

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

**Efecto de una vacuna recombinante anti-LH sobre la
espermatogénesis murina prepuberal.**

Trabajo de Investigación

Doménica Patricia Núñez Pérez

Medicina Veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Médico Veterinario

Quito, 2 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Efecto de una vacuna recombinante anti-LH sobre la espermatogénesis murina prepuberal.

Doménica Patricia Núñez Pérez

Nombre del profesor, Título académico

Rommel Lenin Vinueza DMVZ, M.Sc.

Calificación: _____/10.

Quito, 2 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Doménica Patricia Núñez Pérez

Código: 00130904

Cédula de identidad: 0604185538

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El control poblacional de ciertas especies animales ha sido un tema de gran interés durante muchos años a nivel mundial. Por este motivo, se ha investigado una técnica denominada inmunocostracción, como una estrategia alternativa a la técnica de castración quirúrgica tradicional. El propósito de esta investigación, fue determinar el efecto de una vacuna recombinante anti-LH para la inmunocostracción en roedores, así como las características del tejido testicular a nivel histopatológico y el comportamiento de los animales vacunados. Los animales fueron inyectados de forma subcutánea con 100 μ L de la vacuna recombinante anti-LH, la cual contiene un conjugado de una secuencia de LH y una proteína inmunogénica vectora (KLH) con adyuvante incompleto de Freund. La muestra estaba comprendida por un grupo de 16 ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus* BALB/c, dividida de forma aleatoria en dos subgrupos: grupo control ($n=8$) y grupo vacuna ($n=8$). En esta investigación, la vacuna recombinante no condujo a observar cambios significativos a nivel testicular, por lo tanto, no inhibe la espermatogénesis ni la pubertad de los animales sometidos al tratamiento. La presente investigación, toma importancia, porque se convierte en una herramienta valiosa para otros investigadores y estudios futuros, con el fin de establecer estrategias o protocolos más específicos, y así lograr la inmunocostracción deseada en esta y otras especies animales.

Palabras clave: Inmunocostracción, vacuna recombinante, anti-LH, roedores, tejido testicular, espermatogénesis, pubertad.

ABSTRACT

The population control of certain animal species has been a topic of great interest for many years worldwide. For this reason, a technique called immunocontraception has been investigated as an alternative strategy to the traditional surgical castration technique. The purpose of this research was to determine the effect of a recombinant anti-LH vaccine for immunocontraception in rodents, as well as the characteristics of testicular tissue at the histopathological level and the behavior of vaccinated animals. The animals were injected subcutaneously with 100 μ L of recombinant anti-LH vaccine, which contains a conjugate of an LH sequence and an incomplete Freund's adjuvant immunogenic vector protein (KLH). The sample was comprised of a group of 16 pre-puberty mice (15 days old) of the species *Mus musculus* BALB/c, randomly divided into two subgroups: control group ($n=8$) and vaccine group ($n=8$). In this research, the recombinant vaccine did not lead to significant changes at the testicular level, therefore, it does not inhibit spermatogenesis or puberty in the treated animals. The present research, takes importance, because it becomes a valuable tool for other researchers and future studies, to establish more specific strategies or protocols, and thus achieve the desired immunocontraception in this and other animal species.

Key words: Immunocontraception, recombinant vaccine, anti-LH, rodents, testicular tissue, spermatogenesis, puberty.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Manejo de animales de experimentación (aclimatación, alimentación, condiciones generales):	12
Elaboración de la vacuna recombinante anti-LH:	13
Vacunación, monitorización de los animales vacunados:	13
Sacrificio, recolección de muestras del tejido testicular de los animales vacunados:	14
Análisis histopatológico de las muestras de tejido testicular:	15
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXO A: PRUEBA ESTADÍSTICA REALIZADA EN EL PROGRAMA STARTICAL PRODUCT AND SERVICE SOLUTIONS (SPSS).....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Frecuencias observadas en el efecto de una vacuna recombinante anti-LH sobre la espermatogénesis de 16 ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie <i>Mus musculus</i>	19
Tabla 2: Presencia de espermatogénesis en los dos subgrupos de ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie <i>Mus musculus</i>	19

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Corte transversal de un testículo que pertenece a un ratón prepuberal (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*, el cual recibió adyuvante con buffer (sin conjugado). 17
- Figura 2:** Corte transversal de un testículo que pertenece a un ratón prepuberal (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*, el cual recibió la vacuna anti-LH. 18
- Figura 3:** Presencia y ausencia de la espermatogénesis en dos subgrupos de ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*. 18
- Figura 4:** Presencia de espermatogénesis obtenida vs espermatogénesis esperada en 16 ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*. 20

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, los esfuerzos humanos para controlar el comportamiento reproductivo de todo tipo de animales, ha representado un desafío (Palmer et al., 2018). El método más utilizado ha sido la castración quirúrgica, que se realiza de forma rutinaria a machos prepuberales con varios fines, como la disminución de olores asociados a la carne o la reducción de comportamientos agresivos (Palmer et al., 2018). Sin embargo, esta práctica puede ocasionar complicaciones graves, como infecciones microbianas y dolor inevitable en los animales. Por lo tanto, se ha sugerido un método alternativo a la castración quirúrgica tradicional, conocido como inmunocontracepción, el cual se basa en el desarrollo e implementación de técnicas farmacológicas seguras y poco dolorosas que involucran hormonas reproductivas (Park, Byung-Joo et al., 2017).

