

Efecto de la inmunización contra testosterona sobre las características testiculares de toros Cebú

Effects of immunization against testosterone on testicular characteristics of Zebu bulls

Héctor Jiménez-Severiano^a, Tomás Arturo González-Orozco^b, Marcelino Menéndez-Trejo(†)

RESUMEN

El objetivo fue conocer el efecto de la inmunización contra testosterona en toros prepúberes, sobre el tamaño testicular y la producción espermática durante la edad adulta. Se usaron toros encastados de Cebú (n= 4 por grupo) que habían sido inmunizados antes de la pubertad contra ovoalbúmina (OVO), o con 5 mg (T5) o 10 mg (T10) de un conjugado de testosterona y ovoalbúmina. Toros sin inmunizar fueron usados como grupo testigo. A los 29 meses de edad se les midió la circunferencia escrotal (CE) y se evaluó la calidad seminal. Se colectaron los testículos y epidídimos de cada animal, se registró el peso de cada órgano y del parénquima testicular. Los testículos fueron procesados para estudios histológicos y para la estimación de la producción espermática diaria. Los toros del grupo T5 tuvieron una mayor CE y mayor peso testicular y del parénquima ($P < 0.05$) que el grupo testigo. La producción espermática por gramo de parénquima y total fue mayor ($P < 0.05$) en los toros del grupo T5, comparado con los del grupo testigo. No hubo diferencia entre grupos ($P > 0.05$) en el peso de los epidídimos, la densidad de células de Leydig, el diámetro de los túbulos seminíferos, las características seminales y las concentraciones de LH y testosterona. Se concluye que la inmunización contra testosterona, con la dosis baja del inmunógeno en toros prepúberes aumentó el tamaño testicular y la producción espermática en el animal adulto sin afectar la calidad seminal y el crecimiento corporal.

PALABRAS CLAVE: Toros, Inmunización contra testosterona, Producción espermática, Función testicular, Cebú.

ABSTRACT

The primary aim of this study was to evaluate the testicular size and sperm production in adult bulls, immunized against testosterone during the prepubertal age. Zebu crossbred bulls (n=4 per group) were immunized prepubertally with ovalbumin (OVA), or with 5 mg (T5), or 10 mg (T10) of a testosterone-ovalbumin conjugate. Non-immunized bulls were used as a control group. At castration (29 months of age), the scrotal circumference (SC) was recorded and seminal quality was evaluated. Testes and epididymides were collected from each bull, and their weight recorded, as well as the testis parenchyma weight. Testicular tissue samples were collected for histology studies and daily sperm production quantification. Bulls from T5 group had larger SC ($P < 0.05$) and greater testis and parenchyma weight ($P < 0.05$) than bulls in control group. Daily sperm production per gram of testicular parenchyma and per paired testes was greater ($P < 0.05$) in bulls from T5 group, compared with control bulls. Differences were not significant among groups ($P > 0.05$) for epididymis weight, Leydig cell density, diameter of seminiferous tubules, semen characteristics, and LH and testosterone concentrations. In conclusion, immunization with the small dose of the testosterone-ovalbumin conjugate in prepubertal bulls increased testicular size and daily sperm production in the adult animal, with no apparent effect on seminal quality and body weight.

KEY WORDS: Bulls, Immunization against testosterone, Daily sperm production, Testicular function, Zebu.

Las hormonas esteroides producidas en los testículos controlan la secreción de las gonadotropinas LH y

Steroid hormones produced in the testes control the secretion of the gonadotropins, LH and FSH, by

Recibido el 27 de agosto de 2001 y aceptado para su publicación el 23 de enero de 2002.

^a Centro Nacional de Investigación en Fisiología Animal, INIFAP-SAGARPA. Apartado Postal 2-29, Querétaro, Qro. CP 76020, México. Tel. (01 419) 292 0036, Fax (01 419) 292 0033. jimenez@fisio.inifap.conacyt.mx. Correspondencia y solicitud de separatas.

^b Campo Experimental Las Margaritas, INIFAP-SAGARPA.

† q.e.p.d.

