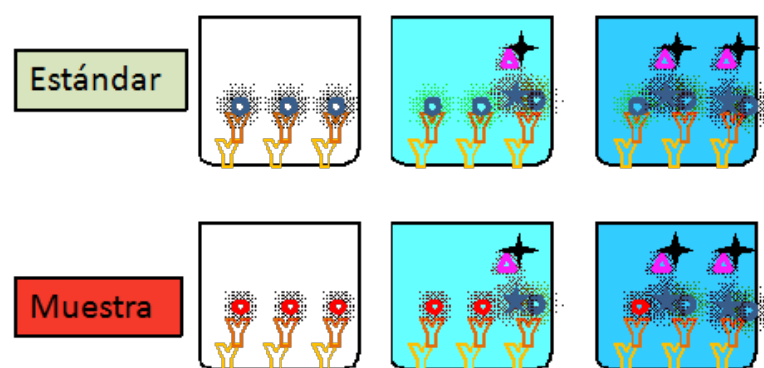
Imagen 28: Esquema Elisa de competición

5.- Adición de 100 μL de estreptavidina-HRP (Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii*. Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) a toda la placa durante 40 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

6.- Adición de 100 μL a todos los pocillos del sustrato y cromógeno TMB. La reacción se produce en 5 a 10 minutos comprobando el adecuado desarrollo del color.

7.- Frenado de la reacción enzimática utilizando ácido sulfúrico al 10% añadiendo 100 μL a cada pocillo.

5.- Hidrólisis Enzimática y Oxidación del Cromógeno



6.- Frenado de la Reacción con a. Sulfúrico

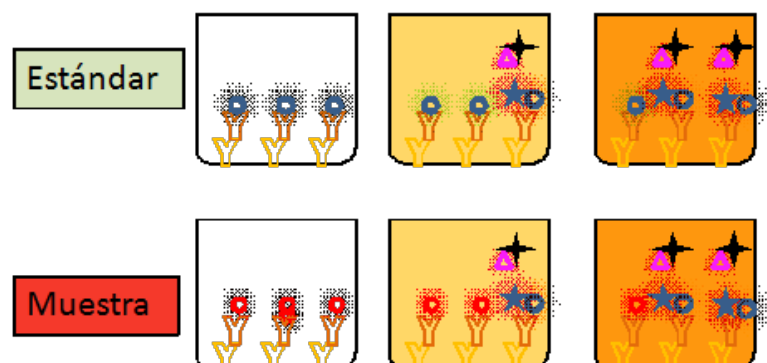


Imagen 29. Últimas fases Elisa de competición.



8.- Lectura de las placas en un espectrofotómetro a una longitud de onda bicromática de 450-630 nm que realiza una lectura eliminando el color producido por una posible reacción inespecífica de fondo.

Entre todas las etapas, excepto entre la 6 y 7, se realizó un lavado de la placa utilizando una solución de lavado preparada como una solución concentrada 10X. Para 1.000 ml de solución se necesitan 87,66 g de NaCl 1,5 M y 5 ml de Tween-20 (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) al 0,5%. Para ello se utilizó y un lavador automático de placas (LT 3500, Labtech) que administra, aspira y seca la solución de lavado eliminando así el exceso de reactivos no adheridos al pocillo. Las placas, en todos los procesos de incubación, se sellaron con films de acetato adherentes (Sarstedt, Barcelona, España).

2.5. Procesado de los resultados

El procesado de los resultados obtenidos del análisis hormonal, se realizó con la ayuda de software específico MasterPlex ReaderFit 2010 (Hitachi Solutions America, CA, USA) que calcula las concentraciones de las muestras problema tomando como referencia las curvas estándar utilizando algoritmos que producen el mejor ajuste de la curva como es la fórmula de 4 ó 5 parámetros logísticos en una regresión no lineal.

El rango de la curva estándar de LH se encontró entre 0,0 y 20,0 ng/pocillo. El límite de detección fue de 39,06 pg/pocillo. Los coeficientes de variación (CV) intra- e inter- ensayo fueron de 6,01% y 6,84% respectivamente.

Todas estas pruebas de validación se realizaron siguiendo las recomendaciones de la Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF) Segunda parte: Validación (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997).

El desarrollo, la puesta a punto y validación de la técnica ELISA para la determinación de LH específica de conejo se realizó gracias al proyecto de investigación CCG10-UCM/SAL-5601. Los resultados fueron publicados por (Rebollar *et al.*, 2012) y (Dall'Aglio *et al.*, 2013).



3. Determinación de la Concentración Sérica de Progesterona, Testosterona y Estradiol

3.1. Fundamento de la técnica

Es un ensayo en fase sólida de inmunoabsorción unido a enzimas (Elisa), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula estradiol, progesterona o testosterona. En las muestras de los pacientes la hormona compite con un conjugado hormona-peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de hormona en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de la hormona en la muestra del paciente.

3.2. Tratamiento de las muestras

Todas estas hormonas son esteroides. Para su determinación, en primer lugar, fue necesario extraer el esteroide de los diferentes componentes de constituyen el suero. Para ello se diluyeron 100 μ L de suero en 500 μ l de éter de petróleo en caso de la progesterona y de dietil éter en caso del estradiol y testosterona. La mezcla se agitó durante 2 min y se congelaron rápidamente en un baño de metanol con nieve carbónica. Una vez congelado el sedimento, el sobrenadante, donde están disueltos los esteroides, se separa y evapora utilizando una campana de extracción (BIOAIR® Euro Lone Model protea S) el tiempo necesario.

Posteriormente el extracto se resuspende con 100 μ l de buffer EIA, para su posterior análisis.

Utilizamos kits comerciales (Testosterone Demeditec Diagnostics GmbH, Germany, Progesterone Demeditec Diagnostics GmbH, Germany y Estradiol sensitive



Demeditec Diagnostics GmbH, Germany) para la determinación cuantitativa de cada hormona en suero, los cuales, se basan en la técnica ELISA de Competición, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3. Desarrollo de la Técnica ELISA de Competición

Comprende las siguientes etapas:

La placa de poliestireno, de 96 pocillos estaba recubierta con los diferentes anticuerpos anti-hormona. Seguidamente se añadieron 25 μ L (progesterona y testosterona) de las muestras y estándares y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente, inmediatamente se añadieron 200 μ L de conjugado. Se dejó incubar 60 min. En el caso de la determinación de estradiol, se añadieron 100 μ L y se dejó incubar 4 horas. A continuación, en todos los casos se lavó tres veces la placa con solución de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo que no se había fijado a la placa, utilizando un lavador automático de placas.

1.- Reacción de competición

La reacción se produce entre la hormona sin marcar de la muestra y estándar y la hormona conjugada con la enzima.

Las muestras estándar y problema se determinaron por duplicado, distribuyéndose a lo largo de la placa. La placa se selló y se dejó incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavó para separar las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos absorbidos en la fase sólida.

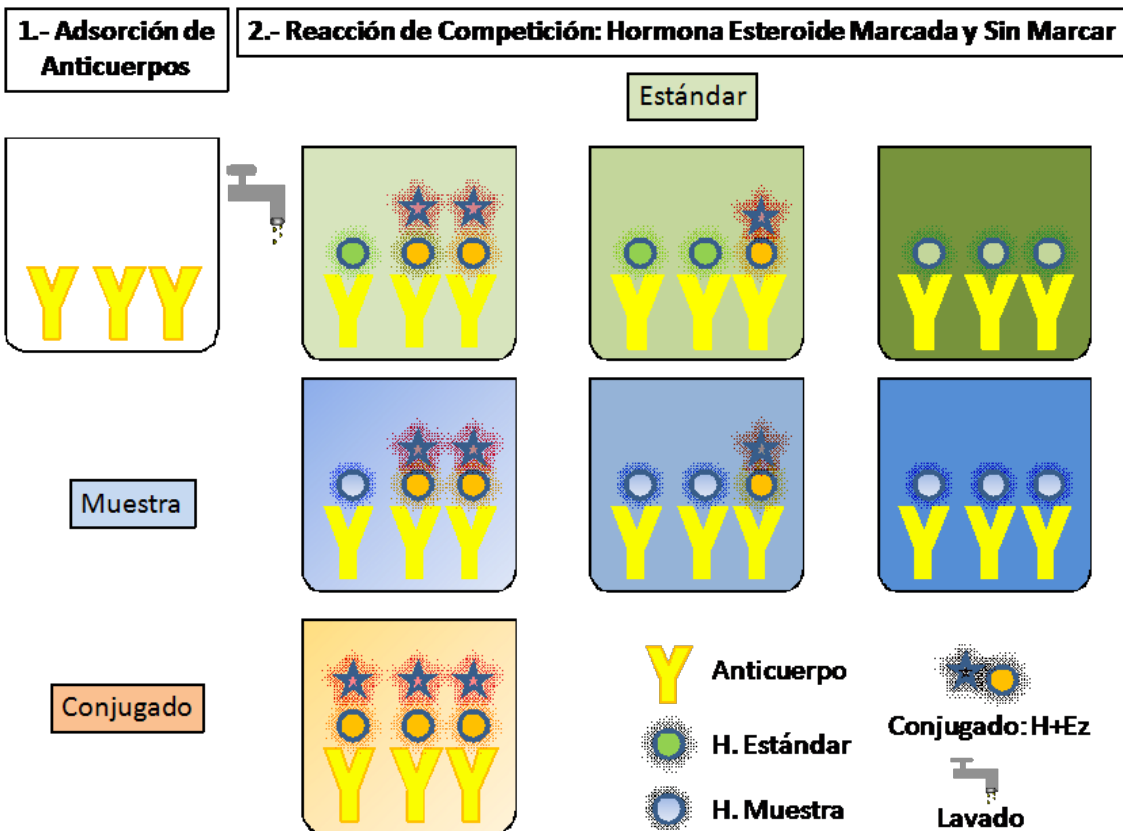


Imagen 30: Elisa de competición de hormona esteroide

2.- Adición del sustrato y del cromógeno


En todos los pocillos de la placa se añadieron 200 μ l de TMB. Se selló y se incubó veinte minutos a temperatura ambiente. En el caso del estradiol se incubó durante 30 min.

3.- Frenado de las placas

Tras el tiempo necesario para que se desarrolle el color del cromógeno, se produjo el frenado de la reacción añadiendo 100 μ L de solución de frenado a cada pocillo.

4.- Lectura de las placas

Una vez frenada la reacción del sustrato, se procedió a la lectura de la densidad óptica del color desarrollado. Para ello empleamos un lector automático de placas

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">MATERIAL Y MÉTODOS</p> | |

ELISA, el cuál mediante filtros de 450 y 600 nm, realizó una lectura bicromática eliminando el color producido por una posible reacción inespecífica de fondo.

5.- Procesado de los Resultados

El procesado de los resultados obtenidos del análisis hormonal, se realizó con la ayuda de un software específico MasterPlex ReaderFit 2010, que calcula las concentraciones de las muestras problema tomando como referencia las curvas estándar utilizando algoritmos que producen el mejor ajuste de la curva como es la fórmula de 4 ó 5 parámetros logísticos en una regresión no lineal.

IV.- Análisis Macro y Microscópico de los Tejidos

Tras realizar el sacrificio de los animales en la semana 26 se procedió a las extracción de los testículos y ovarios, los cuales se pesaron y midieron. Además, también se realizaron cortes histológicos para la mediación de los diámetros de los folículos ováricos y de los túbulos seminíferos.

Para la preparación de los cortes histológicos, en primer lugar, se introdujo la muestra en un frasco con formol al 10%, durante 24horas. En la muestra se realizaron pequeños cortes para facilitar la penetración del fijador.

Una vez fijada se introdujo cada muestra en los distintos cassetes que se van pasando por distintos alcoholes etílicos 50°-70°-80°-96°.

El siguiente paso fue cortar con el micrótopo (LEICA RM2255) el bloque obtenido en secciones de 3-4 micras. Se introdujeron en un baño con agua limpia a 38°-40° para que los cortes se estirasen y quedasen en un mismo plano. Posteriormente se seleccionó el mejor de ellos y se montó sobre un portaobjetos. Se introdujo en una estufa para su secado y se empezó a teñir.

La tinción comenzó pasando la muestra por una batería de 5-6 pasos de xileno, para la deshidratación de la misma, pasando por alcoholes etílicos de 100°, 96° y 70° hasta el agua corriente.



El primer colorante empleado fue la hematoxilina, se lavó en agua corriente y se pasó a la eosina (1%), se volvió a lavar hasta quitar restos de eosina y se procedió a deshidratar con una escala de alcoholes ascendentes de 96° - 100°. Se aclaró con xileno y se montó el porta con un cubreobjetos para mantener el corte deshidratado.

El estudio de los cortes histológicos se realizó mediante microscopía óptica a 40x (Olympus BX-40) y con la ayuda de un analizador de imágenes diseñado para este fin (AnalySIS Auto, versión 3,2 C4040Z, Soft Imaging System GmbH, Germany) en el laboratorio del Departamento de Producción Animal de la UPM.

En los cortes histológicos se midieron los diámetros de los folículos ováricos y se contaron y en el caso de los testículos solamente medimos los diámetros de los túbulos seminíferos mediante el programa informático (Image J). La clasificación de los folículos ováricos en los diferentes estadios se realizó con la referencia de (Hutt et al., 2006).

V.- Análisis estadístico

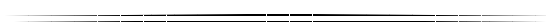
Para analizar estadísticamente los resultados se utilizó el software SAS (SAS Institute Inc., 2001). Para estudiar el efecto de los tratamientos sobre la titulación de anticuerpos y sobre la evolución del peso del animal, así como de las concentraciones hormonales de LH, testosterona, progesterona y estradiol se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas (Procedimiento MIXED) con el tratamiento y el tiempo transcurrido entre tomas como efectos principales.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las características morfológicas peso y dimensiones de las gónadas, nº de cuerpos lúteos, nº de folículos hemorrágicos en la superficie del ovario, número y tamaño de los folículos así como el tamaño de los túbulos seminíferos en las preparaciones histológicas) se realizó un análisis de varianza de una sola vía (procedimiento GLM) considerando el tratamiento de inmunización como efecto principal.



Todas las tablas y figuras muestran las medias corregidas por mínimos cuadrados \pm el error estándar. Para comparar las medias de los diferentes parámetros se utilizó el test t de Student y se consideró que existían diferencias significativas entre ellas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS





I. Experimento 1: Efecto de la administración de un Inmunógeno anti-GnRH en conejos machos prepúberes.

1. Efectos del inmunógeno: Estudio de la Titulación de Anticuerpos.

En la figura 2, se muestra la evolución de los títulos de anticuerpos determinados en los animales tratados antes y después de las dos inyecciones del inmunógeno a lo largo del periodo experimental.