El mecanismo de la inmunocontracepción, consiste en activar el propio sistema inmune del animal, con el fin de generar anticuerpos contra las hormonas reproductivas endógenas, provocando su neutralización, como consecuencia, se crea una inhibición de la maduración testicular y la fertilidad en animales machos (Park, Byung-Joo et al., 2017).

Es importante mencionar que el regulador de la función reproductiva en las diferentes especies de mamíferos, es el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal y una de las hormonas sexuales más importantes es la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Song et al., 2012). La GnRH al ser una hormona hipotalámica, se encarga de estimular la liberación desde la hipófisis anterior de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), con el propósito de promover la maduración de la espermatogénesis en machos y los folículos ováricos en hembras (Song et al., 2012). La hormona luteinizante (LH), la cual es una glucoproteína heterodimérica, actúa sobre las células de Leydig en los testículos, siendo la

principal hormona reguladora de la secreción de testosterona, la cual se encarga de estimular la producción de los espermatozoides (Haschek et al., 2010).

Eski y sus colaboradores en el 2019, señalan que la vacuna recombinante anti-GnRH, es una alternativa efectiva a la castración quirúrgica en animales, sin embargo, no se menciona que una dosis única de la hormona LH, inhiba por completo la espermatogénesis en ratones prepuberales. Para una inmunización rápida y un efecto de inmunocastración a largo plazo, se desea un protocolo de dosis única (Ülker et al., 2009). La duración de la inmunización y la cantidad de dosis que se necesitan para generar el efecto deseado de la vacuna, se relacionan por el tipo de sistema de administración, el cual consiste en una liberación de antígeno y adyuvante de manera lenta (Eski & Alan, 2016).

Por otro lado, la vacuna recombinante anti-LH, se obtiene de la conjugación de una secuencia de LH y una proteína inmunogénica vectora (KLH) con adyuvante incompleto de Freund, la cual se espera que actúe inhibiendo la secreción de hormonas gonadotróficas, lo que conduce a generar una atrofia del tejido testicular, reducción de la espermatogénesis, conduciendo a la ausencia de comportamientos reproductivos. Se debe considerar el número de dosis de la vacuna anti-LH a ser inoculada en los animales, debido a que no todos los individuos responden de la misma forma (Eski et al., 2019).

Con todos los antecedentes, el presente estudio, tiene como objetivo determinar el efecto de una vacuna recombinante anti-LH sobre la espermatogénesis murina prepuberal (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*. Además, se analizará y observará histológicamente como la vacuna diseñada actúa en los tejidos testiculares de cada roedor.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología descrita a continuación se basó en la investigación de Miller, et al 2008, con modificaciones realizadas por Aponte, 2019.

Manejo de animales de experimentación (aclimatación, alimentación, condiciones generales):

Los ratones utilizados en este experimento, fueron roedores de la especie *Mus musculus*, BALB/c los cuales nacieron, se criaron y se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), durante dos meses. Para la realización de este estudio se contó con el correspondiente permiso del Comité de Ética en el uso de Animales de la USFQ. Las madres de los ratones al igual que los reproductores, se adquirieron desde la ciudad de Guayaquil, una vez que se obtuvieron los ratones, se colocó en cada caja de plástico dos hembras y un macho. Dentro de una semana, las hembras quedaron preñadas y después de 20 días nacieron sus crías. Cada hembra tuvo de 8 a 12 ejemplares. Una vez que los ratones nacieron, estos se mantuvieron con sus madres hasta la segunda semana de vida, después las madres fueron aisladas al igual que los machos reproductores. Para realizar esta investigación, se utilizaron 16 crías, los cuales eran machos prepuberales (edad 15 días) (Miller, et al., 2008).

Durante el estudio, se separaron en dos áreas las instalaciones del Bioterio del Instituto de Microbiología de la USFQ, el cual cuenta con una dimensión de 50 metros cuadrados. Las dos áreas separadas varían en tamaño de 20 a 25 metros cuadrados cada una. En la primera aérea, se mantuvieron a los ratones en cajas de almacenamiento de plástico transparente con tapa, estas cajas se colocaron en el segundo piso de una repisa de metal, con el fin de obtener las condiciones de aclimatación adecuadas. En las tapas de cada caja se colocó malla de alambre soldado (celdas 1cm), viruta (0,5 lb), 2 bebederos de plástico tipo tubo con dispensador

de 80ml y 2 recipientes de plástico para alimento con una capacidad de 20ml. Se utilizaron en total 4 cajas de almacenamiento de plástico transparente con tapa, dentro de las cuales se encontraba una población de 4 ratones (Miller, et al., 2008).

En la segunda área, se encontraba el dispensador de agua, dos muebles de madera, materiales de limpieza, balanceado para roedores, bebederos, pepas de girasol y viruta. En este experimento el agua y la comida fue provista de forma ad libitum, adicionalmente, pasando dos días en la mañana (9am), se colocaban 12 pepas de girasol en cada caja. Con lo que respecta a la limpieza, esta consistía en desechar y reemplazar la viruta usada por una limpia de cada una de las cajas, este cambio se realizó cada 4 días. Las actividades fueron registradas en una hoja con el nombre de la persona responsable y la fecha (Miller, et al., 2008).