FSH de la glándula pituitaria, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa; cuando por alguna razón se reducen las concentraciones plasmáticas de estos esteroides, también se reduce el control negativo sobre la secreción de gonadotropinas y se permite una mayor secreción de éstas⁽¹⁾. Por ejemplo, en animales castrados unilateralmente, la reducción de la retroalimentación negativa induce un incremento en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y sus receptores a nivel testicular, lo cual induce una mayor estimulación de la gónada remanente, con la subsiguiente hipertrofia e hiperplasia de la misma^(2,3).

En animales inmunizados contra testosterona, se crea una deficiencia aparente de testosterona circulante, ya que esta hormona es bloqueada por los anticuerpos específicos y la fracción libre (biológicamente activa) es reducida⁽⁴⁾, con lo que se disminuye la retroalimentación negativa hacia el hipotálamo y la glándula pituitaria, lo cual permite una mayor secreción y aumento de las concentraciones plasmáticas de LH y FSH⁽⁵⁾, a pesar del marcado incremento de las concentraciones circulantes de testosterona total⁽⁴⁾. En estudios previos, se ha encontrado que la inmunización contra testosterona puede inducir aumento del tamaño testicular y la producción espermática en toros jóvenes entre 12 y 18 meses de edad^(6,7) o sólo aumento del tamaño testicular en conejos⁽⁸⁾, sin deterioro aparente de la calidad seminal^(6,7) ni de la conducta sexual⁽⁹⁾.

Los hallazgos anteriores sugieren que es posible aumentar la producción espermática mediante la inmunización contra testosterona u otros esteroides sexuales⁽⁶⁾. Adicionalmente, esto podría ser benéfico para acelerar el desarrollo testicular y reducir la edad a la pubertad, principalmente en toros de razas cebuínas, cuyo desarrollo sexual es más lento que en toros de razas europeas. Por lo tanto, el objetivo de este experimento fue estudiar los efectos de la inmunización activa contra testosterona durante la etapa prepuberal, sobre las características testiculares y la producción espermática después de la pubertad de toros Cebú. Las observaciones hechas durante el período de inmunización en estos animales han sido descritas anteriormente⁽¹⁰⁾.

the pituitary gland through a negative feedback mechanism. When for any reason plasma concentrations of these steroids are reduced, the negative control on the secretion of gonadotropins is also reduced, allowing a greater secretion of them⁽¹⁾. For example, in unilaterally castrated animals the reduction of the negative feedback induces an increase in plasma concentrations of gonadotropins and their receptors in the testis. This induces a greater stimulation of the remaining gonad with the subsequent hypertrophy and hyperplasia^(2,3).

In animals immunized against testosterone, an apparent deficiency of circulating testosterone is created, because the specific antibodies block this hormone and the free fraction (biologically active) is reduced⁽⁴⁾. With this, the negative feedback towards the hypothalamus and pituitary is reduced which allows a greater secretion and, therefore, increase of plasma concentrations of LH and FSH⁽⁵⁾ even though there is a dramatic increase of the circulating concentrations of total testosterone⁽⁴⁾. Previous studies have indicated that the immunization against testosterone can induce an increase in testis size and sperm production in young bulls between 12 and 18 months of age^(6,7). Also in rabbits only the increase in testis size was observed⁽⁸⁾, without detrimental effects on semen quality^(6,7) or sexual behavior⁽⁹⁾.

The aforementioned findings suggest the possibility of increasing sperm production by immunization against testosterone or other sexual steroids⁽⁶⁾. Additionally this could be beneficial to hasten testis development and to reduce the age at puberty, mainly in Zebu bulls, whose sexual development is slower than in European breeds. Therefore the objective of this experiment was to study the effects of active immunization against testosterone during the prepuberty age on the testis characteristics and sperm production after puberty in Zebu bulls. The observations made during the immunization period on these animals have been described before⁽¹⁰⁾.