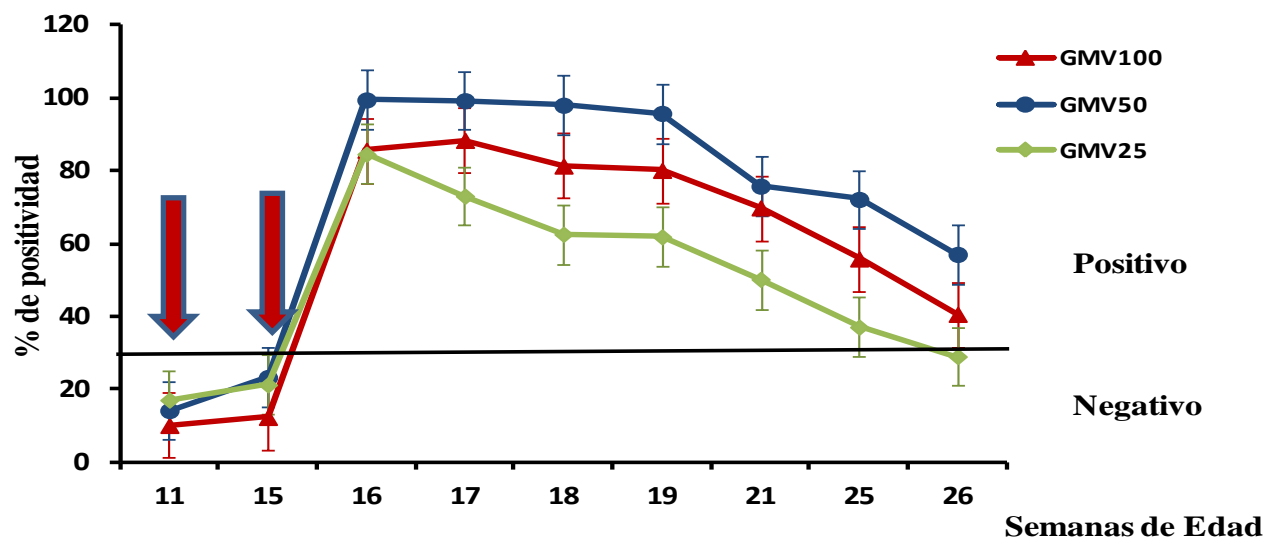


Figura 4. Evolución de los porcentajes de positividad de anticuerpos producidos por conejos inmunizados con 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25(GMV25) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH entre las 11 y 26 semanas de edad. (a,b) $p < 0,05$. (n=6). Dilución 1/4.000.

El porcentaje de positividad se consideró a partir del 29%, tras normalizar los resultados y considerando los de las semanas 11 y 15 como negativos. El umbral se realizó calculando la media de los resultados $\pm 3\text{DS}$.

En la figura se observa que el valor máximo en los tres grupos de animales inmunizados se produjo a partir de las 16 semanas de vida, tras la administración de la segunda dosis de vacuna. A partir de este punto la tasa de positividad fue disminuyendo significativamente a lo largo del tiempo y de la misma manera en los 3 grupos

experimentales, ya que no se observaron diferencias estadísticas entre ellos ($p > 0,05$). Cabe destacar que al final del experimento en el grupo con la dosis más baja de inmunógeno el título de anticuerpos decayó hasta umbrales negativos.

2. Efectos de la Vacuna sobre las Hormonas de la Reproducción en Machos: LH y Testosterona.

2.1.- Concentraciones de LH Sérica

En la figura 3, se muestra la evolución de las concentraciones de LH sérica en los 4 grupos experimentales.

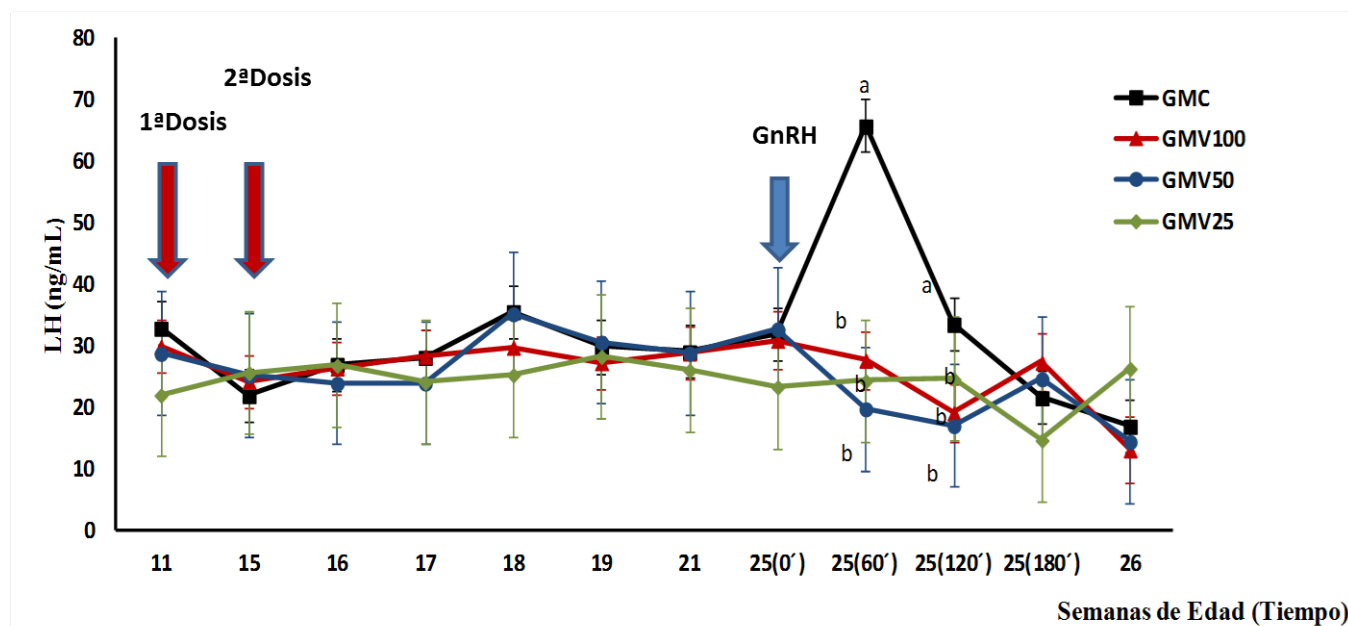


Figura 5. Evolución de las concentraciones de LH séricas (ng/mL) de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25(GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH entre las 11 y 26 semanas de edad e inducidos en la semana 25 con 20 μg de gonadorelina. (a,b) $p < 0,05$. (n=6).(media \pm esm).

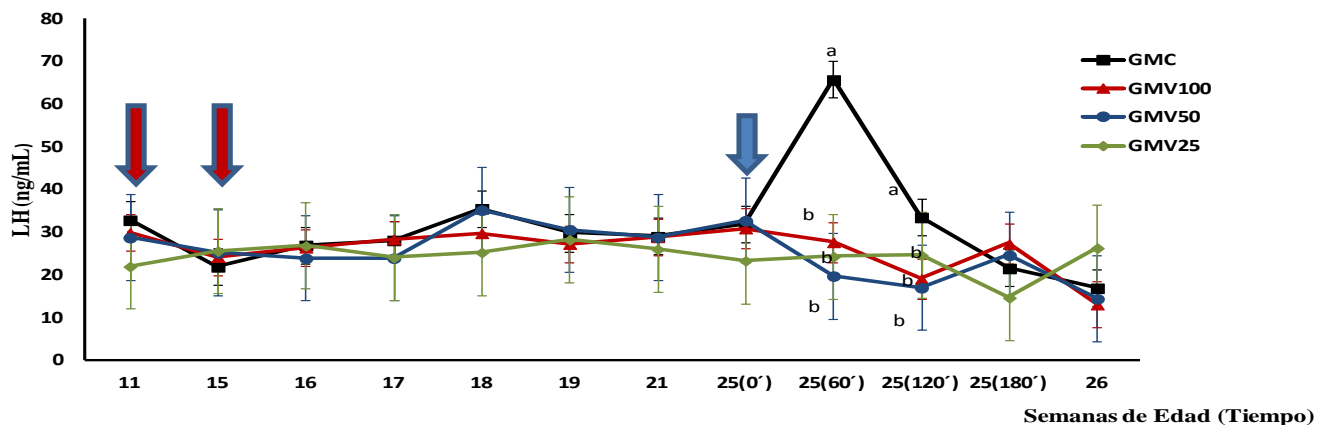


Figura 6. Evolución de las concentraciones de LH séricas (ng/mL) de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25(GMV25) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH entre las 11 y 26 semanas de edad e inducidos en la semana 25 con 20 μg de gonadorelina. (a,b) $p < 0,05$. (n=6).(media \pm esm).

Prácticamente todos los valores de LH observados desde la semana 11 hasta la semana 25 antes de la estimulación con GnRH fueron basales. Sin embargo, una vez aplicada dicha estimulación, los niveles de LH en el grupo no inmunizado ascendieron significativamente a los 60 min ($65,75 \pm 4,3\text{ng}/\text{mL}$) y a los 120 min ($33,56 \pm 4,3\text{ng}/\text{mL}$) con respecto a los otros tres grupos inmunizados, que no mostraron incremento alguno y siguieron presentando valores basales.

2.2.-Concentraciones de Testosterona Sérica

En la figura 4, se refleja el efecto de la vacuna sobre la testosterona en el periodo de la estimulación con un análogo de GnRH a la edad de 25 semanas en los conejos inmunizados y controles.

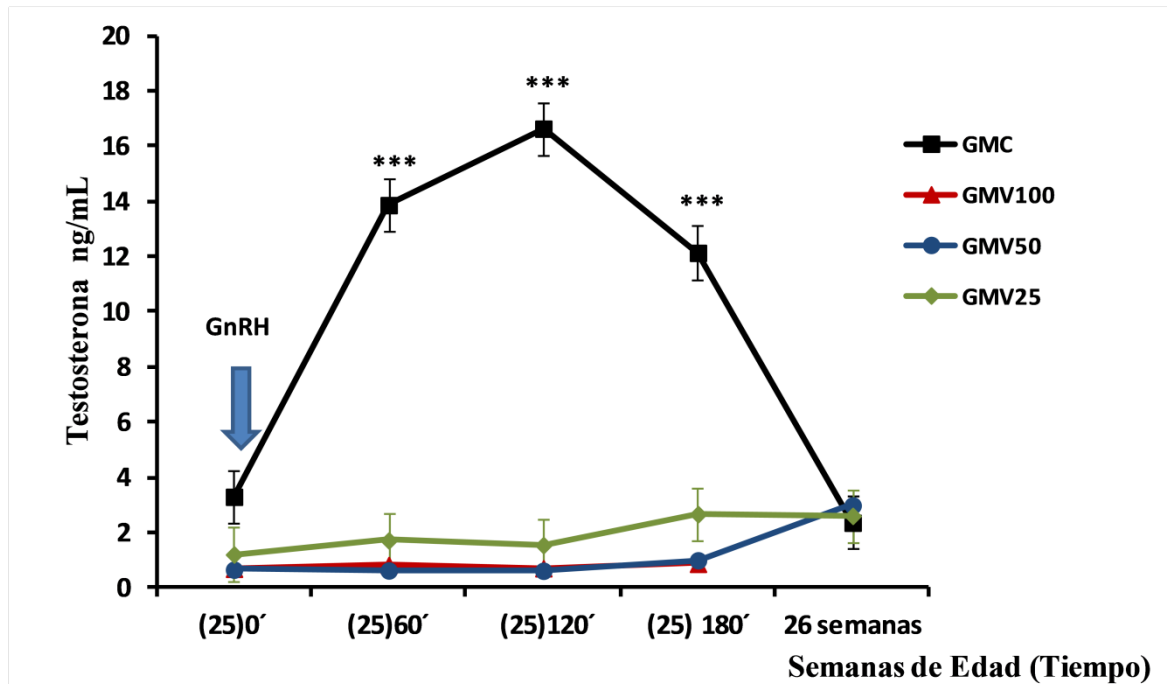



Figura 7. Evolución de las concentraciones de testosterona sérica (ng/mL) de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) μ g/mL de inmunógeno anti-GnRH y estimulados en la semana 25 de edad con 20 μ g de gonadorelina. *** $p < 0,001$. (n=6). (media \pm esm).

El valor más elevado de testosterona se observó en el grupo GMC a los 60 min tras la estimulación con GnRH, disminuyendo a los 180 min hasta valores basales a la semana siguiente. Los grupos inmunizados no responden al tratamiento administrado con gonadorelina.

| | |
|---|--|
| Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción |  |
| RESULTADOS | |

3. Efectos morfológicos

3.1.- Peso Corporal


En la siguiente tabla se muestra el seguimiento que se realizó del peso de los animales a lo largo del periodo experimental. No hubo efecto del tratamiento sobre este parámetro ($p=0,0677$), por lo que en la tabla se muestra cómo aumentó el peso con la edad dentro de cada grupo.

| | GMC | GMV100 | GMV50 | GMV25 |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Nº de conejos | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Edad (semanas) | | | | |
| 11 | 2,9 ± 0,08 ^a | 2,9 ± 0,08 ^a | 2,5 ± 0,08 ^a | 2,6 ± 0,08 ^a |
| 15 | 3,5 ± 0,08 ^b | 3,4 ± 0,08 ^b | 3,2 ± 0,08 ^b | 3,3 ± 0,08 ^b |
| 16 | 3,6 ± 0,08 ^b | 3,6 ± 0,08 ^c | 3,5 ± 0,08 ^c | 3,5 ± 0,08 ^c |
| 19 | 3,8 ± 0,08 ^c | 3,8 ± 0,08 ^d | 3,7 ± 0,08 ^d | 3,7 ± 0,08 ^d |
| 21 | 3,9 ± 0,08 ^c | 3,9 ± 0,08 ^d | 3,8 ± 0,08 ^d | 3,8 ± 0,08 ^d |
| 25 | 4,2 ± 0,08 ^d | 4,2 ± 0,08 ^e | 4,1 ± 0,08 ^e | 4,0 ± 0,08 ^e |
| 26 | 4,2 ± 0,08 ^d | 4,2 ± 0,09 ^e | 4,1 ± 0,08 ^e | 4,0 ± 0,08 ^e |

Tabla 1: Evolución del peso (kg) de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH desde las 11 a las 26 semanas de edad. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la misma columna se consideran diferentes estadísticamente ($p<0,05$). (media \pm esm).

3.2.- Medidas Testiculares

En la siguiente tabla se muestra el peso y las dimensiones (largo y ancho) de las gónadas de los machos inmunizados y controles sacrificados a las 26 semanas de edad.

| | |
|---|--|
| Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción |  |
| RESULTADOS | |

| | GMC | GMV100 | GMV50 | GMV25 | P |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|
| Nº animales | 6 | 6 | 6 | 6 | |
| Testículo | | | | | |
| Izquierdo | | | | | |
| Peso (g) | 3,5±0,14 ^a | 0,4±0,14 ^b | 0,5±0,14 ^b | 0,8±0,14 ^b | 0,0001 |
| Peso rel. (%) ¹ | 0,08±0,005 ^a | 0,005±0,006 ^b | 0,01 ±0,005 ^b | 0,008±0,005 ^b | 0,0001 |
| Largo (mm) | 32,7±1,03 ^a | 20,8±1,03 ^b | 16,3±1,03 ^c | 16,8±1,03 ^c | 0,0001 |
| Ancho (mm) | 10,7±0,43 ^a | 5,8±0,43 ^b | 3,7±0,43 ^c | 3,8±0,43 ^c | 0,0001 |
| Testículo | | | | | |
| Derecho | | | | | |
| Peso (g) | 3,5±0,16 ^a | 0,4±0,16 ^b | 0,5±0,16 ^b | 0,8±0,16 ^b | 0,0001 |
| Peso rel. (%) | 0,08±0,004 ^a | 0,01±0,004 ^b | 0,004±0,004 ^b | 0,02±0,004 ^b | 0,0001 |
| Largo (mm) | 32,0±0,97 ^a | 21,5±0,97 ^b | 16,3±0,97 ^c | 17,7±0,97 ^c | 0,0001 |
| Ancho (mm) | 10,8±0,47 ^a | 5,2±0,47 ^b | 3,7±0,47 ^c | 3,3±0,47 ^c | 0,0001 |

Tabla 2. Peso (g) y dimensiones de los testículos de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) µg/mL de inmunógeno anti-GnRH a las 26 semanas de edad.

¹Peso relativo: cociente entre el peso del testículo y el peso del animal ×100. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la misma fila, se consideran diferentes estadísticamente entre sí (p<0,0001). (media ± esm).

La vacuna redujo el peso relativo de los testículos en los animales inmunizados frente a los controles de manera clara y estadísticamente significativa (p<0,0001). Los controles presentaron los testículos más largos y anchos y los inmunizados con las dosis de 25 y 50 µg/mL de inmunógeno anti-GnRH, los más cortos y finos. Los animales tratados con la dosis de 100 µg/mL de inmunógeno anti-GnRH presentaron dimensiones intermedias.