Elaboración de la vacuna recombinante anti-LH:

Para la elaboración de la vacuna, se utilizó un conjugado de una secuencia de LH y una proteína inmunogénica vectora (KLH) con adyuvante incompleto de Freund, el cual se preparó como una formulación de vacuna inmuno anticonceptiva de una inyección en forma de emulsión. La proteína KLH se combinó con el péptido simultáneamente con gaseamiento con N₂ para evitar la oxidación de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas reaccionantes. Esta reacción tuvo una duración de 2 horas. Posteriormente, se mezcló este conjugado con el adyuvante en relación volumétrica 1:1 y se sometió por 3 minutos a vortex intenso a fin de emulsificar la vacuna, la cual fue administrada inmediatamente a los animales (Aponte, Cubas y Méndez, 2019).

Vacunación, monitorización de los animales vacunados:

Después de la elaboración de la vacuna, se dividió al grupo de 16 animales en dos subgrupos de forma aleatoria. El primer subgrupo que estaba conformado por 8 ratones (4 ratones en cada caja de plástico) recibió la vacuna anti-LH y el segundo subgrupo (control), el

cual estaba conformado por los otros 8 ratones (4 ratones en cada caja de plástico), recibió adyuvante con buffer (sin conjugado). Los animales fueron inoculados a las dos semanas de edad utilizando una jeringa de insulina. En este caso, se administró la vacuna de forma subcutánea en el pliegue dorsal del animal, cerca del cuello. Para realizar la inoculación, se sujetó al animal del pliegue cutáneo con el dedo índice y pulgar de forma horizontal sobre una superficie dura de apoyo, posteriormente, se introdujo la aguja, con una cantidad de 100 μ L en cada roedor (Miller, et al., 2008).

Una vez que los individuos fueron vacunados, se realizó la monitorización de cada animal, la cual consistía en revisar la presencia de efectos adversos que pudieran presentar los animales después de recibir la vacuna, como: decaimiento, pérdida de apetito, enrojecimiento o hinchazón del sitio de la punción o aumento o disminución de la zona testicular. Este monitoreo se realizó durante dos meses (Miller, et al., 2008).

Sacrificio, recolección de muestras del tejido testicular de los animales vacunados:

El sacrificio de los animales se llevó a cabo después de dos meses de la inoculación de la vacuna. Se ejecutó un método de sacrificio humanitario y poco doloroso, seguro para el animal y personal, el método que se usó fue el químico, donde se inoculó de forma intraperitoneal (el animal se colocó en decúbito supino), una cantidad de 0,2 ml del fármaco conocido como Euthanex. Posteriormente, se comprobó que el animal haya fallecido revisando sus constantes, en este caso el latido del corazón y comprobación de dolor profundo, una vez que se evidenció que el animal estaba completamente muerto, se procedió a colocar al roedor en decúbito dorsal y se ejecutó la disección (Veite-Schmahl et al., 2017).

Primero, se realizó un corte pequeño en la parte caudal del abdomen, con la ayuda de una tijera mayo recta, a partir de este corte se desprendió capa por capa la piel del ratón desde la parte más caudal hasta la craneal, sin dañar ningún órgano. Una vez que se retiró la piel y

grasa, se observaron los órganos (Veite-Schmahl et al., 2017). Después, con la ayuda del bisturí y las pinzas anatómicas, se extrajo de forma cuidadosa cada órgano, una vez que se extrajeron los órganos, se tomaron muestras con un tamaño aproximado de 5mm del corazón, hígado, pulmón, cerebro y lo más importante los testículos, con el fin de observar si existieron o no cambios a nivel histológico (espermatogénesis) o algún otro tipo de alteración patológica a causa de la vacuna en los demás órganos. Este procedimiento se realizó comprobando los órganos del subgrupo 1 con los órganos del subgrupo 2 (control). Cada muestra fue almacenada en tubos de 5ml con una cantidad de 2 ml de fijador de Bouin, con el fin de preservar la morfología de los órganos (Miller et al., 2008).

Análisis histopatológico de las muestras de tejido testicular:

Una vez que se obtuvieron las muestras de los testículos del fijador, estas fueron procesadas mediante una serie de pasos de deshidratación en alcoholes para su inclusión en parafina. El protocolo de deshidratación consistió en lo siguiente: etanol al 70% por 15 minutos (2 veces), etanol al 95% por 40 minutos (1 vez), etanol al 100% por 20 minutos (3 veces), xilol por 10 minutos, xilol por 5 minutos (2 veces), xilol: Paraplast (1:1) por 45 minutos, xilol: Paraplast (1:2) por 45 minutos, y Paraplast por 1 hora (2 veces). Finalmente, las muestras fueron infiltradas en parafina, donde se utilizó para su fijación casetes histológicos, además, las muestras se almacenaron a 4°C hasta la realización de cortes (5 µm de espesor) con la ayuda de un micrótopo. Los cortes de tejido fueron colocados en un baño de flotación a 40°C, para luego ser recolectados con un portaobjetos limpio previamente cubierto con polilisina (Miller, et al., 2008).