The study was performed in the Experimental Station "Las Margaritas", in the State of Puebla, Mexico. Sixteen crossbred Zebu bulls (3/4 *B. indicus*, mainly Indobrasil and 1/4 *B. taurus* Angus, Charolais,

El estudio se llevó a cabo en el campo experimental "Las Margaritas", en el estado de Puebla, México. Se usaron 16 toros encastados de Cebú (3/4 *B. indicus*, principalmente Indobrasil y 1/4 *B. taurus*, Angus o Charolais o Hereford o Suizo Pardo). Cuando los toros eran prepúberes, lo cual fue corroborado por la ausencia de espermatozoides en el eyaculado y el pobre desarrollo testicular (promedios de 12 meses de edad, 189 kg de peso corporal y 18.6 cm de circunferencia escrotal), fueron distribuidos homogéneamente en cuatro grupos (n = 4 por grupo) y cada grupo fue asignado al azar a los siguientes tratamientos: grupo testigo, sin tratamiento; inmunización con 10 mg de ovoalbúmina (OVO); inmunización contra testosterona con 5 mg del conjugado testosterona 3-(O-carboximetil)oxima:ovoalbúmina (T5) e inmunización con 10 mg del mismo conjugado (T10). Los toros de los grupos T5 y T10 recibieron solamente una inmunización de refuerzo 10 semanas después de la inmunización primaria cuando tenían como promedio 14.5 meses de edad. Los detalles del método de inmunización, la respuesta inmune contra testosterona y la alimentación durante este período han sido descritos anteriormente⁽¹⁰⁾.

Aproximadamente 14.5 meses después de la última inmunización, es decir, cuando los toros tenían en promedio 29 ± 0.2 meses de edad se les midió la circunferencia escrotal (CE), el peso corporal y se tomaron, mediante electroeyaculación, dos muestras de semen a cada uno en días consecutivos, para evaluar el volumen, el porcentaje de motilidad progresiva y la concentración espermática por mililitro y por eyaculado; para su análisis estadístico se tomó el promedio de estas dos muestras como representativa de cada característica seminal de cada toro. Adicionalmente se colectó una muestra de sangre de cada toro para medir las concentraciones de LH y testosterona en el suero. Posteriormente, los animales fueron castrados en forma quirúrgica, con anestesia local; los testículos y epidídimos fueron liberados de todo el tejido conectivo que los rodeaba y se registró el peso de cada órgano por separado.

Del testículo derecho se tomaron muestras de aproximadamente 1 cm³ de la parte media del

Hereford or Brown Swiss) were used. When bulls were pre-pubertal, which was corroborated by the absence of sperm cells in the ejaculate and poor testis development (average 12 months of age, 189 kg weight and 18.6 cm of scrotal circumference), they were homogeneously distributed into four groups (n= 4 per group). Each group was assigned randomly to one of the following treatments: control group, without treatment; immunization with 10 mg of ovalbumin (OVA); immunization against testosterone, with 5 mg of the testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime:ovalbumin conjugate (T5), and immunization with 10 mg of the same conjugate (T10). Bulls of groups T5 and T10 received only one booster immunization at 10 weeks after the primary immunization, when they had an average of 14.5 months of age. The details of the immunization method, the immune response against testosterone and the feeding during this period have been described before⁽¹⁰⁾.

Approximately 14.5 months after the last immunization (i.e., at 29 ± 0.2 months of age), the scrotal circumference (SC) and body weight were recorded. In addition, two semen samples from each bull were obtained in consecutive days by electroejaculation. Semen samples were evaluated for volume, percentage of progressive motility and sperm concentration per milliliter and per ejaculate. For the statistical analysis we used the average of the two samples as representative of the seminal characteristics of each bull. Additionally a single blood sample was collected from each bull to determine serum concentrations of LH and testosterone. Bulls were surgically castrated under local anesthesia; testes and epididymides were trimmed of excessive connective tissue and weighed separately.

Samples of approximately 1 cm³ were taken from the middle area of the right testis and fixed in Bouin solution. After 24 hours of fixation, samples were washed four times with 50 % ethanol for 90 minutes each, and kept in 10 % formalin until processing by routine dehydration techniques and embedding in paraffin wax. Tissue sections of 5 ¼m were taken from each sample and stained with hematoxylin and eosin. Sections were observed

órgano y se fijaron en solución de Bouin durante 24 h, después de lo cual fueron lavadas con etanol al 50 % durante 90 min cuatro veces, y mantenidas en formalina al 10 % hasta su procesamiento por técnicas de histología de rutina para ser embebidas en bloques de parafina; se hicieron cortes del tejido de 5 ¼m de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las laminillas fueron observadas en un microscopio óptico, con un ocular con escala micrométrica calibrada; de cada laminilla se contó el número de células de Leydig presentes en 25 campos a un aumento de 400x, distribuidos en todo el corte y se calculó la densidad de células de Leydig, definida como el número de células por mm². Además, se midió el diámetro de 50 túbulos seminíferos cortados transversalmente y distribuidos en todo el corte.