En la siguiente imagen se muestra el aspecto de los testículos de dos de los conejos experimentales a modo de ejemplo. A la izquierda de la imagen destaca el pequeño tamaño de las gónadas de un conejo inmunizado con la dosis de $100\mu\text{g/mL}$ del inmunógeno anti-GnRH comparado con el de las gónadas de un conejo control situadas a la derecha.

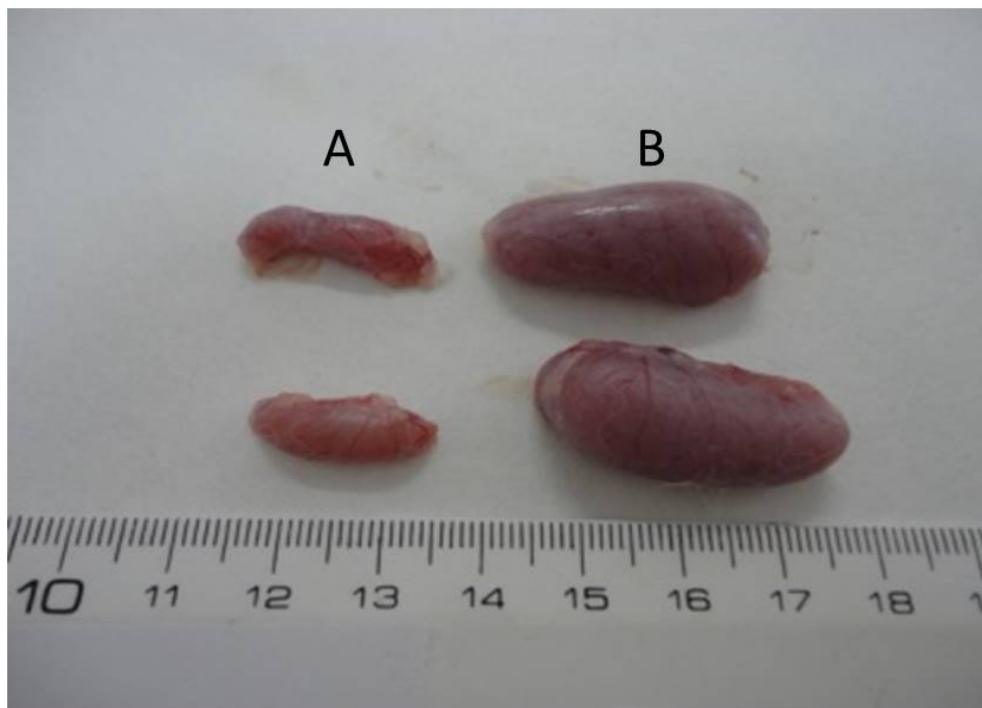



Imagen 31. Testículos de dos conejos de 26 semanas de edad:
A) inmunizado con $100\mu\text{g/mL}$ del inmunógeno anti-GnRH y B) control.

4. Estudio Histológico de los testículos

Los testículos de los machos del grupo control se caracterizaron por la presencia de túbulos seminíferos con amplias luces, con un diámetro tubular de $186 \pm 1,73 \mu\text{m}$. Los túbulos seminíferos estaban tapizados por células de Sertoli y un desarrollo completo de las células de la línea germinal: espermatogonias claras y oscuras,

| | |
|---|--|
| Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción |  |
| RESULTADOS | |

espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios, espermátidas redondas y alargadas y espermatozoides desprendidos en la luz del túbulo. El intersticio se caracterizó por la presencia de numerosas células de Leydig, de forma poligonal, con núcleos esféricos y excéntricos y de citoplasma eosinófilo, en estrecha relación con numerosos capilares y pequeños vasos sanguíneos.

Los testículos de los animales inmunizados con la dosis de 25 $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH, se caracterizaron por la presencia de túbulo seminíferos con un desarrollo desigual de las células de la línea germinal. Así, encontramos zonas del parénquima con túbulo seminíferos que presentaron un desarrollo completo junto a otras donde los túbulo carecían de luz y estaban rodeados por una gruesa membrana basal. Su pared aparecía tapizada por numerosas células de Sertoli y un número escaso de células de la línea germinal, principalmente espermatogonias, algún espermatoцитo primario y secundario y un número muy escaso de espermátidas.

Tal y como muestra la tabla 3, la media del diámetro tubular de los túbulo seminíferos de los conejos tratados fue significativamente menor a la del grupo control, sobre todo con la dosis de 50 $\mu\text{g/mL}$. No hemos encontrado diferencias en cuanto al desarrollo del intersticio.

| | GMC | GMV100 | GMV50 | GMV25 | P |
|--|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| Nº de conejos | 6 | 6 | 6 | 6 | |
| Diámetro túbulo seminíferos ($\mu\text{m}\pm\text{esm}$) | $186 \pm 1,73^a$ | $98,3 \pm 2,78^b$ | $69,9 \pm 3,01^c$ | $94,9 \pm 4,55^b$ | 0,0001 |

Tabla 3. Diámetro de los túbulo seminíferos de conejos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH y sacrificados a las 26 semanas de edad. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la fila se consideran diferentes estadísticamente ($p < 0,0001$).



Los testículos de los animales inmunizados con la dosis de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH, presentaron unas características histológicas similares. Los túbulos seminíferos se caracterizaron por que carecían de luz, estaban rodeados por una gruesa membrana basal, que en zonas aparecía ondulada, y su pared estaba tapizada por numerosas células de Sertoli y un número escaso de células de la línea germinal principalmente espermatogonias, espermaticitos primarios y un número muy escaso de espermátidas degeneradas. La media del diámetro tubular fue menor con respecto al grupo control. Cabe destacar que la dosis de 50 $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH fue la que dio lugar a los diámetros más pequeños encontrados. El intersticio se caracterizó por la presencia de un número escaso de células de Leydig de forma poligonal y numerosas células alargadas y fusiformes.

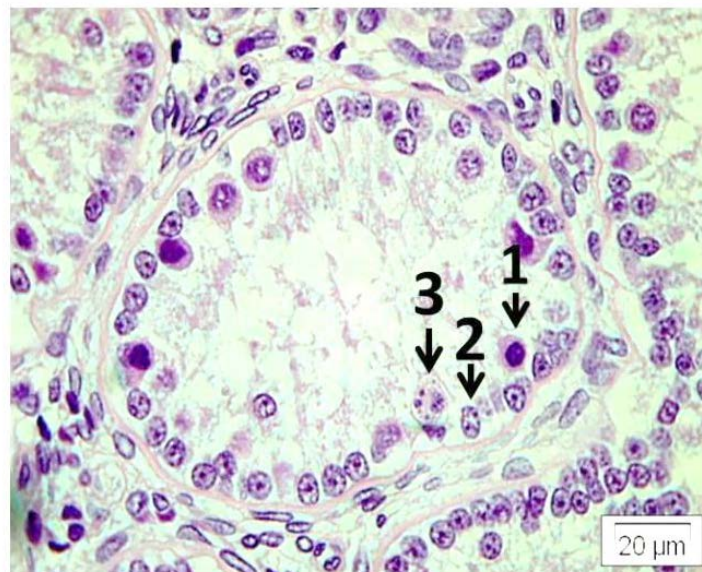


Imagen 32: Testículo de un conejo del grupo GMV50. Túbulo seminífero con células de Sertoli y escaso desarrollo de la línea germinal. H&E 1: Espermátida degenerada; 2: Célula de Sertoli; 3: Espermaticito 1°.

Tal y como muestra la siguiente tabla, del total de animales sacrificados en cada grupo, el 100% de los controles presentaron espermátidas en el interior de sus túbulos

seminíferos (Imagen XX) pero en ninguno de los conejos inmunizados con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH se pudo observar este grado de desarrollo de las células de la serie germinal. Con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH se observó que en la mitad de los animales se podían detectar espermátidas pero este número se redujo con la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH.

| | GMC | GMV100 | GMV50 | GMV25 | P |
|-------------------------------|------------------|----------------|---------------------|-----------------|--------|
| Nº de conejos | | | | | |
| Presencia de espermátidas (%) | 100 ^a | 0 ^c | 16.67 ^{bc} | 50 ^b | 0.0003 |

Tabla 4. Porcentaje de animales con presencia de espermátidas en la luz de los túbulos seminíferos de conejos machos inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH y sacrificados a las 26 semanas de edad. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la fila se consideran diferentes estadísticamente ($p < 0,0003$). (media \pm esm).

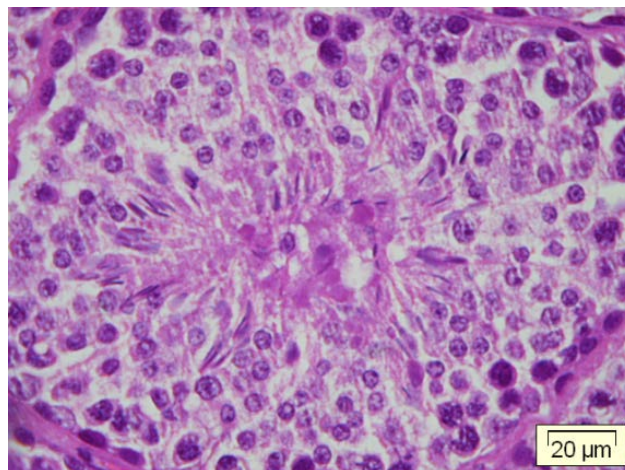


Imagen 33: Testículo de un conejo del grupo control. Túbulo seminífero con desarrollo completo de las células de la línea germinal. H&E.

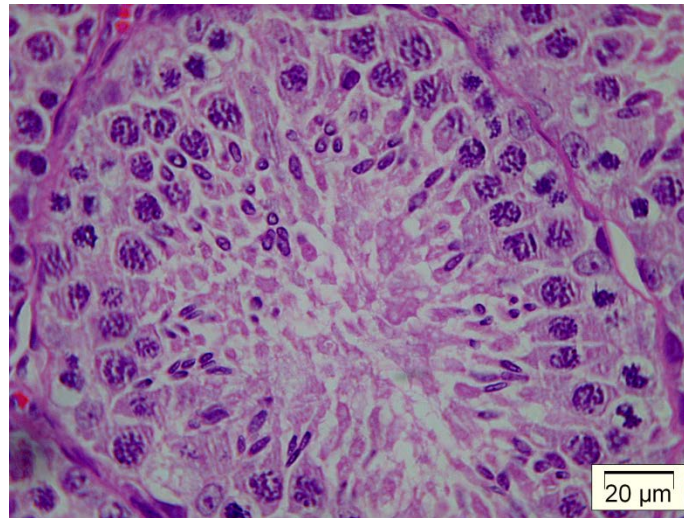


Imagen 34: Testículo de un conejo del grupo GMV50. Túbulo seminífero con células de Sertoli y alguna espermatogonia. H&E

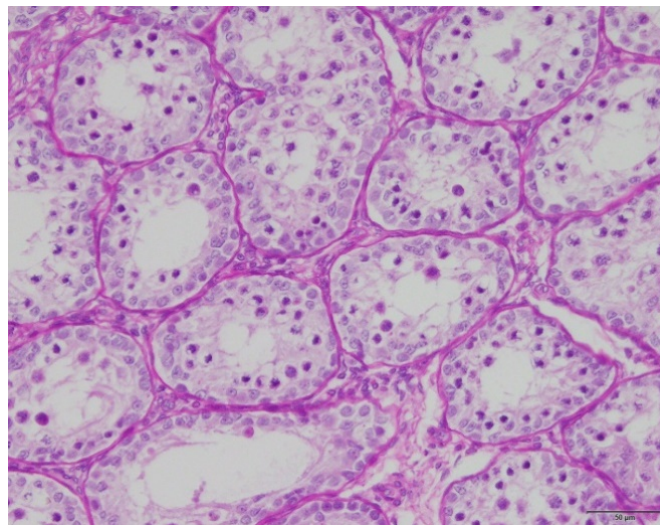


Imagen 35: Testículo de un conejo del grupo control. Túbulo seminífero con células de Sertoli y alguna espermatogonia, rodeados de una membrana basal normal. PAS X20

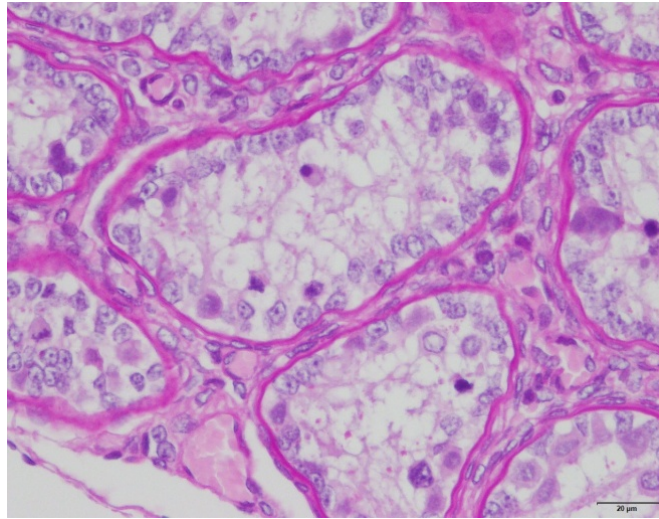


Imagen36: Testículo de un conejo del grupo GMV100. Túbulo seminífero con escaso desarrollo de las células de la línea germinal, rodeados de una gruesa membrana basal. PAS X20.



II. Experimento 2: Efecto de la administración de un Inmunógeno anti-GnRH en conejas hembras prepúberes.

1. Efectos del inmunógeno: Estudio de la Titulación de Anticuerpos

En la figura 5 se muestra la evolución de los títulos de anticuerpos determinados en los animales inmunizados antes y después de las dos inyecciones del inmunógeno a lo largo del periodo experimental.

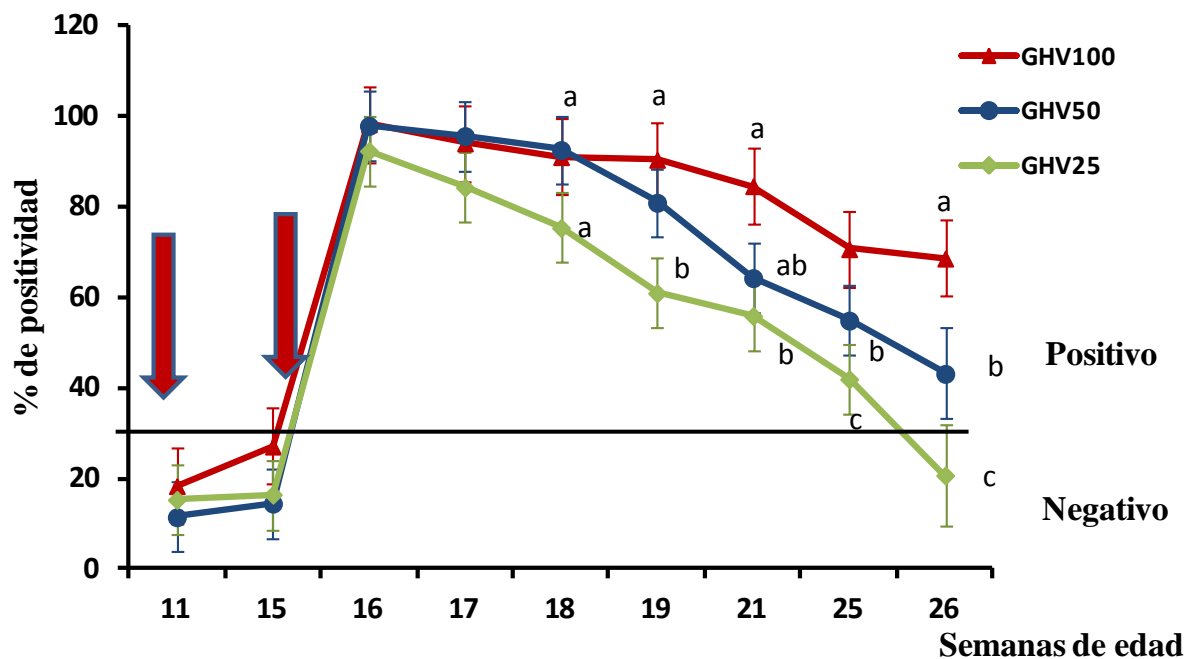


Figura 8: Evolución de los porcentajes de positividad de conejas inmunizadas con 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) de inmunógeno anti-GnRH $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre las 11 y 26 semanas de edad. Las letras indican diferencias entre grupos en cada momento. (a,b) $p < 0,05$. (n=6). Dilución 1/4.000.