Para la remoción de la parafina de la muestra de tejido, se realizó otro lavado con alcoholes. El protocolo fue el siguiente: xilol por 3 minutos (3 veces), etanol 100% por 1 minuto y etanol 95% por 1 minuto. Se deshidrató el tejido con agua destilada por 3 minutos (2 veces), y posteriormente se realizó una tinción con Hematoxilina de Harris durante 15 segundos

exponiendo el tejido testicular al colorante. Se lavó el excedente de las láminas con agua destilada y se mantuvieron en agua corriente (chorro pequeño) durante 10 minutos para lograr la diferenciación del colorante. A continuación, las placas fueron deshidratadas nuevamente con etanol 95% por 1 minuto (2 veces), etanol 100% por 1 minuto (2 veces) y xilol por 1 minuto (3 veces). Después, se colocó dos gotas de medio de montaje sobre las muestras de tejido testicular en el portaobjetos, y se cubrió cuidadosamente con el cubreobjetos. Se dejó reposar las láminas durante 24 horas. Por último, se observó la morfología de los tejidos y estadio de la espermatogénesis por microscopía óptica a 10x y 40x (Miller, et al., 2008).

Todos los datos fueron registrados en hojas de papel bond, donde se proporcionó un valor de 1 a la espermatogénesis negativa y un valor de 2 a la espermatogénesis positiva. Después, las observaciones fueron tabuladas con la ayuda de una computadora en el programa Word, y posteriormente la prueba estadística se realizó en el programa Startical Product and Service Solutions (SPSS).

RESULTADOS

Después de observar la morfología de los tejidos y los estadios de la espermatogénesis por microscopía óptica se obtuvo lo siguiente:

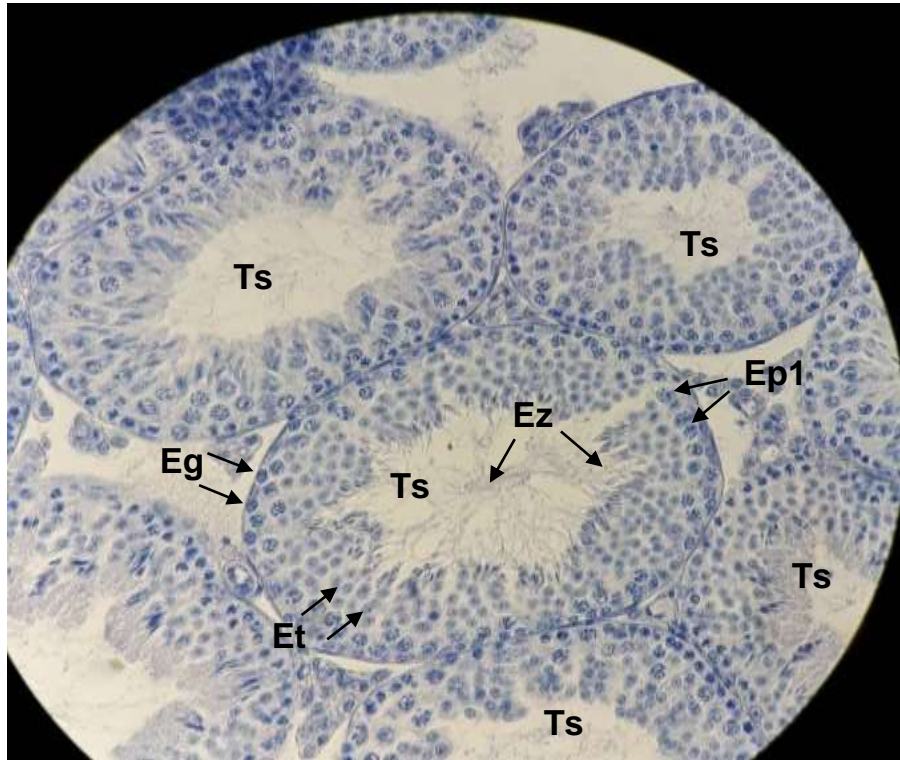


Figura 1: Corte transversal de un testículo que pertenece a un ratón prepuberal (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*, el cual recibió adyuvante con buffer (sin conjugado). Se pueden observar diferentes túbulos seminíferos (**Ts**), espermatogonias (**Eg**), espermatoцитos primarios (**Ep1**), espermátidas (**Et**) y espermatozoides (**Ez**). **Tinción:** Hematoxilina de Harris. 40X.