Para la estimación de la producción espermática diaria, se utilizó el testículo izquierdo, al cual se le retiró la túnica albugínea y se registró el peso del parénquima testicular. Éste se mantuvo en congelación, inicialmente a -76 °C para su transporte y después a -10 °C hasta su procesamiento. Posteriormente se descongeló el parénquima y se estimó la producción espermática diaria por gramo de parénquima y la producción espermática diaria total, mediante el conteo de espermátides en parénquima homogeneizado⁽¹¹⁾. Se tomaron 20 g de parénquima testicular de cada animal, los cuales fueron aforados a un volumen final de 200 ml con solución salina fisiológica con 0.05 % de Tritón X-100 y homogeneizados durante 1 min en un semi-micro homogeneizador de laboratorio (modelo 700, Waring Laboratory Science, Torrington, CT). Se hizo el conteo de núcleos celulares por duplicado con un hemocitómetro, en un microscopio de contraste de fases y se utilizó un divisor de tiempo de 5.11⁽¹²⁾ para estimar la producción espermática diaria por gramo de parénquima testicular y total de los dos testículos.

Las concentraciones de LH fueron determinadas por duplicado con un RIA heterólogo de doble anticuerpo específico para LH bovina⁽¹⁰⁾, incluyendo todas las muestras en un solo ensayo. El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor al 6 % y la sensibilidad fue 0.28 ng/ml. Para la determinación

under an optical microscope with a calibrated measuring eyepiece. From each section, the Leydig cells present in 25 fields at 400X magnification distributed along the tissue sample were counted and cell density was calculated, defined as the number of Leydig cells per mm². Additionally, 50 circular seminiferous tubules cross-sections distributed along the tissue were selected and their diameter recorded.

The tunica albuginea was detached from the left testis. Parenchymal tissue was weighed and kept frozen at -76 °C for transportation and then at -10 °C until processing for daily sperm production, by counting the number of spermatids in testicular homogenates⁽¹¹⁾. Samples of testicular parenchyma (20 g) from each bull were thawed and immersed in saline with 0.05 % of Triton X-100, at a final volume of 200 ml, and homogenized during 1 min in a semi-micro blender (model 700, Waring Laboratory Science, Torrington, CT). Spermatid nuclei were counted by duplicate with a hemacytometer through a phase contrast microscope. A time divisor of 5.11⁽¹²⁾ was used to calculate daily sperm production per gram of parenchyma and per paired testes.

Serum concentrations of LH were determined in duplicate with a heterologous double antibody RIA⁽¹⁰⁾ specific for bovine LH. All the samples were included in a single assay. The intraassay coefficient of variation was less than 6 % and the sensitivity was 0.28 ng/ml. Testosterone concentration was determined with a solid phase RIA (Coat -A-Count, Diagnostic Products Company, Los Angeles, CA). The intraassay coefficient of variation was less than 2 % and the sensitivity was 0.2 ng/ml.

Data were analyzed as a completely randomized design, using the GLM procedure of the SAS⁽¹³⁾. Scrotal circumference at the beginning of the treatment was used as a covariable for SC, testis and parenchyma weight; the linear and quadratic effects of the body weight at the moment of castration were used as covariables for sperm production per gram and total. Least square means comparisons were made using the PDIF option of the GLM⁽¹³⁾.

de testosterona se usó un RIA de fase sólida (Coat-A-Count, Diagnostic Products Company, Los Angeles, CA). El coeficiente de variación intra ensayo fue menor al 2 % y la sensibilidad fue 0.2 ng/ml.

Los datos fueron analizados en un diseño completamente al azar, usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS⁽¹³⁾, tomando en cuenta las siguientes covariables: para la CE, el peso testicular y el peso del parénquima testicular se usó la CE al momento de aplicar los tratamientos; para la producción espermática por gramo y total se usó el efecto lineal y cuadrático del peso corporal al momento de la castración. Cuando se detectaron diferencias entre tratamientos se usó la opción PDIF del GLM⁽¹³⁾ para comparar las medias de cuadrados mínimos. Por considerarse que el grupo OVO se comportaría en forma similar al grupo testigo, pues ninguno de los dos grupos generó anticuerpos contra testosterona⁽¹⁰⁾ se compararon estos dos grupos juntos contra T5 o contra T10.