Tras la administración de las 3 dosis de inmunógeno, la titulación de anticuerpos en todos los grupos ascendió a porcentajes muy próximos al 100% en la semana 16 del periodo experimental. Esta respuesta fue descendiendo en los 3 grupos de la misma manera hasta la semana 17 y 18. Posteriormente, los grupos GHV100 y GHV50

mantuvieron respuestas más altas que la del grupo GHV25, y sobre todo, destacó el grupo GHV100 que se mantuvo en porcentajes del 80% al final del experimento.

La respuesta más débil fue la observada en las conejas del grupo GHV25 desde la semana 18, mientras que las del grupo GHV50 presentaron respuestas inmunes intermedias.

2. Efectos de la Vacuna Sobre las Hormonas de la Reproducción en Hembras: LH, Progesterona y Estradiol.

2.1.- Concentraciones de LH Sérica

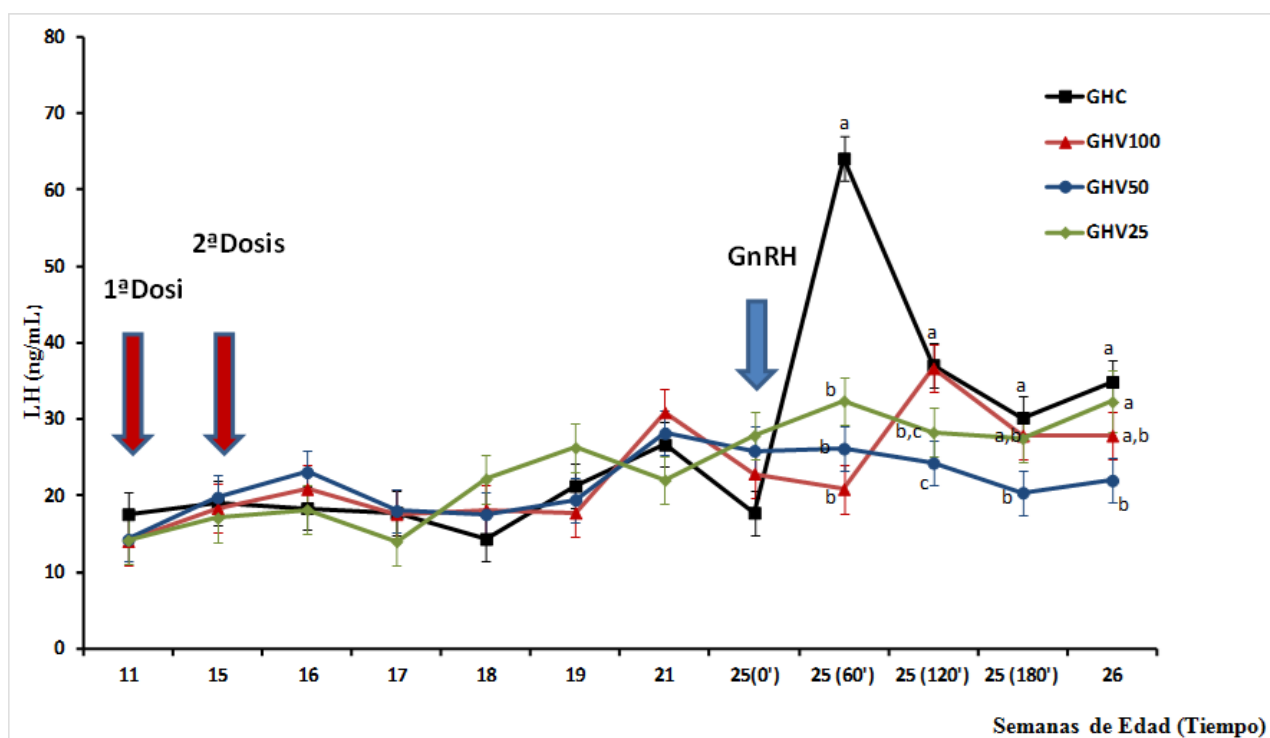


Figura 9. Evolución de las concentraciones de LH séricas (ng/mL) de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) µg/mL de inmunógeno anti-GnRH entre las 11 y 26 semanas de edad e inducidas en la semana 25 con 20 µg de gonadorelina. Las letras distintas indican diferencias entre grupos en cada momento (a,b,c,d) $p < 0,05$. (n=6).(media ± esm).

En la figura 6 se observa que tanto los grupos inmunizados como el control presentaron concentraciones de LH basales hasta las 25 semanas de edad antes de la estimulación con gonadorelina. A continuación, la gonadorelina provocó cambios significativos en el grupo control ($p < 0.0001$) en el que se observó un pico máximo de LH a los 60 min post estimulación con un valor de $64,06 \pm 2,88$ ng/mL y una disminución brusca típica del pico preovulatorio de LH a los 120 min. Ninguno de los grupos inmunizados respondió a la estimulación.

2.2.- Concentraciones de Progesterona sérica.

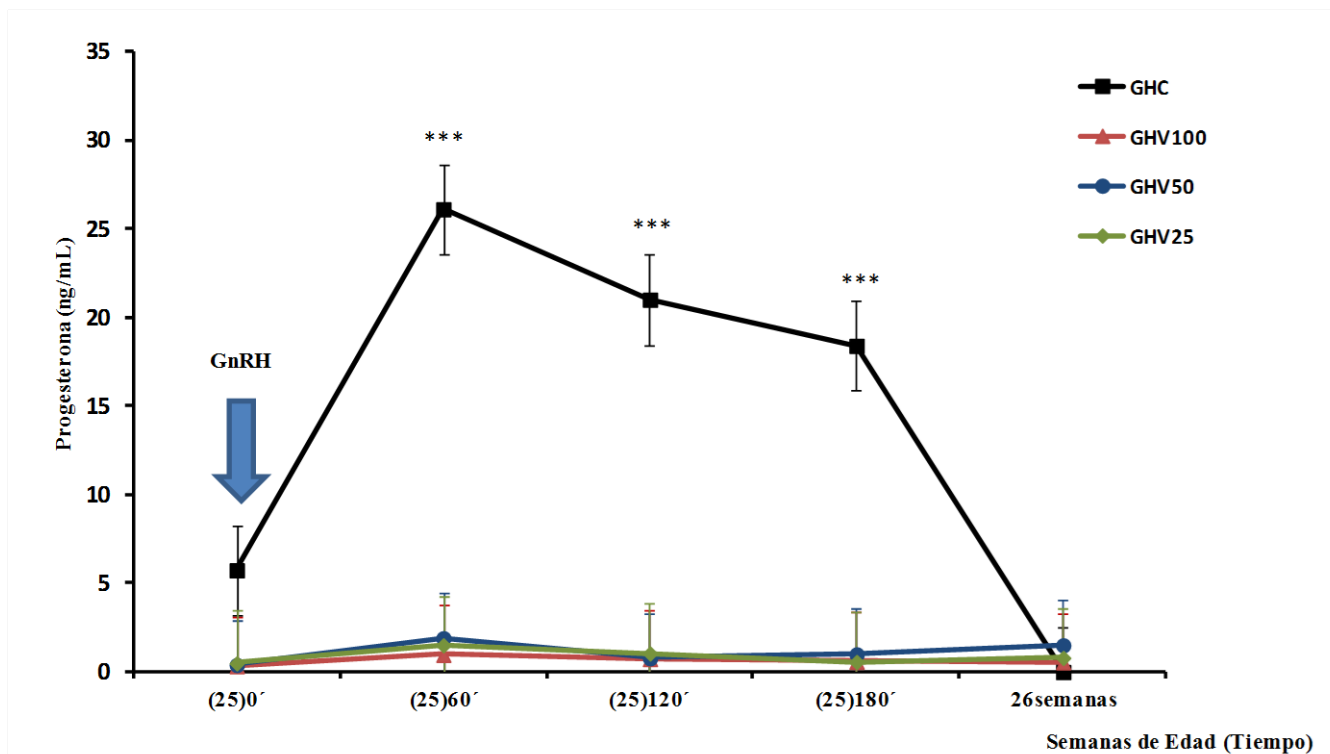


Figura 10. Evolución de las concentraciones de progesterona sérica (ng/mL) de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) µg/mL de inmunógeno anti-GnRH y estimulados en la semana 25 con 20 µg de gonadorelina. ***: $p < 0,001$. (n=6). (media \pm esm).

En la figura 7, se observan los cambios de las concentraciones de progesterona tras la administración de 0,02mg/mL de gonadorelina. Se observó el pico máximo de este esteroide en el grupo GHC a los 60 min post administración con un valor de $26,11 \pm 2,54$ ng/mL. Posteriormente disminuyó hasta llegar a la concentración mínima a los

180 min post administración, con un valor de $18,4 \pm 2,54$ ng/mL. Sin embargo, en los grupos inmunizados no se observaron cambios estadísticamente significativos en las concentraciones séricas de progesterona a lo largo de todo el periodo experimental. En la semana 26 los valores de los cuatro grupos fueron similares.

2.3.- Concentraciones de 17β estradiol sérica

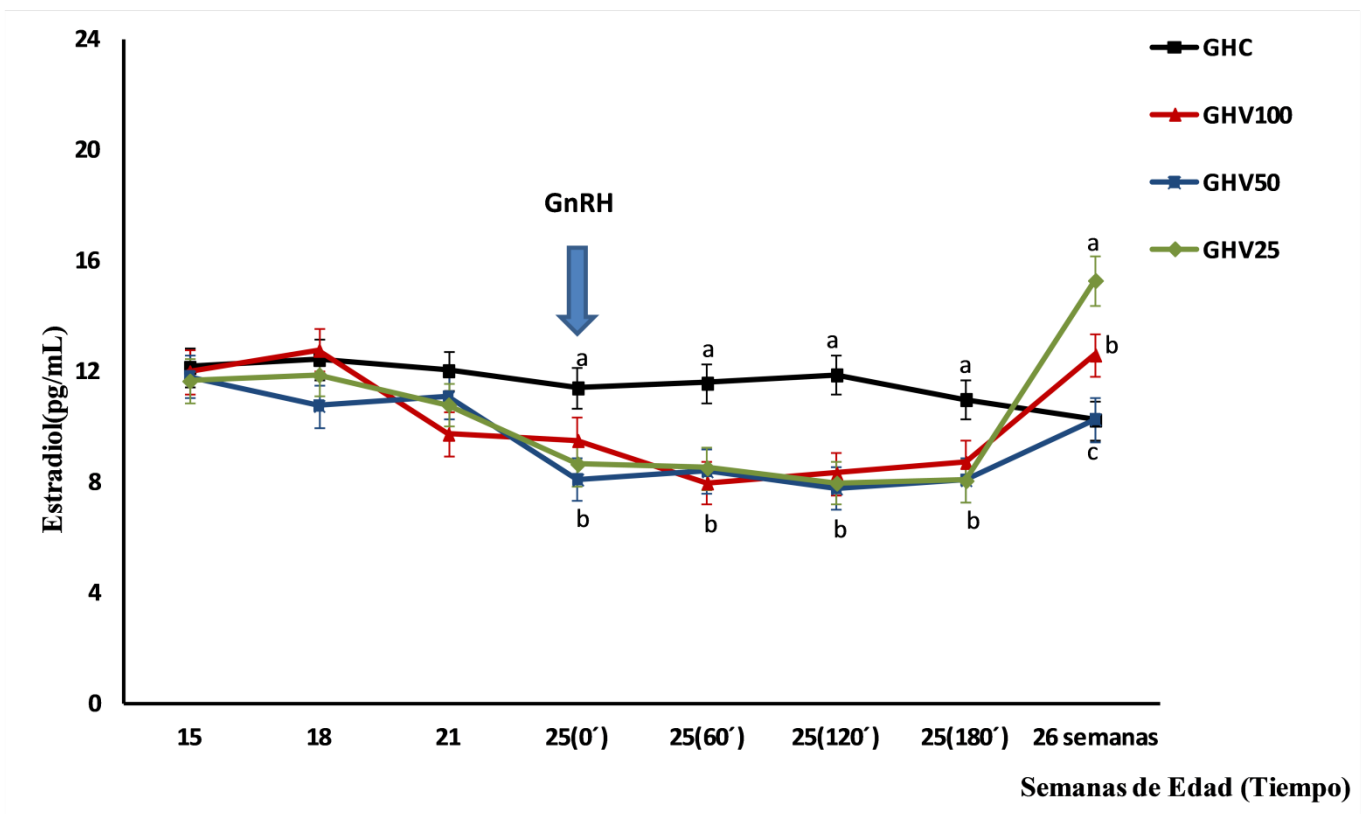



Figura 11. Evolución de las concentraciones de estradiol séricas (pg/mL) de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) de inmunógeno anti-GnRH entre las 15 y 26 semanas de edad e inducidas en la semana 25 con 20 µg de gonadorelina. (a,b,c) $p < 0,05$. (n=6).(media \pm esm).

En la figura 8 se presentan las concentraciones de 17β estradiol de las conejas durante todo el periodo experimental. Antes de la estimulación con la gonadorelina, en todos los grupos se observaron concentraciones similares y en torno a los 10-12 pg/mL. Más tarde, tras la estimulación, no se determinaron grandes variaciones en el grupo

| | |
|---|--|
| Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción |  |
| RESULTADOS | |

GHC, a diferencia de los grupos inmunizados, en los que se observó una disminución significativa desde el minuto 0 hasta el 180 de dicho periodo. En la semana 26, todos los animales inmunizados manifestaron un ligero aumento de las concentraciones de estradiol con respecto a la semana anterior, subiendo más en los tratados con 25 $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH, seguidos por los tratados con 100 y por último con 50, que se igualaron a los controles en ese punto.


3. Efectos Morfológicos

3.1.- Peso Corporal

Siguiendo el mismo protocolo que en los machos, se realizó un seguimiento continuo del peso de los animales que se muestra en la siguiente tabla. Al igual que en los machos, no hubo efecto del tratamiento sobre este parámetro ($p=0,1438$). Por tanto, en la tabla se muestra el efecto de la edad sobre el peso de los animales dentro de cada grupo experimental.

| Edad (semanas) | GHC | GHV100 | GHV50 | GHV25 |
|----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| Nº de conejas | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Edad (semanas) | | | | |
| 11 | 2,8 \pm 0,14a | 2,5 \pm 0,14a | 2,5 \pm 0,14a | 2,6 \pm 0,14a |
| 15 | 3,6 \pm 0,14b | 3,5 \pm 0,15b | 3,5 \pm 0,14b | 3,5 \pm 0,14b |
| 16 | 3,8 \pm 0,14b | 3,8 \pm 0,14bc | 3,5 \pm 0,14b | 3,9 \pm 0,14c |
| 19 | 4,3 \pm 0,15c | 3,9 \pm 0,14c | 3,6 \pm 0,14bc | 3,9 \pm 0,14c |
| 21 | 4,1 \pm 0,14c | 3,9 \pm 0,15c | 3,8 \pm 0,14c | 3,9 \pm 0,14c |
| 25 | 4,3 \pm 0,14c | 4,3 \pm 0,15d | 4,2 \pm 0,14d | 4,3 \pm 0,14d |
| 26 | 4,4 \pm 0,14c | 4,3 \pm 0,15d | 4,3 \pm 0,14d | 4,3 \pm 0,15d |

Tabla 5. Evolución del peso (kg) de conejas inmunizados con 0 (GMC), 100 (GMV100), 50 (GMV50) y 25 (GMV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH desde las 11 a las 26 semanas de edad. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la misma columna se consideran diferentes estadísticamente ($p<0,05$). (media \pm esm).

| | |
|---|--|
| Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción |  |
| RESULTADOS | |

Este parámetro fue aumentando significativamente con la edad ($p < 0,0001$) de manera similar y en todos los tratamientos ya que la interacción entre el tratamiento y el tiempo no resultó significativa ($p = 0,6938$).