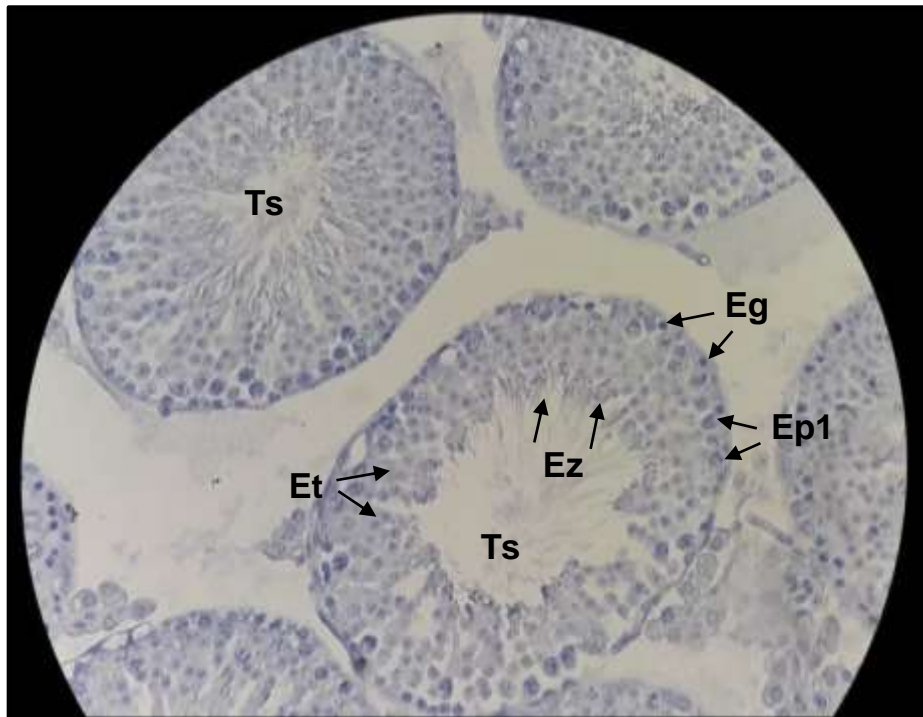


Figura 2: Corte transversal de un testículo que pertenece a un ratón prepuberal (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*, el cual recibió la vacuna anti-LH. Se pueden observar diferentes túbulos seminíferos (**Ts**), espermatogonias (**Eg**), espermátocitos primarios (**Ep1**), espermátidas (**Et**) y espermatozoides (**Ez**). **Tinción:** Hematoxilina de Harris. 40X.

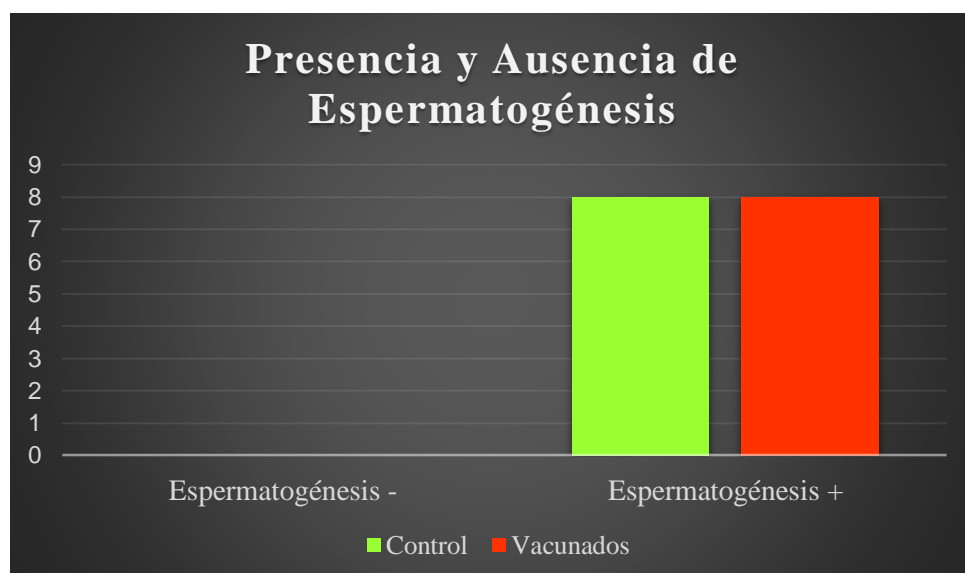


Figura 3: Presencia y ausencia de la espermatogénesis en dos subgrupos de ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*. La barra de color verde, corresponde al subgrupo de 8 ratones que recibió adyuvante con buffer (sin conjugado) y la barra de color tomate, representa al subgrupo de los otros 8 ratones que se inocularon con la vacuna anti-LH.

Tabla 1: Frecuencias observadas en el efecto de una vacuna recombinante anti-LH sobre la espermatogénesis de 16 ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*.

	Espermatogénesis +	Espermatogénesis -
Grupo vacuna	$\frac{8}{8} = 1$	$\frac{0}{8} = 0$
Grupo control	$\frac{8}{8} = 1$	$\frac{0}{8} = 0$

Tabla 2: Presencia de espermatogénesis en los dos subgrupos de ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*.

	Espermatogénesis +	Espermatogénesis -
Grupo vacuna	8	0
Grupo control	8	0

El primer subgrupo corresponde a los 8 animales que recibieron la vacuna y el segundo subgrupo corresponde a los otros 8 animales que recibieron adyuvante con buffer (sin conjugado).

Prueba Estadística:

Al ejecutar la prueba estadística (Chi cuadrado) en el programa conocido como Startical Product and Service Solutions (SPSS), se obtuvo un valor calculado de $P= 1$, es decir que todos los individuos se comportaron de la misma forma.