No se detectaron diferencias ($P > 0.05$) en el peso corporal de los toros de los cuatro grupos (Cuadro 1). La CE de los toros del grupo T5 fue mayor ($P < 0.05$) que en los toros del grupo testigo y que OVO+ testigo (datos no presentados). No hubo diferencia en el peso de los testículos derecho e izquierdo, ni entre los dos epidídimos, por lo cual para hacer el análisis se tomó el peso total de

Because we expected that group OVA would respond in a similar way than the control group, due to the fact that none of them produced antibodies against testosterone⁽¹⁰⁾, comparisons were also made between these two groups together against T5 or T10 groups.

No differences in body weight were detected ($P > 0.05$) among treatment groups (Table 1). Scrotal circumference of bulls in the T5 group was greater ($P < 0.05$) than in bulls of the control group and those of the OVA+ control (data not shown). There was no difference in weight between the right and the left testis, nor between both epididymides, so for the statistical analysis the paired weight for each organ was used. Paired testis and parenchymal weights were greater in group T5 than in control and T10 groups, and greater than the OVA+ control ($P < 0.05$, data not shown). Paired epididymis weight was similar in the four groups with an overall average of 33.5 ± 1.47 g.

Semen data from one bull from group T10 were discarded (Table 2) because no semen sample could be obtained in several tries done during the two sampling days. No differences were detected among groups ($P > 0.05$) for any of the semen characteristics and the variation within group was large. The overall averages were: volume, 3.7 ± 0.3 ml; concentration, $297 \pm 57 \times 10^6$ spermatozoa/ml; $1,339 \pm 334$ x

Cuadro 1. Promedios (\pm EE) del peso corporal, y medidas de los testículos y epidídimos de toros sin inmunizar e inmunizados con 10 mg de ovoalbúmina, con 5 mg ó 10 mg de testosterona 3-(O-carboximetil) oxima:ovoalbúmina^a

Table 1. Average body weights (\pm EE), and testis and epididymis measurements in non immunized (control) and immunized bulls with 10 mg of ovalbumin (OVA), with 5 mg (T5) or 10 mg (T10) of testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime:ovalbumin^a

Group ^b	Body weight (kg)	Scrotal circumference (cm)	Weight of both organs (g)		
			Testis	Parenchyma	Epididymis
Control	392 \pm 12.9	29.4 \pm 1 ^d	330 \pm 44 ^d	310 \pm 38 ^d	30.3 \pm 2.9
OVA	424 \pm 12.8	31.4 \pm 1 ^{cd}	408 \pm 44 ^{cd}	374 \pm 38 ^{cd}	34.6 \pm 2.9
T5	409 \pm 12.8	33.4 \pm 1 ^c	490 \pm 44 ^c	446 \pm 38 ^c	35.1 \pm 2.9
T10	412 \pm 12.7	30.6 \pm 1 ^{cd}	349 \pm 44 ^d	323 \pm 38 ^d	34.2 \pm 2.9

^a The observations were made at 29 months of age, the treatments were applied at 12 months of age.

^b Four bulls per group

^{c,d} Means in each column without a common letter are different ($P < 0.05$).

ambos lados para cada órgano. Los pesos de los testículos y del parénquima testicular fueron mayores en el grupo T5 que en los grupos testigo y T10 y mayor que en OVO+ testigo ($P < 0.05$; datos no presentados), mientras que el peso de los epidídimos fue similar en los cuatro grupos, con un promedio general de 33.5 ± 1.47 g.