3.2.- Medidas Ováricas

En la siguiente tabla se muestra el peso y las dimensiones (largo y ancho) de las gónadas de las hembras inmunizadas y controles sacrificadas a las 26 semanas de edad.

| | GHC | GHV100 | GHV50 | GHV25 | |
|-----------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------|
| Nº de animales | 6 | 6 | 6 | 6 | |
| Ovario | | | | | |
| Izquierdo | | | | | |
| Peso (g) | 0,4±0,03a | 0,09±0,03b | 0,1±0,03b | 0,01±0,03b | 0,0001 |
| Peso rel ¹ . (%) | 0,009±0,00a | 0,001± 0,00b | 0,002±0,00b | 0,001±0,00b | 0,0001 |
| Largo (mm) | 15,3±0,67a | 9,6±0,73b | 9,8 ±0,67b | 10,7±0,67b | 0,0001 |
| Ancho (mm) | 3,0±0,23a | 0,3±0,26b | 0,4±0,23b | 0,4±0,23b | 0,0001 |
| Derecho | | | | | |
| Peso (g) | 0,42±0,03a | 0,08±0,03b | 0,10±0,03b | 0,12±0,03b | 0,0001 |
| Peso rel. (%) | 0,009±0,00a | 0,001±0,00b | 0,002±0,00b | 0,001±0,00b | 0,0001 |
| Largo (mm) | 15.5±0,87a | 9,6±0,95b | 9,7±0,87b | 10,0±0,87b | 0,0001 |
| Ancho (mm) | 3,8±0,21a | 0,22±0,23b | 0,27±0,21b | 0,32±0,21b | 0,0001 |

Tabla 6. Peso (g) y dimensiones de los ovarios de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) $\mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH a las 26 semanas de edad.

¹Peso relativo: cociente entre el peso del ovario y el peso del animal $\times 100$. Las medias seguidas de letras distintas dentro de la misma fila, se consideran diferentes estadísticamente entre sí ($p < 0,0001$). (media \pm esm).

| | |
|--|--|
| Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción |  |
| RESULTADOS | |

En ambos ovarios se vieron reducciones significativas ($p=0,0001$) de las medidas ováricas en los grupos inmunizados con respecto al grupo GHC, no existiendo ninguna diferencia entre los grupos inmunizados entre sí.

4. Estudio Histológico de los ovarios


Tal y como muestra la siguiente tabla, también se contó el número de cuerpos lúteos y cuerpos hemorrágicos presentes en los cortes histológicos. Sólo se observaron cuerpos lúteos en los cortes de las conejas del grupo control. En las tratadas con el inmunógeno, no se detectó su presencia.

Con respecto a la existencia de cuerpos hemorrágicos, ésta fue bastante escasa y similar en todos los ovarios de las conejas inmunizadas o controles.

| | GHC | GHV100 | GHV50 | GHV25 | P |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------|
| Nº conejas | 6 | 5 | 4 | 3 | |
| CL | $1 \pm 0,15^a$ | $0 \pm 0,00^b$ | $0 \pm 0,00^b$ | $0 \pm 0,00^b$ | 0,0012 |
| CH | $0,2 \pm 0,15$ | $0,3 \pm 0,18$ | $0 \pm 0,21$ | $0 \pm 0,21$ | 0,7413 |

Tabla 7. Número de cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos en los cortes histológicos de ovarios de conejas inmunizadas y controles. CL: Cuerpos Lúteos; CH: Cuerpos Hemorrágicos.

Al igual que en los machos se extrajeron las gónadas y se realizaron cortes histológicos de las mismas, para el estudio del efecto de la vacuna sobre el diámetro de los folículos, como se muestra en la siguiente tabla. El diámetro de los folículos primordiales (FPDIAL) fue similar entre grupos, excepto en el tratado con la dosis de $50 \mu\text{g/mL}$ de inmunógeno anti-GnRH en el que se detectó un diámetro ligeramente superior. Al analizar los cortes histológicos de los distintos grupos experimentales, el número de folículos primarios tempranos (FPT) fue muy escaso o incluso nulo en el

| | |
|---|--|
| Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción |  |
| RESULTADOS | |

grupo GH50. No obstante, el diámetro de éstos fue mayor en el grupo control que en los inmunizados con 100 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH. Los folículos primarios en crecimiento y preantrales (FPC+PA) así como los antrales (FA) presentaron diámetros similares en todos los grupos experimentales.

| | GHC | GHV100 | GHV50 | GHV25 | P |
|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------|
| Nº conejas | 6 | 5 | 4 | 3 | |
| FPDIAL (μm) | 34,4 \pm 0,72 ^b | 35,5 \pm 0,41 ^b | 39,7 \pm 0,99 ^a | 34,6 \pm 0,99 ^b | 0.0002 |
| FPT (μm) | 53,6 \pm 2,17 ^a | 44,1 \pm 1,94 ^b | - | 38,8 \pm 3,06 ^b | 0.0015 |
| FP (μm) | 81,3 \pm 4,31 ^a | 72,4 \pm 3,59 ^{ab} | 78,8 \pm 3,73 ^a | 60,8 \pm 6,46 ^b | 0.0444 |
| FPC + PA (μm) | 165,6 \pm 18,67 | 188,6 \pm 9,19 | 170,9 \pm 20,88 | 194,6 \pm 12,79 | 0.5235 |
| FA (μm) | 628,0 \pm 47,82 | 657,9 \pm 36,53 | 559,9 \pm 42,18 | 639,0 \pm 38,15 | 0.3504 |
| CE | 0,2 \pm 0,57 ^c | 2,6 \pm 0,62 ^b | 5,3 \pm 0,81 ^a | 3,3 \pm 0,81 ^a | 0,0011 |

Tabla 8: Diámetro (μm) de los folículos observados en los cortes histológicos de los ovarios de conejas inmunizadas con 0 (GHC), 100 (GHV100), 50 (GHV50) y 25 (GHV25) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH. (FPDIAL: F. primordial; FPT: F. primario temprano; FP: F. primario; FPC+PA: F. primario en crecimiento + preantral; FA: F. antral) y número de folículos con cuerpos de Call-Exner (CE). Las medias ($\mu\text{m} \pm \text{esm}$) seguidas de letras distintas dentro de la misma columna y fila, se consideran diferentes estadísticamente ($p < 0,05$).

Cabe destacar que al estudiar los cortes histológicos ováricos se observó la presencia de cuerpos de Carl-Exner (CE) con una máxima incidencia en los grupos tratados con 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH (Imagen 37), mínima en las controles e intermedia en las tratadas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunógeno anti-GnRH.

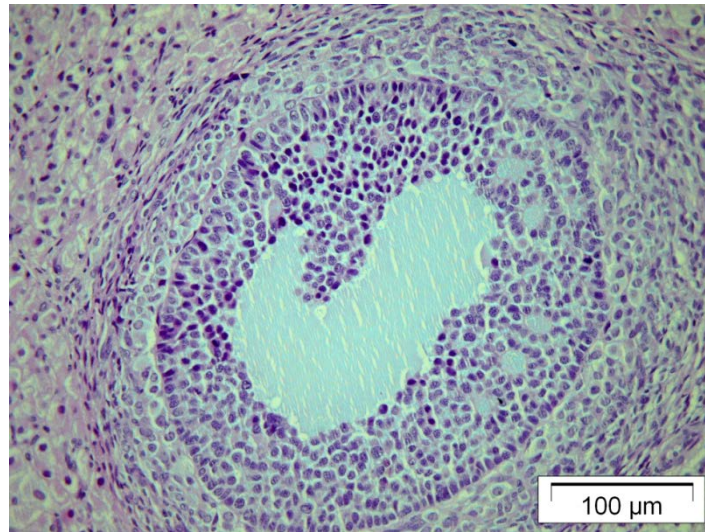


Imagen 37 Folículo de coneja GHV100 con cuerpos de Carll- Exner. GHV100. H&E

Para finalizar, podemos decir que en los cortes histológicos de los ovarios de las hembras control e inmunizadas, las principales diferencias que se han detectado son que en el grupo control se observan cuerpos lúteos (Imagen 38), folículos ováricos en diferente grado de diferenciación y ocasionalmente, algún folículo atrésico (Imagen 39). En las conejas inmunizadas no se observaron diferencias entre las distintas dosis aplicadas en el aspecto de los mismos, ni se detectaron cuerpos lúteos. Además, aumentó la presencia de folículos atrésicos.

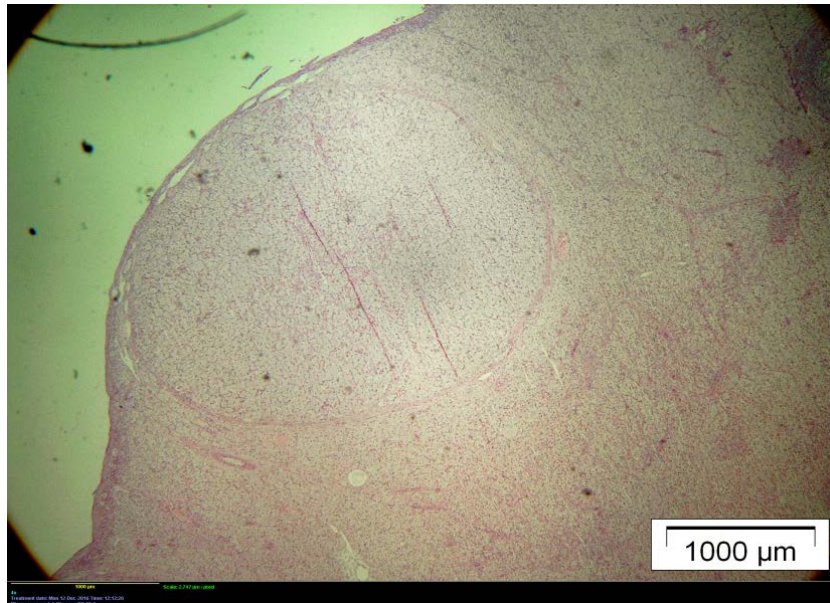


Imagen 38: Cuerpo Lúteo de una coneja control.

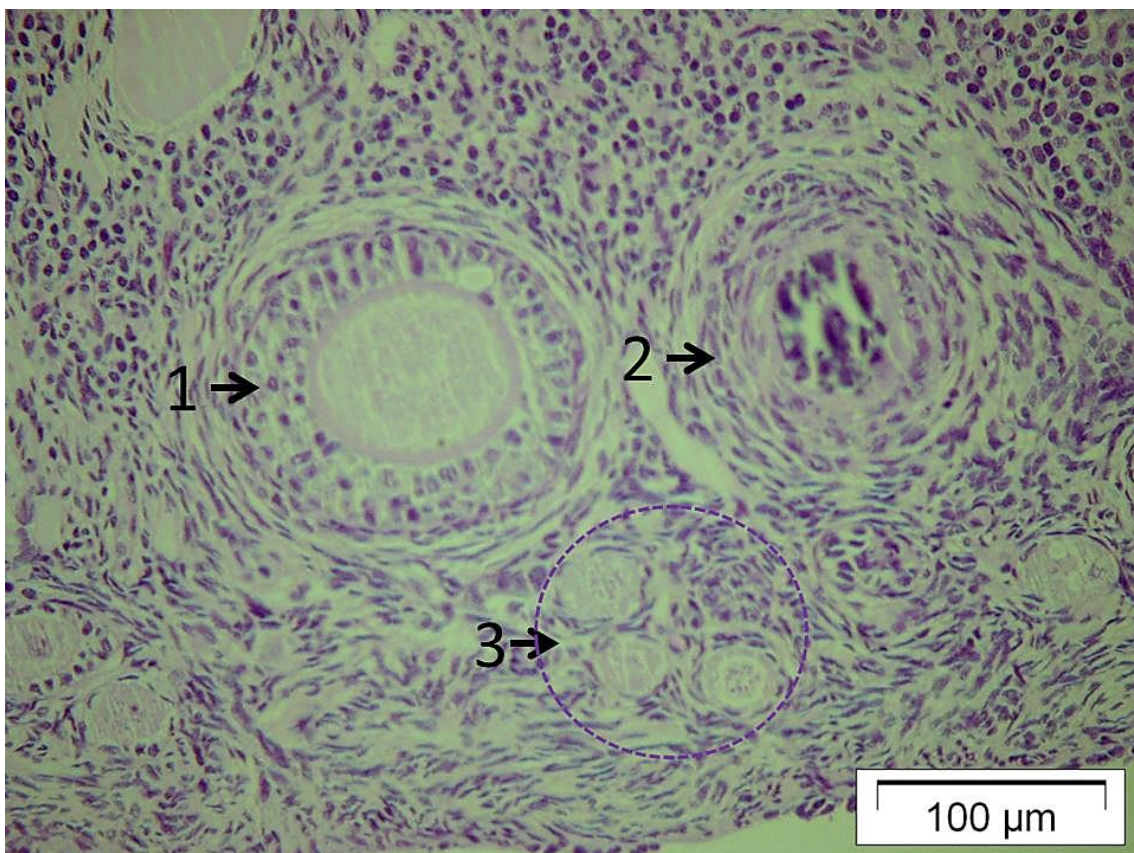


Imagen 39. Ovario de una coneja inmunizada del grupo GHV50. H&E. 1: folículo preantral; 2: folículo atrésico; 3: folículos primordiales


DISCUSIÓN



En esta Tesis Doctoral se ha estudiado por primera vez la utilización de una molécula anti-GnRH utilizando el conejo como modelo animal. Se ha aplicado tanto en machos como en hembras antes de que llegaran a la pubertad y hemos descrito las principales consecuencias en los animales a nivel:1) inmunológico, valorando la presencia y evolución de la producción de anticuerpos, 2) endocrino, estudiando la producción de hormonas ligadas a la reproducción en cada sexo y 3) morfológico, determinando los efectos en el peso de los individuos, de sus gónadas así como las consecuencias a nivel histológico.


La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es pulsátil y estimula la secreción hipofisaria tanto de la (LH) como (FSH), controlando así la función endocrina (producción de hormonas) y exocrina (producción de células germinales) de las gónadas (Maeda *et al.*, 2010). En medicina humana, impedir estas funciones podría estar indicado para controlar distintos procesos como, por ejemplo, la prevención de la luteinización intempestiva de los folículos preovulatorios en mujeres sincronizadas durante la reproducción asistida o el tratamiento de trastornos dependientes de hormonas sexuales, entre otros (Huirne y Lambalk, 2001). Otra de las aplicaciones del bloqueo selectivo de la secreción de LH / FSH a través de la acción sobre la GnRH es la castración química. Este tratamiento se ha venido realizando mediante la desensibilización de la hipófisis a la GnRH cuando ésta se administra de manera continua, o mediante el suministro de agonistas de GnRH de acción prolongada. A diferencia de los agonistas, los antagonistas de la GnRH no inducen una estimulación inicial de la liberación de gonadotropina, sino que provocan una supresión inmediata, rápida y reversible de la secreción de gonadotropina. Por ello se eligió la utilización de un análogo anti-GnRH en nuestro estudio. El principal mecanismo de acción de los antagonistas de la GnRH es la ocupación competitiva del receptor de GnRH (GnRH-r) en las células gonadotropas de la hipófisis.