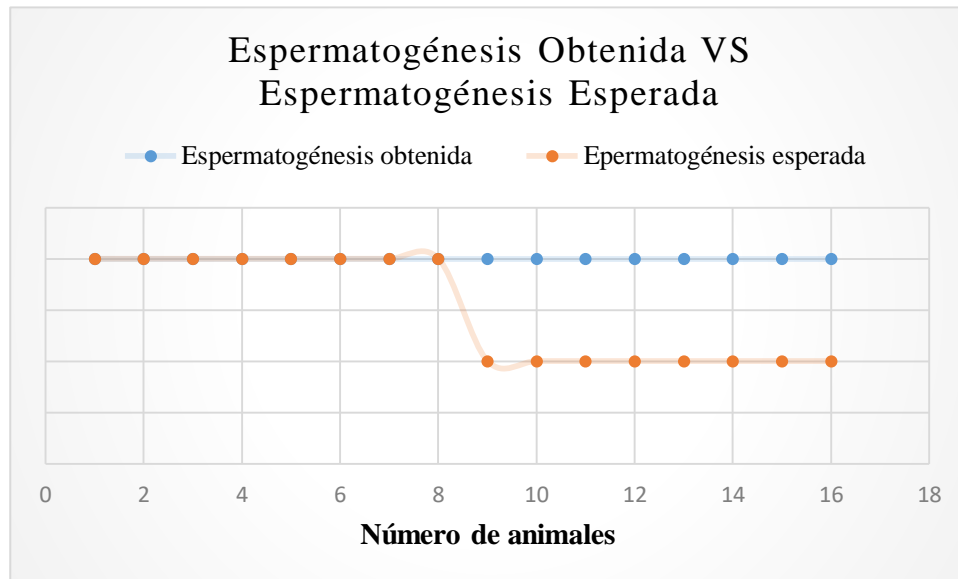


Figura 4: Presencia de espermatogénesis obtenida vs espermatogénesis esperada en 16 ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*. El color azul representa la espermatogénesis que se obtuvo al finalizar el experimento y el color tomate representa la espermatogénesis que se esperaba obtener al finalizar el experimento.

DISCUSIÓN

Durante algunas décadas, la actividad reproductiva de varios tipos de animales, especialmente de caninos, ha generado gran interés en los seres humanos (Kutzler & Wood, 2006) (Siel et al., 2020). La inmuno-castración, ha sido objeto de investigación, entre varias estrategias de control reproductivo, como un método alternativo a la castración quirúrgica, con el fin de controlar a las poblaciones animales (Palmer et al., 2018).

Por este motivo, se desarrolló en el presente estudio una vacuna recombinante immunocontraceptiva anti-LH, que contiene un conjugado de una secuencia de LH y una proteína inmunogénica vectora (KLH) con adyuvante incompleto de Freund. En este estudio, se valuó la inmunogenicidad de la vacuna recombinante anti-LH y sus efectos inhibitorios sobre los estadios de la espermatogénesis en un grupo de ratones macho prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*.

El examen histopatológico, señala que la vacuna recombinante anti-LH no inhibe el desarrollo de la espermatogénesis y pubertad, indicada por túbulos seminíferos bien desarrollados, presencia de espermatogonias, espermatocitos primarios, espermátidas y espermatozoides en los tejidos testiculares de ratones inmunizados y no inmunizados (Figura 1 y 2).

La inmunización al grupo de ratones que recibió la vacuna anti-LH, no condujo a observar un cambio a nivel testicular, ya que, los dos subgrupos (grupo 1, el cual recibió adyuvante con buffer, sin conjugado y grupo 2, el cual recibió la vacuna anti-LH) de ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*, mostraron presencia de espermatogénesis (Figura 3) y se corrobora con las frecuencias observadas, las cuales indican que 8 de los animales que recibieron la vacuna presentan espermatogénesis positiva y 8 de los

animales que no recibieron la vacuna, de igual forma presentan espermatogénesis positiva (Tabla 1 y 2).

Con respecto al valor de Chi^2 calculado, $P=1$, se indica que no hubo un cambio significativo entre el grupo 1 y el grupo 2 de ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*, esto confirma que los 16 individuos sometidos a investigación son fértiles al momento final del experimento (Anexo 1).

Por otro lado, el gráfico de dispersión (Figura 4), indica que al finalizar el experimento, se observaría que el grupo de 8 ratones que recibió la vacuna anti-LH, inhiba el acceso de la hormona LH a su receptor, lo que evitaría la secreción de testosterona, al no poder actuar en los testículos, específicamente sobre las células de Leydig y finalmente no se generarían espermatozoides. Esto se debe a que la testosterona afecta las fases finales de la espermatogénesis, particularmente la elongación durante la espermiogénesis (Fallah et al., 2019).

Autores como Han et al. (2016), obtuvieron resultados similares a los esperados en esta investigación, al aplicar a 36 ratas Sprague – Dawley machos jóvenes (4 semanas de edad) una vacuna con péptido de dímero en tándem GnRH, observando una expresión significativamente más baja del receptor de LH y receptor de FSH, lo que sugiere que la función de las células de Leydig y Sertoli dentro de los testículos se vio gravemente interrumpida, dando como resultado una supresión de la espermatogénesis testicular de las ratas inmunocastradas. De igual forma, observaron cambios histológicos significativos, donde los túbulos seminíferos mostraron un tamaño reducido y una inhibición de la espermatogénesis (disminución en el número de espermatogonias, espermatoцитos primarios y espermatozoides maduros) (Han et al., 2016).

El hecho de no haber logrado inactivar o inhibir la espermatogénesis en ratones prepuberales (15 días de edad) de la especie *Mus musculus*, puede estar asociada a los aspectos

menos controlados en este experimento, ya que la reacción a una vacuna puede estar influenciada por diversos componentes ambientales e individuales como la nutrición, la edad, la genética, el estrés, y la exposición a enfermedades virales, bacterianas, entre otras (Siel et al., 2020).