Para el análisis de las características seminales (Cuadro 2) se descartaron los datos de un animal del grupo T10, porque no pudo obtenerse una muestra de semen en varios intentos realizados en los dos días de muestreo. No se detectaron diferencias entre grupos ($P > 0.05$) para ninguna de estas características y la variación individual fue muy grande. Los promedios generales fueron: volumen, 3.7 ± 0.3 ml; concentración, $297 \pm 57 \times 10^6$ espermatozoides/ml; $1,339 \pm 334 \times 10^6$ espermatozoides/eyaculado y 42 ± 5 % de motilidad progresiva. La producción espermática diaria (Cuadro 3) por gramo de parénquima testicular y total fue mayor en el grupo T5 y menor en el grupo T10 ($P < 0.05$), comparada con los grupos testigo y OVO. Además, fue mayor en T5 que en OVO+ testigo ($P < 0.01$; datos no presentados). No se detectaron diferencias entre grupos para la densidad de células de Leydig, con un promedio general de 124 ± 25 células/mm²; tampoco se detectaron diferencias entre grupos para el diámetro de los túbulos seminíferos, con un promedio general de 210 ± 5.8 µm ($P > 0.05$).

10^6 spermatozoa/ejaculate and 42 ± 5 % progressive motility. Daily sperm production (Table 3) per gram and per paired testes was greater in group T5 and lower in group T10 ($P < 0.05$), as compared with control and OVA groups. Furthermore, daily sperm production was greater in T5 group than OVA+ control group ($P < 0.01$, data not shown). No difference among groups was detected for Leydig cell density, with an overall average of 124 ± 25 cells/mm², and for seminiferous tubule diameter with an overall average of 210 ± 58 mm ($P > 0.05$).

Serum concentrations of LH and testosterone (data not shown) were not affected by the treatments ($P > 0.05$). The overall average concentrations were 2.04 ± 0.23 ng LH/ml and 1.28 ± 0.44 ng of testosterone/ml.

The most important correlations among the studied variables are included in Table 4. Sperm production per gram and total were correlated to each other ($P < 0.001$) and they had medium and high correlations ($P < 0.01$) with SC, and with testis, epididymis and parenchyma weight. Seminiferous tubule diameter was correlated with SC, testis and parenchyma weight, and total daily sperm production ($P < 0.01$), as well as with epididymis weight and daily sperm production per gram ($P < 0.05$). Testis weight was correlated with SC and testicular parenchyma weight ($P < 0.001$), and with epididymis weight ($P < 0.01$). Concentrations of LH and

Cuadro 2. Características seminales promedio (\pm EE) de toros sin inmunizar e inmunizados con 10 mg de ovoalbúmina, con 5 mg ó 10 mg de testosterona 3-(O-carboximetil)oxima:ovoalbúmina^a

Table 2. Average semen characteristics (\pm EE) in non immunized (control) and immunized bulls with 10 mg of ovalbumin (OVA), with 5 mg (T5) or 10 mg (T10) of testosterone 3-(O-carboxymethyl) oxyme: ovalbumin^a

Group ^b	Volume (ml)	Sperm concentration		Progressive motility (%)
		millions/ml	millions/ejaculate	
Control	3.0 ± 0.6	208 ± 110	719 ± 647	28 ± 10
OVA	4.4 ± 0.65	435 ± 110	2104 ± 647	42 ± 10
T5	4.5 ± 0.6	369 ± 110	1951 ± 647	60 ± 10
T10	2.6 ± 0.7	138 ± 127	327 ± 747	39 ± 11

^a Values represent the average of two semen samples for each bull, obtained at 29 months of age. The treatments were applied at 12 months of age.

^b Four bulls per group except T10 (n=3).

Cuadro 3. Promedios (\pm EE) de la producción espermática diaria y hallazgos histológicos en los testículos de toros sin inmunizar e inmunizados con 10 mg de ovoalbúmina, con 5 mg ó 10 mg de testosterona 3-(O-carboximetil) oxima:ovoalbúmina^a

Table 3. Average daily sperm production (\pm EE) and histological findings in the testes of non immunized (control) and immunized bulls with 10 mg of ovalbumin (OVA), with 5 mg (T5) or 10 mg (T10) of testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxyme:ovalbumin^a

Group ^b	Daily sperm production (millions)		Leydig cells/mm ²	Seminal tubule diameter (μ m)
	Per gram	Paired testes		
Control	3.08 \pm 0.34 ^d	1013 \pm 306 ^{de}	177 \pm 49	205 \pm 12
OVA	3.76 \pm 0.32 ^d	1438 \pm 288 ^d	86 \pm 49	205 \pm 12
T5	4.92 \pm 0.34 ^c	2404 \pm 307 ^c	124 \pm 49	223 \pm 12
T10	2.03 \pm 0.32 ^e	542 \pm 287 ^e	109 \pm 49	209 \pm 12

^a The observations were made at 29 months of age. The treatments were applied at 12 months of age.