Por razones farmacológicas, las principales indicaciones para los antagonistas de la GnRH estarán en cualquier situación en la que se requiera la hipofisectomía gonadotrópica química, como es el caso del cáncer de próstata (Kluth *et al.*, 2014). También se han desarrollado antagonistas de los receptores de GnRH en la

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">DISCUSIÓN</p> | |

hipófisis. Estos, bloquean inmediatamente los efectos de la hormona hipotalámica y tienen un uso clínico con perfiles farmacocinéticos, de seguridad y comerciales aceptables. En la reproducción asistida, estos compuestos parecen ser eficaces, con tiempos de tratamiento más cortos, menos uso de hormonas gonadotrópicas y mejor aceptación del paciente, aunque la producción de folículos y oocitos es menor (Ezaki *et al.*, 2015). Las indicaciones actuales para la desensibilización del receptor de GnRH pueden ser también: endometriosis (Pontis *et al.*, 2017), leiomioma y cáncer de mama en mujeres, hipertrofia prostática benigna y carcinoma prostático en hombres, así como pubertad precoz central en niños. Sin embargo, la mejor evidencia clínica hasta ahora ha sido en la reproducción asistida y el cáncer de próstata (Ezaki *et al.*, 2015).


En cuanto al control de la fertilidad en animales domésticos, en los últimos años se está estudiando el uso de métodos inmunológicos como posible alternativa a los métodos quirúrgicos tradicionales, generalmente irreversibles y con numerosos efectos secundarios. La inmunocastración es un método que inicialmente fue desarrollado para aplicarlo en cerdos con el objetivo de inhibir el olor sexual y aumentar el bienestar de los mismos en las explotaciones (Van den Broeke *et al.*, 2016). Al producirse anticuerpos específicos frente a la GnRH se inhibe temporalmente la función testicular y con ello la acumulación de los componentes responsables del olor sexual. También ha sido utilizada en otras especies como son el visón (Lowell *et al.*, 2004), caballos (Janet *et al.*, 2009) y gatos (Robbins *et al.*, 2004). Estos métodos pueden estar indicados para evitar los problemas derivados de una intervención quirúrgica con el objetivo final de eliminar el olor sexual en cerdos, reducir el comportamiento sexual y mejorar el manejo de los animales enteros (Karaconji *et al.*, 2015). En el estudio de Zamaratskaia *et al.* (2008), los cerdos inmunocastrados mostraron un mejor comportamiento social, menos manipulador y agresivo, así como una marcada reducción del comportamiento sexual. En cuanto a disminuir la agresividad, en nuestro estudio no tenemos evidencia de cambios en el comportamiento, ya que, nuestros animales estaban alojados en jaulas individuales y por tanto no hemos tenido el problema que surge en otras especies animales que están alojadas juntas.

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">DISCUSIÓN</p> | |

En este proyecto, el inmunógeno utilizado ha demostrado una sensible eficacia a la hora de provocar la respuesta inmune en los conejos tratados. Se trata de la primera vez que se ha utilizado este tipo de vacunación anti-GnRH en esta especie, determinándose la titulación de anticuerpos en los animales inmunizados, tanto hembras como machos. En yeguas, Imboden *et al.* (2006) administraron dos dosis con un mes de diferencia entre ambas. Al valorar la respuesta inmune observaron que la inmunización contra GnRH era altamente variable a pesar de que las yeguas se habían vacunado en el mismo momento y con la misma dosis. También observaron una disminución progresiva de la titulación de anticuerpos similar entre los animales que habían respondido. Todo ello coincide con nuestro estudio en el que hemos observado también una elevada respuesta inmunológica y similar entre los animales del mismo grupo experimental.

Estudios realizados con otros fármacos anti-GnRH como los realizados por Schanbacher y Pratt (1985), demuestran que tras administrar una segunda dosis del inmunógeno en caballos, el título de anticuerpos aumentó y las concentraciones de LH y testosterona en circulación cayeron precipitadamente. Como cabía esperar, la eficacia de la vacunación depende del título de anticuerpos anti-GnRH alcanzado y, por tanto, de la composición precisa de la vacuna. En nuestro trabajo, con la utilización de Improvac también se obtuvo la máxima titulación de anticuerpos con la segunda inmunización administrada en la semana 15 de edad.

La aplicación de la inmunocastración en los machos y el estudio de sus consecuencias a nivel hipofisario y testicular se ha realizado en multitud de especies. En sementales jóvenes de caballos, Dowsett *et al.* (1991) y Turkstra JA, (2005) también observaron que la vacunación indujo un aumento de los títulos de anticuerpos anti-GnRH circulantes, y además, esto condujo a reducciones en las concentraciones séricas de testosterona, en la libido, en el tamaño del testículo, en la producción y calidad del esperma, así como en el tamaño y actividad de los túbulos seminíferos y de las células de Leydig. Dowsett *et al.* (1991), suprimieron con éxito todos los parámetros anteriores de la función reproductiva en caballos durante aproximadamente 28 semanas. En este caso, desafortunadamente, las reacciones no deseadas en el punto de inoculación


| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">DISCUSIÓN</p> | |

hicieron que la vacuna no fuera apta para su comercialización. Sin embargo, en nuestro estudio la aplicación de la vacuna anti-GnRH en dos dosis, una a las 11 y otra a las 15 semanas de vida, vía subcutánea y en distintos puntos de inoculación a lo largo del dorso, no determinó ninguna reacción adversa en los animales.

Por otra parte, el peso de los animales no se vio afectado por la vacuna ya que todos llegaron a pesos similares al final del experimento. No obstante, sería aconsejable hacer estudios sobre la calidad de la carne de estos animales porque en cerdos se ha visto que cambia la infiltración de la grasa (Hügel *et al.*, 2011).

Malmgren *et al.* (2001), en sementales equinos adultos, obtuvieron una respuesta más variable entre los individuos, al ser unos más propensos que otros a las reacciones de vacunación. Se ha constatado una gran variación individual en respuesta a la vacunación, particularmente en caballos adultos. En yeguas, se aprobó una vacuna frente a GnRH en Australia para el control del estro y del comportamiento relacionado con el mismo (Janett *et al.*, 2009). Otros estudios realizados en cerdos por Zamaratskaia *et al.* (2008) han constatado que la vacunación contra la GnRH con el mismo fármaco que el utilizado en este trabajo reprimió la función reproductiva en los machos. Estos autores evidenciaron niveles inhibidos de testosterona, sulfato de estrona y androstenona, y una disminución drástica del tamaño de los testículos y de las glándulas bulbouretrales en cerdos inmunocastrados. Así mismo, se redujeron los niveles de escatol. Estos efectos duraron hasta 22 semanas después de la segunda vacunación. Sin embargo, en nuestro estudio los niveles suprimidos de testosterona se mantuvieron en animales inmunizados con la dosis más alta, hasta 11 semanas después de la segunda administración de la vacuna, presentando por tanto, una titulación de anticuerpos suficiente como para desencadenar un efecto tan prolongado.

Un efecto prolongado del inmunógeno anti-GnRH puede hacer posible administrar la segunda dosis del producto más espaciada de lo que se recomienda actualmente que es 4-6 semanas antes del sacrificio, y así proporcionar una mayor flexibilidad en la aplicación. Por lo que sabemos, Hilbe *et al.* (2006). fueron los primeros que valoraron los efectos a largo plazo de la vacunación activa contra la GnRH sobre la testosterona circulante, los andrógenos y las características de comportamiento

| | |
|---|---|
| <p>Immunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p>DISCUSIÓN</p> | |

de los cerdos machos demostrando que los cerdos machos inmunizados cinco veces pueden restaurar el tejido testicular 60 semanas después de la última vacunación.

Hay pocos estudios sobre la duración del efecto de la vacunación anti-GnRH en otras especies. En los corderos, una sola vacunación contra la GnRH a los 3 meses de edad suprimió el desarrollo del testículo y la producción de testosterona hasta los 6 meses de edad (Cui *et al.*, 2003). Del mismo modo, el efecto de la vacuna Improvac en corderos inmunizados dos veces con un espacio de tiempo entre inyecciones de 3 semanas, se prolongó al menos 3 meses después de la segunda vacunación (Janett *et al.*, 2003). Clement *et al.* (2005) demostraron que la reversibilidad de la vacunación anti-GnRH en los sementales ocurría 5-9 meses después de la última vacunación. Hay que tener en cuenta que Cui *et al.* (2003) y Clement *et al.* (2005), utilizaron vacunas de distinta composición en sus estudios.


Esbenshade y Johnson (1987) demostraron que la inmunocastración de jabalíes sexualmente maduros que muestran libido completa, elimina el comportamiento sexual durante al menos 4 semanas. El ensayo de apareamiento se realizó 21 semanas después de la segunda vacunación, sin embargo, ninguno de los jabalíes vacunados fueron capaces de montar una hembra en celo. La larga duración del efecto de la vacunación observada, en este estudio sugiere, que la segunda inyección de Improvac se puede administrar más de 6 semanas antes del sacrificio.

La función testicular exitosa depende de la secreción de GnRH, que a su vez estimula la LH para actuar sobre el testículo e inicia la producción de esteroides testiculares. Sus acciones están mediadas por receptores ubicados en el hipotálamo. Los niveles bajos o incluso indetectables de testosterona y sulfato de estrona en el plasma de cerdos inmunocastrados hasta 22 semanas después de la segunda vacunación, indican una supresión de la función testicular normal (Zamaratskaia *et al.*, 2008). También, en toros prepúberes vacunados en la tercera y sexta semana de vida se ha observado una inhibición del pico de LH y se ha conseguido una supresión de la testosterona durante 22 semanas obteniendo como consecuencia un retraso en el desarrollo testicular (Janett *et al.*, 2012).



En nuestro estudio con el tratamiento de conejos machos prepúberes utilizando el mismo inmunógeno que Zamaratskaia *et al.* (2008), hemos observado efectos similares en cuanto a la disminución de los esteroides sexuales y de la LH con una clara correspondencia en la disminución del tamaño de las gónadas, y de los túbulos seminíferos. La duración de los niveles disminuidos de la LH y testosterona ha sido de más de un mes tras la segunda administración de la vacuna e incluso se han observado sus efectos después de la estimulación con el análogo de la GnRH. A diferencia de otros estudios anteriores, nosotros hemos aplicado diferentes dosis del producto, con el objetivo de verificar la más adecuada y observar la importancia de administrar una dosis correcta. Como cabía esperar, con las dosis más altas obtenemos los mismos resultados que el estudio anterior, aunque con pequeñas diferencias como la variabilidad inmunológica observada al comparar los machos con las hembras, debido probablemente a que la especie animal no es la misma.

Estudios de Xing-fa *et al.* (2013), realizados en ratas macho adultas con una vacuna anti GnRH, observaron una marcada disminución de la síntesis de esta hormona por el hipotálamo. Histológicamente se observó una disrupción del tejido intersticial del testículo incluyendo una disminución en el número de células de Leydig. Tal y como hemos mencionado, las células de Leydig son células grandes y poliédricas que se encuentran en grupos cerca de los vasos sanguíneos en el intersticio de los túbulos seminíferos. Están equipadas enzimáticamente para la producción de la testosterona y van a tener un efecto importante en la espermatogénesis. Por esta razón, en los animales tratados con inmunógenos anti-GnRH esta función testicular va a ser claramente alterada. Consecuencias similares se han observado también, en toros y cerdos (Wicksn *et al.*, 2013), y han sido corroboradas en nuestro estudio, en el que encontramos, en el grupo vacunado, una disminución de la luz del tubo seminífero, un engrosamiento de la membrana basal que en zonas aparecía ondulada y un escaso número de las células de la línea germinal (espermátogonias, espermátocitos primarios y un número muy escaso de espermátidas). En el grupo control al igual que Boukenaoui *et al.* (2012), nosotros hemos visto a diferencia de los animales inmunizados, que los testículos presentaron túbulos seminíferos con mayor luz, además de un mayor diámetro tubular, testículos tapizados principalmente por células de Sertoli y un desarrollo completo de las células

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">DISCUSIÓN</p> | |

de la línea germinal (espermatogonias claras y oscuras, espermatocito primario y secundario, espermatidas redondas y alargadas y espermatozoides).


Por otro lado, en las células de Sertoli también se va a ver una alteración en los receptores a la FSH (Xing-Fa *et al.*, 2013). Estos autores observaron, que era muy importante la edad del animal en el momento de la administración de la vacuna: si se realiza en animales adultos el efecto es reversible, pero en prepúberes se inhibe la actividad reproductiva del animal.

En la presente Tesis Doctoral también se presentan los efectos de la vacuna en conejos hembras. En éstas, al igual que en los machos, la titulación de anticuerpos presentó una gran variación inmunológica individual, debido probablemente, entre otros motivos, a las distintas dosis aplicadas en los diferentes grupos experimentales, siendo la duración del efecto del fármaco sobre la titulación de anticuerpos de más de un mes a partir de la aplicación de la segunda dosis.

También se valoraron las concentraciones séricas de LH en las hembras, como hicimos en los machos, obteniendo resultados similares, es decir no se observa un comportamiento distinto de la LH en los machos ni en las hembras mientras están creciendo y antes de la estimulación con GnRH. Sin embargo, cuando llegan a la pubertad y son estimuladas con GnRH, las conejas control ovularon y tuvieron un pico de LH normal, a diferencia de las inmunizadas. Esto hizo que las conejas controles tuvieran cuerpos lúteos mientras que las vacunadas no los presentaron. Por lo que podemos deducir, que al igual que en los machos vacunados, la hipófisis en las hembras inmunizadas tampoco respondió y no se desencadenó la ovulación de los folículos ováricos.

En cuanto al estudio histológico del ovario del grupo control vimos: cuerpos lúteos, folículos ováricos en distinto grado de desarrollo, a diferencia del grupo tratado, en el que observamos un claro aumento de los folículos atrésicos.

En las hembras, el desarrollo de las gónadas conlleva no sólo la oogénesis sino también la foliculogénesis, durante la cual se pueden observar folículos en diferentes

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">DISCUSIÓN</p> | |

estadios de maduración hasta llegar a producirse la ovulación del oocito albergado en su interior.


Según (Hutt *et al.* (2006), en mamíferos, los folículos ováricos primordiales se desarrollan durante la vida fetal. No obstante, también se pueden desarrollar en la vida postnatal temprana, como ocurre en las ratonas y las conejas. Una vez que la hembra llega a la pubertad la activación con éxito del folículo primordial es crítica para la fertilidad, pero los factores que caracterizan y regulan este proceso son escasamente conocidos.

Según Braw-Tal (2002) la activación del folículo se define ampliamente por tres acontecimientos importantes:

- 1-Transición de las células de la granulosa que rodean el oocito de una morfología aplanada a otra cuboidea.
- 2- Proliferación lenta de células de la granulosa.
- 3- Crecimiento del oocito seguido por mitosis rápida de las células de la granulosa.

En la coneja, durante la vida fetal, las células germinales primordiales migran a la gónada primitiva durante las semanas segunda y tercera de una gestación de 31 días. El proceso de la oogénesis se inicia al nacer y la oogonia entra en meiosis y se convierte en oocito I durante los 10 primeros días de vida. En la semana post-natal 3, el ovario comprende folículos tanto primordiales como en ligero desarrollo, sin embargo, los folículos antrales se detectan por primera vez durante la semana 12 del desarrollo postnatal (Hutt *et al.*, 2006).