Otra de las causas, puede estar asociada a la creación de la vacuna, debido a que varios estudios publicados hace más de 20 años por Ladd et al. (1994), mencionan que para generar anticuerpos contra LH, el péptido debe acoplarse a una proteína grande. Durante este tiempo hasta la actualidad, se han utilizado varias proteínas como la proteína inmunogénica transportadora de hemocianina de lapa californiana (KLH), la cual muestra ser segura en animales y no causa efectos adversos (Ding et al., 2018). Pero en muchos casos, se señala que la mayoría de la producción de anticuerpos resultante se dirige a la proteína transportadora y no al péptido. Por lo tanto, las vacunas necesitarían una dosis de refuerzo primario y otras dosis para provocar una respuesta a largo plazo (Miller et al., 2008).

En el conjugado utilizado en el presente experimento, no se confirma con certeza que la proteína KLH permaneció intacta durante su creación, debido a que no se utilizó un tampón estabilizador, por este motivo, Miller et al. (2008), mencionan en su estudio utilizar un tampón estabilizador y un péptido GnRH, el cual se ajuste a la superficie de la molécula transportadora, con el fin de que los anticuerpos generen una respuesta fuerte a un péptido no inmunogénico el cual sea habitualmente pequeño.

Otro factor importante a tomar en cuenta, es la persistencia a lo largo del tiempo de la respuesta anticonceptiva, la cual según Miller et al. (2008), está asociada a la inoculación del antígeno en forma de emulsión, lo que se corrobora con lo que se realizó en la presente investigación.

Según los autores, Burakova et al. (2018), la emulsión se debe preparar a 4 ° C, con el fin de conseguir estabilidad durante meses o años, debido a que, si la emulsión no se prepara con el cuidado necesario, puede empezar a disolverse en unas semanas impidiendo la efectividad de la vacuna a largo plazo. Sin embargo, en el presente estudio, se administró la vacuna al momento de ser preparada. También señalan que, la capacidad de diseñar una emulsión estable, puede estar relacionada con el suministro de inyección en el sitio adecuado, para generar la liberación lenta del antígeno (Burakova et al., 2018).

Aunque la liofilización del conjugado de una secuencia de LH y una proteína inmunogénica vectora (KLH) con adyuvante incompleto de Freund, en forma de emulsión no proporciona un efecto en la inhibición de espermatogénesis o funciona como anticonceptivo, en ratones macho prepuberales (edad 15 días), Miller et al. (2008) y Rosenfield et al. (2019), señalan que la inmunización de liofilizado puede ser eficaz si se suministra en varias dosis y en dos tipos diferentes de disparo como se realiza en fauna silvestre.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con las evidencias anteriores, se demostró que la mayoría de las vacunas realizadas a base de la hormona GnRH, obtuvieron una disminución significativa de la espermatogénesis en ratones prepuberales, sin embargo, el presente trabajo demostró que la vacuna realizada a base de un conjugado de una secuencia de LH y una proteína inmunogénica vectora (KLH) con adyuvante incompleto de Freund de dosis única, no inhibe la espermatogénesis murina prepuberal, por lo tanto no se logró un efecto de contracepción. Se necesitan nuevos estudios para establecer una dosis única óptima de la hormona anti-LH, la vía de administración adecuada, la estabilidad de la vacuna o la utilización de vacunas a base de GnRH, combinadas o no con fragmentos de LH, para la supresión completa de la espermatogénesis en varias especies animales.

En estudios futuros, se recomienda generar condiciones ambientales más estrictas en los individuos sometidos a investigación, como señalan Han et al. (2016) en su estudio, donde alojaron a los roedores de forma individual a una humedad relativa del 50% –60%, luz de 12 h / 12 h ciclo oscuro y acceso al agua del grifo con un ambiente controlado a una temperatura de 21 ± 1 °C.

También se recomienda definir el funcionamiento exacto de hormonas como la GnRH y otras hormonas como la testosterona y las gonadotropinas LH y FSH, las cuales se encuentran involucradas de forma directa por la inmunocastración y ciertas variaciones podrían facilitar más información sobre los efectos immunocontraceptivos de esta vacuna (Donovan et al., 2012). Además, se menciona formular nuevas vacunas con diferentes dosis de proteínas GnRH, otro tipo de proteínas transportadoras o adyuvantes más potentes, los cuales puedan aplicarse a los animales de manera segura, con la expectativa de obtener mejores resultados (Kim et al., 2019).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aponte, P., Cubas, C., & Méndez, MA. (2019). Immunoinformatic design for the development of a contraceptive multi-epitope subunit vaccine*. International work-conference on Bioinformatics and biomedical engineering Proceedings Extended abstracts. 8-10 May, 2019. Granda (SPAIN).
- Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J. R., & Shi, J. (2018). Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunology*, 31(1), 11-22.
- Ding, X., Li, H., Li, Y., Huang, D., & Xiong, C. (2018). Two B-cell epitope vaccines based on uPA effectively inhibit fertility in male mice. *Vaccine*, 36(19), 2612-2618.
- Donovan, C. E., Greer, M., & Kutzler, M. A. (2012). Physiologic Responses Following Gonadotropin-Releasing Hormone Immunization in Intact Male Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s6), 403-405.
- Eski, F., Alan, M. (2016). An experimental study on the immunocontraceptive efficacy of a single dose GnRH vaccine in female rats. 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress. October 26-28, 2016, Adana. Paper ID: 731, 2541-2550. (In Turkish)
- Eski, F., Mis, L., Tasal, I., Uslu, B. A., & Comba, B. (2019). Investigation of the immunocastration efficacy and longevity of a single-dose GnRH vaccine in young male rats. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(7), 12.
- Fallah, H. P., Tovo-Neto, A., Yeung, E. C., Nóbrega, R. H., & Habibi, H. R. (2019). Paracrine/autocrine control of spermatogenesis by gonadotropin-inhibitory hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 492, 110440.
- Han, X.-F., Li, J.-L., Zhou, Y.-Q., Ren, X.-H., Liu, G.-C., Cao, X.-H., Du, X.-G., & Zeng, X.-Y. (2016). Active immunization with GnRH-tandem-dimer peptide in young male rats reduces serum reproductive hormone concentrations, testicular development and spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology*, 18(3), 485-491.
- Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., & Wallig, M. A. (2010). Male Reproductive System. En *Fundamentals of Toxicologic Pathology* (pp. 553-597). Elsevier.
- Kim, Y.-H., Park, B.-J., Ahn, H.-S., Han, S.-H., Go, H.-J., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Song, C.-S., Lee, S.-W., & Choi, I.-S. (2019). Immunocontraceptive Effects in Male Rats