Gondos y Zamboni (1969) demostraron que el inicio de la activación de los folículos primordiales y el desarrollo temprano están asociados con el crecimiento de los oocitos, así como con la morfogénesis y la proliferación de las células de la granulosa. Por lo tanto, el proceso de formación completa del folículo primordial es presumiblemente completado entre la segunda y cuarta semanas de edad. En los primeros 10 días de vida, Peters *et al.* (1965), sugirieron que todas las células germinales en el ovario de conejo de 2 semanas de edad habían salido de la mitosis y

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">DISCUSIÓN</p> | |


estaban en diversas etapas de la profase meiótica. Sin embargo, YoungLai (1985), encontró un pequeño número de oogonias (estadio previo al oocito I) en los ovarios obtenidos a partir de conejos de 15 días de edad.

En el desarrollo de los distintos estadios foliculares y en la ovulación van a actuar de forma sinérgica la FSH y la LH, además del estradiol y la progesterona. La primera tiene un papel más importante durante el crecimiento folicular, mientras que la LH predomina en los estadios finales: desde la maduración hasta la ovulación.

En las hembras, tras la administración de la vacuna, hemos observado los mismos efectos que en los machos en cuanto a LH y esteroides sexuales. Además, hemos detectado que la vacuna tiene efectos a nivel del tamaño de las poblaciones foliculares menos avanzadas (Folículo primordial, Folículo primario temprano y Folículo primario). No obstante, en los folículos más desarrollados (Folículo primario en crecimiento + Folículo preantl y Folículo antral) no ha habido diferencias en cuanto a los diámetros foliculares entre grupos experimentales tratados o no. Estos últimos son responsables de la producción estrogénica del ovario que se vio perjudicada en las conejas inmunizadas. Además, observamos un aumento de las concentraciones séricas de estradiol en las controles con respecto a las conejas inmunizadas tras la inducción con GnRH. Pensamos que dada la disminución del tamaño de algunas poblaciones foliculares en el grupo inmunizado y al ser el estradiol una de las hormonas clave en y para la maduración folicular (Welschen *et al.*, 1975), se podría justificar el descenso de las concentraciones séricas de esta hormona en el grupo tratado.

Por lo tanto, el empleo de este inmunógeno en conejos ha resultado efectivo para el control de las hormonas y esteroides sexuales tanto en machos como en hembras, y a su vez el conejo un buen modelo animal para este estudio y sus posibles aplicaciones en las diferentes patologías relacionadas con la inhibición del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

CONCLUSIONES

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Inmunomodulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: Valoración del conejo como biomodelo para el estudio de la fisiología de la reproducción</p> |  |
| <p style="text-align: center;">CONCLUSIONES</p> | |

Considerando las condiciones experimentales y en base a los resultados obtenidos, las conclusiones de esta Tesis doctoral en cuanto a los efectos de la administración de un inmunógeno anti-GnRH a conejos y conejas prepúberes, en dos dosis subcutáneas separadas 4 semanas, son:

- 1- La titulación de anticuerpos anti-GnRH, tanto en machos como en hembras, confirman su efecto inmunógeno durante al menos 10 semanas.
- 2- Los cambios hormonales observados en las concentraciones séricas de LH, progesterona, estradiol y testosterona, confirman que se produce una inhibición de la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada por la acción del inmunógeno administrado.
- 3- Morfológicamente se ha puesto de manifiesto una disminución del tamaño y del peso de las gónadas en los conejos vacunados de ambos sexos.
- 4- El inmunógeno administrado, a nivel histológico, ha producido una disminución del tamaño de los túbulos seminíferos, así como del número de las células de Leydig y de la presencia de espermátidas en el caso de los machos, y en el caso de las conejas inmunizadas, hay alteraciones en algunos de los distintos estadios foliculares, así como una disminución en la presencia de cuerpos lúteos, hemorrágicos y un aumento de folículos atrésicos.
- 5- Por lo tanto, el empleo de este inmunógeno en conejos ha resultado efectivo para el control del eje hipotálamo-hipófisis-gonada, tanto en machos como en hembras, definiendo a esta especie como un buen modelo animal para estudios que precisen de una inhibición del sistema reproductor y sus posibles aplicaciones en otras especies.

BIBLIOGRAFÍA



Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Guillou F,

O'Shaughnessy PJ. (2008). Spermatogenesis and Sertoli cell activity in mice lacking Sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology*; 149: 3279-85.

Albrecht A.K, grosse Beilage E, Kanitz E, Puppe B, Traulsen I, Kreiter J. (2012).

Influence of immunisation against GnRF on agonistic and mounting behaviour, serum testosterone concentration.

Arias-Álvarez M et al. ITEA (2007), Vol. 103 (4), 173-185.

Berger, M.; Jean-faucherc, C.; Turckheim, M.; De Veysiere, G.; Blauc, M.R.; Poirier,

J.C. y Jean C. (1982). Testosterone, LH and FSH in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlations with sexual and behavioural development. *Acta Endocrinol*; 99, (3), 459-465.

Bliskis R., Sutkeviciene N., Riskeviciene V., Januskauskas A., Zilinskas H. (2012).

Effect of active immunization against GnRH on testosterone concentration, libido and sperm quality in mature AI boars. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54, 33.

Boukenaoui N, Moudilou E, Chevalier C, Amirat Z, Exbrayat JM, Khammar F.(2012).

Postnatal changes in testicular development and androgen receptors immunolocalization in D'Man ram lambs. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012 Apr 24;50(1):38-45. doi: 10.2478/18694.

Braw-Tal R.(2002). The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells?.

Mol Cell Endocrinol. 2002 Feb 22;187(1-2):11-8.

Boler D.D, Clark D.L, Baer A., Meeuwse D.M, King V.L, McKeith F.K, Killefer

J. (2011) Effects of increasing lysine on further processed product characteristics from immunologically castrated male pigs. *Journal of Animal Science* 89, 2200–2209.



Brunius C, Zamaratskaia G, Andersson K, Chen G, Norrby M, Madej A, Lundström

K. (2011) Early immunocastration of male pigs with Improvac - effect on boar taint, hormones and reproductive organs. *Vaccine* 29, 9514–9520.

Carmel PW, Araki S, Ferin M. (1976). Pituitary Stalk Portal Blood Collection in Rhesus

Monkeys: Evidence for Pulsatile Release of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). *Endocrinology*; 99(1), 243-248.

Castrovilli, CR, Rigoni, M. y Nordio CB. (1986). Risposta delle coniglie

alla somministrazione di ormoni ipotalamici, ipofisari e gonadici. *Riv. Coniglicol.*, 23, (3), 53-55.

Claus, R, Lacorn, M, Danowski, K, Pearce, M.C, Bauer, A. (2007). Short-term

endocrine and metabolic reactions before and after second immunisation against GnRH in boars. *Vaccine* 25: 4689-4696.

Claus R, Rottner S, Rueckert C. (2008). Individual return to Leydig cell function after

GnRH- immunization of boars. *Vaccine* 26, 4571–4578.

Clement F, Vidament M, Daels P, van der Meer F, Larry JL, Colenbrander B, Turkstra

J.(2005).Immunocastration in stallion:effects on spermatogenesis and behavior.*Anim Reprod Sci.*Oct;89(1-4):230-3.

Costanzo LS (2014) *Fisiología.* : Elsevier Health Sciences Spain, 2014. www.elsevierelibrary.es/product/fisiologa61532.

Cronin G.M, Dunshea F.R, Butler K.L, McCauly I., Branett J.L, Hemsworth P.H.

(2003). The effects of immuno- and surgical castration on the behaviour and consequently growth of group-housed, malefinisher pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 81, 111-126.



- Cui S, Chen YF, Yue HN, He YQ, McNeilly AS.(2003). Sexual development and the effects of active immunization against GnRH in Chinese Tanyang ram lambs. *Anim Reprod Sci.* 2003 Jul 15;77(3-4):129-39.
- Dal Bosco A, Rebollar PG, Boiti C , Zerani M, Castellini C. (2011).Ovulation induction in rabbit does: Current knowledge and perspectives.*Animal Reproduction Science* 129 106–117.
- Dall’Aglío C, Millán P, Maranesi M, Rebollar PG, Brecchia G, Zerani M , Gobbetti A , Gonzalez-Mariscal G, Boiti C. 2013. Expression of the cannabinoid receptor type 1 in the pituitary of rabbits and its role in the control of LH secretion. *Domestic Animal Endocrinology*; 45,171–179.
- De Los Reyes M, Barros C. (2000). Immunolocalization of Proacrosin/Acrosin in bovines and bovine sperm penetration through the zona pellucida. *Anim. Reprod; Sci.*58, 215-228.
- Diaz P.; Gosalvez LF. y Rodriguez JM. (1987). Relación entre color de vulva y parámetros reproductivos en la coneja. *Información Técnica Económica Agraria (ITEA)*, 72: 52-56.
- Dimitrov R, Stamatova K, Kostov D. 2013. Comparative imaging of the vesicular glands in New Zealand white rabbits. (*Oryctolagus cuniculus*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.* 37: 97-101.
- Dowsett KF, Pattie WA, Knott LM.(1991). A preliminary study of immunological castration in colts. *J.Reprod.Fert*;44,183-190.
- D`Occhio MJ.(1993). Inmunological suppression of reproductive fuctions in male and female mammals. *Anim Reprod; Sci*;33:345-372).



Dufau ML 1988 Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell.

Annu Rev Physiol 50: 483-508.

Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long K.A, Lopatnicki S,

Nugent E.A, Simons J.A., Walker J., Hennessy D.P. (2001) Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *Journal of Animal Science* 79, 2524-35.

Einarsson S. (2006) Vaccination against GnRH: pros and cons. *Acta Veterinaria*

Scandinavica 48 (Suppl. 1),S10.

Esbenshade KL, Johnson BH.(1987). Active immunization on boars against

gonadotropin releasing hormone.II. Effects on libido and response on testosterone propionate. *Theriogenology*:April:27(4)581-5.

Ezaki T, Kosaka T, Mizuno R, Shinojima T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M.(2015).

Efficacy of treatment with a GnRH antagonist in prostate cancer patients previously treated with a GnRH agonist. *Cancer Chemother Pharmacol*; Aug;76(2),301-6.

Fàbrega E, Velarde A, Cros J, Gispert M, Suárez P., Tibau J., Soler J. (2010). Effect of

vaccination against gonadotrophin releasing hormone, using Improvac®, on growth performance, body composition,behavior and acute phase proteins. *Livestock Science* 132, 53–59.

Fernandez-Moya E. (2011) Resultados del uso de la vacunación como alternativa a la

castración física en cerdas ibéricas. *Solo Cerdo Ibérico* 26, 26–28.

Fischer B, Meuser-Odenkirchen G.(2000). A 2 year follow-up of effects of

biotechniques on reproduction in the domestic rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Reprod Toxicol*. 2000 Nov-Dec;14(6):477-93.



Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A, Duranthon V.(2012).

Rabbit as a reproductive model for human health. Jul;144(1):1-10. doi: 10.1530/REP-12-0091. Epub 2012 May 10.

Foote RH¹, Carney EW. (2000). Reprod Toxicol. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. Nov-Dec;14(6):477-93.

Forcada, F. y Abecia, J.A. (1990). Circulating progesterone levels, ovulation rate and sexual behaviour in rabbits during pseudopregnancy induced by vasectomized males and HCG injection. J. Appl. Rabbit Res., 13, (2), 74-79.

García-Galiano D, Pimilla L, Tena-Sempere M.(2012). Sex steroid and the control of the KISS 1 system: developmental roles and major regulatory actions. J Neuroendocrinol; 24,22-33.

George JT, Seminara SB.(2012). Kisspeptin and the Hypothalamic Control of Reproduction: Lessons from the Human. *Endocrinology*; 153(11):5130-5136. doi:10.1210/en.2012-1429.

Gondos, B. & Zamboni, L. (1969). Ovarian development: the functional importance of germ cell interconnections. *Fertil. Steril*; 20, 176-189.

Gosalvez, L.F.; Rodriguez, J.M. y Diaz, P. (1985). Comportamiento sexual de la coneja en post-parto. Xº Symposium de Cunicultura. Barcelona.

Hadley, M E (1997a). Hormonas hipofisarias. En: *Hadley. Endocrinología 4ª ed.* Ed.: Prentice Hall, Madrid. pp. 98-104.

Hadley, M E (1997b). Hormonas y fisiología reproductora masculina. En: *Hadley. Endocrinología 4ª ed.* Ed.: Prentice Hall, Madrid. pp. 459-479.

Hadley, M E (1997c). Hormonas y fisiología reproductora femenina. En: *Hadley. Endocrinología 4ª ed.* Ed.: Prentice Hall, Madrid. pp. 487-498.



Hall JE. (2016a).- Funciones reproductoras y hormonales masculinas. En: Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Ed. Elsevier Health Sciences Spain. pp 1021-1030. www.elsevierlibrary.es/pdfreader/guyton-y-hall-tratado-de-fisiologia-mdica

Hall JE. (2016b).- Funciones reproductoras y hormonales femeninas. En: Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Ed. Elsevier Health Sciences Spain. pp 1037-1054. www.elsevierlibrary.es/pdfreader/guyton-y-hall-tratado-de-fisiologia-mdica

Hayes FJ, Seminara SB, Decruz S, Boepple PA, Crowley WF, Jr. (2000). Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *J Clin Endocrinol Metab*; 85,3027-35.

Hennessy D. (2006) Global control of boar taint. Part 4. Immunological castration in action. *Pig Progress* 22, 14-16.

Hernández-García F.I., Duarte J.L., Pérez M.A., Raboso C., Del Rosario A.I., Izquierdo M. (2013) Successful long-term pre-pubertal immunocastration of purebred Iberian gilts reared in extensive systems. *Acta Agriculturae Slovenica (Suppl. 4)*, 123-126.

Herrler A, Beier H. (2000). Early embryonic coats: Morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs*. 166 (2): 233-246.

Hilbe M, Jaros P, Ehrensperger F, Zlinszky K, Janett F, Hässig M, Thun R.(2006). Histomorphological and immunohistochemical findings in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2006 Nov;148(11):599-608.

Hoffmann, B: New drugs to control canine and feline reproduction. In: FECAVA-Voorjaarsdagen: International Congress 2005: EVSSAR Precongress Day, Amsterdam, NTH. 11-14,



Holtz, W., Foote, R.H. 2005. The anatomy of the reproductive system in male Dutch rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with special emphasis on the accessory sex glands. *J. Morphol.*, 2005; 158: 1–20.).

Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, Ogura A.(2010).

Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem.* 2010 Oct 8;285(41):31362-9. doi: 10.1074/jbc.M110.150540. Epub 2010 Jul 29.

Hügel T, Zöls S, Palzer A, Kaufmann S, Langhoff R, Ritzmann M, Heinritzi K.

Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.(2011). Effect of a synthetic GnRF vaccine (Improvac®) on daily weight gain and carcass quality of boars. A field trial in Bavaria.;39(6):353-7. German.

Huirne JA, Lambalk CB. (2001). Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists.

Lancet; Nov 24;358(9295),1793-803.

Hulot, F.; Mariana, J.C. y Lebas, F. (1982). L'établissement de la puberté chez la lapine

(Folliculogenése et ovulation). Effect du rationnement alimentaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 22, (3), 439-453.

Hutt, K J, McLaughlin, E. A. & Holland, M. K. (2006). Primordial follicle activation

and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell. Tissue. Res*; 326, 809-822.

Ibáñez L, Valls C, Ferrer A, Marcos MV, Rodriguez-Hierro F, de Zegher F.

(2001).Sensitization to insulin induces ovulation in nonobese adolescents with anovulatory hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Aug;86(8):3595-8.



Ibáñez L, Valls C, Cols M, Ferrer A, Marcos MV, De Zegher F.(2002). Hypersecretion of FSH in infant boys and girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 May;87(5):1986-8.

Imboden I, Janett F, Burguer D, Crowe M.A, Hassig M, Thun R.(2006). Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous Behavior in the mare. *Theorology* 66;1866-1875.