- Vaccinated with Gonadotropin-Releasing Hormone-I and -II Protein Complex. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 658-664.
- Kutzler, M., & Wood, A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66(3), 514-525.
- Ladd, A., Tsong, Y.-Y., Walfield, A. M., & Thau, R. (1994). Development of an Antifertility Vaccine for Pets Based on Active Immunization against Luteinizing Hormone-Releasing Hormone1. *Biology of Reproduction*, 51(6), 1076-1083.
- Miller, L. A., Gionfriddo, J. P., Fagerstone, K. A., Rhyan, J. C., & Killian, G. J. (2008). ORIGINAL ARTICLE: The Single-Shot GnRH Immunocontraceptive Vaccine (GonaCon™) in White-Tailed Deer: Comparison of Several GnRH Preparations: SINGLE-SHOT GNRH IMMUNOCONTRACEPTION IN WHITE-TAILED DEER. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(3), 214-223.
- Palmer, C., Pedersen, H. G., & Sandøe, P. (2018). Beyond Castration and Culling: Should We Use Non-surgical, Pharmacological Methods to Control the Sexual Behavior and Reproduction of Animals? *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 31(2), 197-218.
- Park, Byung-Joo, Kim, Yong-Hyun, Ahn, Hee-Seop, Han, Sang-Hoon, Go, Hyeon-Jeong, Lee, Joong-Bok, Park, Seung-Yong, Song, Chang-Seon, Lee, Sang-Won, & Choi, In-Soo. (2017). Evaluation of immunocontraceptive vaccine composed of gonadotropin-releasing hormone conjugated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in male rats. *대한수의학회지*, 57(3), 155-158.
- Rosenfield, D. A., Nichi, M., Losano, J. D. A., Kawai, G., Leite, R. F., Acosta, A. J., Baquero, O. S., & Pizzutto, C. S. (2019). Field-testing a single-dose immunocontraceptive in free-ranging male capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*): Evaluation of effects on reproductive physiology, secondary sexual characteristics, and agonistic behavior. *Animal Reproduction Science*, 209, 106148.
- Siel, D., Ubilla, M. J., Vidal, S., Loaiza, A., Quiroga, J., Cifuentes, F., Hardman, T., Lapierre, L., Paredes, R., & Sáenz, L. (2020). Reproductive and Behavioral Evaluation of a New Immunocastration Dog Vaccine. *Animals*, 10(2), 226.
- Song, Y., Kim, D., Nam, H., Lee, J., Park, S., Song, C., Seo, K., Kim, H., & Choi, I. (2012). Evaluation of the Efficacy of Immunocastration Vaccine Composed of Gonadotrophin-

releasing Hormone Conjugated with Salmonella typhimurium Flagellin in Rats: Evaluation of the Efficacy of Immunocastration Vaccine. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4), e47-e50.

Ülker, H., Küçük, M., Yılmaz, A., Yörük, M., Arslan, L., deAvila, D., & Reeves, J. (2009). Changes in Testicular Development, Ultrasonographic and Histological Appearance of the Testis in Buck Kids Immunized Against LHRH Using Recombinant LHRH Fusion Protein. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(1), 37-43.

Veite-Schmahl, M. J., Regan, D. P., Rivers, A. C., Nowatzke, J. F., & Kennedy, M. A. (2017). Dissection of the Mouse Pancreas for Histological Analysis and Metabolic Profiling. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 126.

**ANEXO A: PRUEBA ESTADÍSTICA REALIZADA EN EL PROGRAMA
STARTICAL PRODUCT AND SERVICE SOLUTIONS (SPSS).**

A	B	C	D	E	F	G	
Case Processing Summary							
	Cases						
	Valid				Total		
	N				N	Percent	
Tto * Spermatogenesis	16	100,0%	0	0,0%	16	100,0%	
Tto * Spermatogenesis Crosstabulation							
Count							
		Spermatogenesis	Total				
		2,00					
Tto	1,00	8	8				
	2,00	8	8				
Total		16	16				
Chi-Square Tests							
	Value						
Pearson Chi-Square	. ^a						
N of Valid Cases	16						
a. No statistics are computed because Spermatogenesis is a constant.							

Valor de χ^2 calculado, $P=1$.