Inano H, Ishii-Ohba H, Sugimoto Y, Ohta Y, Morikawa T, Yoshida M, Tamaoki B. (1990). Purification and properties of enzymes related to steroid hormone synthesis. *Ann N Y Acad Sci*; 595: 17-25.

Janett F, Lanker U, Jörg H, Hässig M, Thun R.(2003). [The castration of male lambs by immunization against GnRH]. *Schweiz Arch Tierheilkd.* Jun;145(6):291-9.

Janett F R, Stump R, Burger D, Thun R. (2009). Suppression of testicular function and sexual behavior by vaccination against GnRH (Equity™) in the adult stallion. *Animal Reproduction Science*;115,88-102.

Janett F. Gerig, T, Tschuorb A, Amatayakul-Chantlerc, C.S. Walkerc J, Howardc R, Piechottad M. Bollweina, H. Hartnacke, S. Thun. R.(2012). Effect of vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF)with Bopriva® in the prepubertal bull calf. *Animal Reproduction Science*;131,72-80.

Jelinkova L, Kubelka M, Motlik, J, Guerrier, P. 1994. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbits oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 37, 210—215.



John E. Hall. (2011). Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica, Elsevier Health

Sciences Spain. 974. www.elsevierelibrary.es/pdfreader/guyton-y-hall-tratado-de-fisiologa-mdica/996.

Johnson ES, Gendrich RL, White WF. (1976). Delay of puberty and inhibition

of reproductive processes in the rat by a gonadotropin-releasing hormone agonist analog. *Fertil. Steril*; 27: 853-860.

Karacnji B, Lloyd B, Campbell N, Meaney D, Ahern T.(2015). Effect of and anti-

gonadotropin-releasing factor vaccine on sexual and aggressive behavior in male pigs during the finishing period under Australian field conditions. *Aust Vet J*;93(4):125-3.

Karsenty G. (2012). The mutual dependence between bone and gonads. *J Endocrinol*;

213: 107-14. *Reproduction*. 2002 May;123(5):613-20.

Kidder GM¹, Mhawi AA.(2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis.

Reproduction. 2002 May;123(5):613-20.

Kubale V, Batorek N, Škrlep M, Prunier A, Bonneau M, Fazarinc G, Čandek-

Potokar M. (2013). Steroid hormones, boar taint compounds, and reproductive organs in pigs according to the delay between immunocastration and slaughter. *Theriogenology* 79, 69-80.

Kluth LA, Shariat SF, Kratzik C, Tagawa S, Sonpavde G, Rieken M, Scherr DS,

Pummer K. (2014). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis and prostate cancer: implications for androgen deprivation therapy. *World J Urol*. 2014 Jun;32(3):669-76. doi: 10.1007/s00345-013-1157-5. Epub 2013 Sep 3.

Koepfen BM. (2011a).- Los aparatos reproductores masculino y femenino. En: Berne y

Levy. *Fisiología*. Ed., Elsevier Health Sciences Spain 6ª ed. pp758-769.

www.elsevierelibrary.es/pdfreader/berne-y-levy-fisiologa-student-consultcom



Koeppen BM. (2011b).- Los aparatos reproductores masculino y femenino. En: Berne y Levy. Fisiología. Ed., Elsevier Health Sciences Spain 6ª ed. pp769-778.

www.elsevierlibrary.es/pdfreader/berne-y-levy-fisiologa-student-consultcom

Klein BG. Cunningham (2013). Endocrinología. En: Fisiología veterinaria. : Elsevier Health Sciences Spain. pp 366-367.

<https://www.elsevierlibrary.es/product/cunningham-fisiologa-veterinaria-evolve>.

Kretser DM y O'Donnell L. (2013). Endocrinology of the Male Reproductive System.

De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

Kutzler M, Wood A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization.

Theriogenology; Aug,66(3):514-25. Epub 2006 Jun 6.

Lealiifano A.K., Pluske J.R., Nicholls R.R., Dunshea F.R., Campbell R.G., Hennessy

D.P., Miller D.W., Hansen C.F., Mullan B.P. (2011) Reducing the length of time between harvest and the secondary gonadotropinreleasing factor immunization improves the growth performances and clears boar taint compounds in male finishing pigs. Journal of Animal Science 89, 2782-2792.

Lechan RM, Toni R. (2016). Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary.

In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet].

South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; Available from:

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279126/.

Lefèvre B, Caillol M. 1978. Relationship of oestrus behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 18, 1435-1441.



Lleonart F, Campo JL, Valls R, Castello JA, Costa, P, Pontes M. (1980). Tratado de cunicultura. Real Academia Oficial y Superior de Avicultura. Barcelona.

Levasseur, M.C. (1979). Thoughts on puberty. The Gonads. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 19: 321-335.

Levine JE, Pau KYF, Ramirez VD, Jackson GL. (1982). Simultaneous Measurement of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone and Luteinizing Hormone Release in Unanesthetized, Ovariectomized Sheep. Endocrinology; 111 (5): 1449-1455. doi: 10.1210/endo-111-5-1449.

Lorenzo P L, Rebollar P, Illera MJ, Illera JC, I M, Alvarino JM. (1996a).

Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. J. Reprod. Fertil; 107, 109-107.

Lowell A, Miller JC, Rhyan MD. (2004). Contraception of bison by GnRH

vaccine: a possible means of decreasing transmission of brucellosis in bison. Journal of Wildlife Disease; 40(4),725-730.

Maeda K, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, Okamura H.

(2010). Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res*; 1364: 103-115.

Malmgren L, Andresen O, Dalin AM.(2001). Effects of GnRH immunization on

hormonal levels, sexual behavior, semen quality and testicular morphology in mature stallions. *Equine Vet J. Jan* 33(1):75-83.

Mariana JC, Hulot F, Drevin C, Tomassone R, Poujardieu B. (1989). Estimation de la

durée moyenne de croissance d'un follicule d'ovarie de lapine agée de 20 semaines, dans deux souches. *Archiv. Biol*; 100, 47-63.



Marques P, Skorupskaite K, Rozario KS, et al. Physiology of GnRH and Gonadotropin Secretion. [Updated 2015 Jul 31]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279070/.

Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. (1991). Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res*; 47: 155-187.

Miro's VV, Shulimov AG, Voskrensenskaya NS, Miknho VI. (1980). Age at sexual maturity of rabbits. *Ktolikovodstvoi Zverovodstvo*; 5, 12-13. *Ginecol Obstet Mex.* 2005 Jul;73(7):378-86.

Moreno A., Silván G., Illera JC. e Illera J. (2011a). Mecanismos generales de acción hormonal. En: *Endocrinología de pequeños animales: de la fisiología a la clínica*. Ed; Vetoquinol. Pp 17-38.

Moreno A., Silván G., Illera JC. e Illera J. (2011b). Endocrinología del aparato reproductor (masculino y femenino). En: *Endocrinología de pequeños animales: de la fisiología a la clínica*. Ed; Vetoquinol. pp 181-210.

Neuspiller F, Ayon P, Gallardo E.(2005). [Antagonists: from physiology to assisted reproduction]. *Ginecol Obstet Mex.* 2005 Jul;73(7):378-86.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/.



- O'Shaughnessy PJ, Morris ID, Huhtaniemi I, Baker PJ, Abel MH. (2009). Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Mol Cell Endocrinol*; 306: 2-8.
- Peters H, Levy E, Crone M. (1965). Oogenesis in rabbit. *J. Exp. Zool*;158, 169-180.
- Pontis Alessandro, Nappi Luigi, Sorrentino Felice, Paoletti Anna Maria, Melis Gian Benedetto, Angioni Stefano. Research development of a new GnRH antagonist (Elagolix) for the treatment of endometriosis: a review of the literature 2017.
- Prunier A, Bonneau M, von Borell E.H, Cinotti S, Gunn M, Fredriksen B, Giershing M., Morton D.B.,Tuyttens F.A.M., Velarde A. (2006) A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *Animal Welfare* 15, 277-289.
- Rebollar PG, Ubilla E, Alvariño JM, Illera JC, Silván G. (1992). Effect of the level of sexual receptivity on plasma oestradiol and the ovulatory response during the postpartum period in the rabbit. *Rev. Esp. Fisiol*; 48, 13-7.
- Rebollar PG, Dal Bosco A, Millán P, Cardinali R, Brecchia G, Sylla L, Lorenzo PL, Castellini C. (2012). Ovulating induction methods in rabbit does: The pituitary and ovarian responses. *Theriogenology*; 77,292–298.
- Rydhmer L, Lundström K, Andersson K. (2010) Immunocastration reduces aggressive and sexual behaviour in male pigs. *Animal* 4, 965-972.



Robbins SC, Jelinski MD, Stotish RL.(2004). Assessment of the immunological and biological efficacy of two different doses of a recombinant GnRH vaccine in domestic male and female cats (*Felis catus*). Journal of Reproductive Immunology;64:107-119.

Romagnoli S, Geretto N, Stelletta C: Prolonged supression of reproductif activity in male cats with a 4.7mg implant of desloreidina. Poster communication. In: 4th International Symposium April 8-10, 2010, Dallas, Texas, US.)

Rottner S., Claus R. (2009) Return of testicular function after vaccination of boars against GnRH: Consequences on testes histology. Animal 3, 1279-1286.

Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ 2010 Hormonal regulation of male germ cell development. J Endocrinol 205: 117-31.

Santen RJ. (1975). Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? J Clin Invest; 56: 1555-63.

Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L, White WF. Gonadotropin-Releasing Hormone: One Polypeptide Regulates Secretion of Luteinizing and Follicle-Stimulating Hormones. *Science* 1971; 173(4001): 1036-1038.

Schanbacher BD, Pratt BR.(1985). Response of a cryptorchid stallion to vaccination against luteinising hormone releasing hormone. Vet Rec. Jan 19;116(3):74-5.

Silverthorn DU (2008a).- Introducción al sistema endocrino. En: Fisiología Humana: un enfoque integrado. Ed., Editorial Médica Panamericana, 6ªed. pp 211-231. www.medicapanamericana.com/materialesComplementarios/Silverthorn-6/visor.aspx.



Silverthorn DU (2008b).- Reproducción y desarrollo, reproducción masculina. En: Fisiología Humana: un enfoque integrado. Ed., Editorial Médica Panamericana, 6ªed. pp 831-836.

www.medicapanamericana.com/materialesComplementarios/Silverthorn-6/visor.aspx.

Silverthorn DU (2008c).- Reproducción y desarrollo, reproducción femenina. En: Fisiología Humana: un enfoque integrado. Ed., Editorial Médica Panamericana, 6ªed. pp 837-844.

www.medicapanamericana.com/materialesComplementarios/Silverthorn-6/visor.aspx

Škrlep M., Batorek N., Šegula B., Kubale V., Fazarinc G., Čandek-Potokar M. (2011)

Incidenca kožnih poškodbna klavnih trupih prašičev: primerjava merjascev, imunokastratov in kirurških kastratov. Slovenian Veterinary Research 48 (Suppl. 13), 204-206.

Škrlep M., Čandek-Potokar M., Batorek N., Šegula B., Prevolnik M., Pugliese C.,

Bonneau M. (2012a) Length of the interval between immunocastration and slaughter in relation to boar taint and carcass traits. Proceedings of the 20th Int. Symp. Animal Science Days, Kranjska Gora, Slovenija, 247-251.

Stevens y Lowe (2006). Sistema Endocrino. En: Histología humana, ed. 6ª. ED. Elsevier España. pp 270-275. <https://www.elsevierlibrary.es/product/histologia-humana>.

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG.(2003). Effects of in-vivo and in-vitro.

Stoufflet I. Caillol M. (1986). Comportement sexual et niveau d'steroids circulants

pendant la gestation et après la parturition chez la lapine domestique. 4èmes Journées de la Recherche Cunicole. Paris.Hum. Reprod; Update, 9, 35-48.

Teplitz, R. y Ohno, S. (1963). Postnatal induction of ovogenesis in the rabbit

(*Oryctolagus cuniculus*). Experiment. Res.; 31: 183-189.



- Theau-clement M, Roustan A. (1992). A study on relationships between receptivity and lactation in the doe and their influence on reproductive performances. J. Appl. Rabbit Res., 15: 412-421.
- Tilbrook AJ, de Kretser DM, Cummins JT, Clarke IJ. (1991). The negative feedback effects of testicular steroids are predominantly at the hypothalamus in the ram. Endocrinology; 129: 3080-92.
- Trigg T, Yeates K. (2008). The development and use of deslorelin implants to suppress fertility- a synopsis and further advances. In: 6th ISCFR, Vienna, 265-266).
- Turner S.P, Franworth M.J, White I.M.S, Brotherstone S, Mendl M, Knap P, Penny P, Lawrence A. (2006). The accumulation of skin lesions and their use as a predictor of individual aggressiveness in pigs. Applied Animal Behaviour Science 96, 245-259.
- Turkstra JA, van der Meer FJ, Knaap J, Rottier PJ, Teerds KJ, Colenbrander B, Meloen RH. (2005). Effects of GnRH immunization in sexually mature pony stallions. Turkstra. Anim Reprod Sci. 2005 Apr;86(3-4):247-59.
- Ulker H, Kanter M, Gökdal O, Aygün T, Karakuş F, Sakarya ME, deAvila DM, Reeves JJ. (2005). Testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in ram lambs immunized against recombinant LHRH fusion proteins. Animals Reproduction Science; 86: 205-219.



- Van den Broeke A, Leen F, Aluwé M, Ampe B, Van Meensel J, Millet S.(2016). The effects of GnRH vaccination on performance, carcass, and meat quality and hormonal regulation in boars, barrows, and gilts. *J Anim*;94(7):2811-20.
- Van der Hurk R, Zhao J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*; 63, 1717-1751.
- Welschen R, Osman P, Dullaart J, de Greef WJ, Uilenbroek JT, de Jong FH. (1975). Levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol-17 beta and progesterone, and follicular growth in the pseudopregnant rat. *J Endocrinol*.;64 (1):37-47.
- Wicks N, Crouch S, Pearl CA.(2013). Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. *Anim Reprod Sci*. 2013 Nov 30;142(3-4):149-59.
- Xing-fa Han, Xiao-han Cao, Jing Tang, Xiao-gang Du, Xian-yin Zeng.(2013). Active immunization against GnRH reduces the synthesis of GnRH in male rats.
- Xingfa Han, Wei Chenz, Zhiyu Chen, Xiaogang Du, Xiaohan Cao, Xianyin Zeng. (2014). Active immunization against pregnenolone reduces testicular steroidogenesis and GnRH synthesis in rabbits. *Animal Reprod Science*; 145, 161-169.
- Young B y Heath JW (2000a). Glandulas endocrinas, En: Wheater's. *Histología funcional*. 1970. 4ª ed. pp 310-314.
- www.elsevierlibrary.es/product/wheaters-histologa-funcional



Young B y Heath JW (2000b). Aparato genital masculino, En: Wheater's. Histología funcional. 1970. 4ª ed. pp 328-335.

www.elsevierlibrary.es/product/wheaters-histologa-funcional

Young B y Heath JW (2000c). Aparato genital femenino, En: Wheater's. Histología funcional. 1970. 4ª ed. pp 341-350.

www.elsevierlibrary.es/product/wheaters-histologa-funcional

Younglai, E.V. (1986). Administration of GnRH in vivo stimulates progesterone and inhibition androgen accumulation by ovarian follicles isolated from pubertal rabbits. J. Steroid Biochem; 22: 91-96.

YoungLai EV, Byrne A. (1989). Opioidergic control of gonadotropin secretion in the female rabbit: divergent effects of morphine on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. Can J Physiol Pharmacol. Dec;67(12):1486-92.

Zamaratskaia Galia, Rydhmerb Lotta, Kristina Andersson, Chena H. Gang, S'éverine

Lowagie Andersson Kjell, Lundstrom Kerstin.(2008).Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on hormonal profile and behaviour of male pigs. Animal Reproduction Science; 108; 37–48.