^b Four bulls per group

^{c,d,e} Means in each column without a common letter are different ($P < 0.05$).

Las concentraciones de LH y testosterona (datos no presentados) no fueron afectadas por los tratamientos ($P > 0.05$). Las concentraciones promedio generales fueron 2.04 ± 0.23 ng LH/ml y 1.28 ± 0.44 ng de testosterona/ml.

Las correlaciones más importantes entre las variables estudiadas se presentan en el Cuadro 4. La producción espermática por gramo de tejido y total se correlacionaron entre sí ($P < 0.001$) y tuvieron correlaciones medias y altas ($P < 0.01$) con la CE, el peso de los testículos, los epidídimos y el parénquima testicular. El diámetro de los túbulos seminíferos se correlacionó con la CE, el peso de los testículos, el parénquima y la producción espermática total ($P < 0.01$) y con el peso de los epidídimos y la producción espermática por gramo ($P < 0.05$). El peso testicular se correlacionó con la CE, el peso del parénquima testicular ($P < 0.001$) y el peso de los epidídimos ($P < 0.01$). Las concentraciones de LH y testosterona no se correlacionaron significativamente entre sí ($P > 0.05$), ni con ninguna de las demás variables estudiadas (datos no presentados).

La información obtenida mostró que los toros que habían sido inmunizados con la dosis baja del inmunógeno antes de la pubertad tuvieron mayor CE y un aumento en la cantidad de tejido testicular

testosterone did not correlate to each other ($P > 0.05$) nor with any of the other variables studied (data not shown).

The information obtained showed that bulls that were immunized with the lower dose of the testosterone conjugate before puberty had a greater SC and increased testicular tissue in the adult life, as compared with the control group. Interestingly, the increase in testis size in these bulls was similar from 16 months of age and at the time of castration, regardless the treatment. This indicates that the effect of the immunization on testis growth happens mostly during the period of greater immune response, since testes of bulls in group T5 grew more than those from the other groups during the period when the immunizations were applied⁽¹⁰⁾. This difference was preserved until the adult life. Similar increases in testis size have been previously found for Holstein⁽⁶⁾ and Shorthorn⁽⁷⁾ bulls immunized against testosterone during the first months of life and evaluated at 12 and 18 months of age.

Previous studies indicate that testicular hypertrophy in animals immunized against testosterone is associated with hypertrophy, hyperplasia and increased activity of the Leydig cells^(8,14). This is associated with a greater steroid production capacity *in vivo*^(4,7) and *in vitro*⁽¹⁵⁾, which explains, at least

Cuadro 4. Correlaciones entre las variables más importantes^a

Table 4. Correlations among the most important variables^a

	SC	TES	EPID	PRQ	DSPG	TDSP	LCD	DST
BW	0.45	0.43	0.71**	0.39	0.58*	0.50*	0.11	0.29
SC	-	0.93***	0.71**	0.92***	0.65**	0.82***	-0.41	0.73**
TES	-	-	0.65**	0.99***	0.78***	0.94***	-0.34	0.72**
EPID	-	-	-	0.62**	0.62**	0.63**	-0.14	0.60*
PRQ	-	-	-	-	0.78***	0.94***	-0.32	0.73**
DSPG	-	-	-	-	-	0.93***	-0.06	0.51*
TDSP	-	-	-	-	-	-	-0.19	0.65**
LCD	-	-	-	-	-	-	-	-0.38

a The observations were made at 29 months of age. The treatments were applied at 12 months of age.

BW= Body weight, SC= Scrotal circumference, TES= Testis weight, EPID= Epididymis weight, PRQ= Testicular parenchyma weight, DSPG= Daily sperm production per gram, TDSP= Total daily sperm production, LCD= Leydig cell density, DST= Diameter of seminiferous tubules.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

en la edad adulta, comparado con el grupo testigo. Es interesante hacer notar que el aumento del tamaño testicular de estos toros fue similar entre los 16 meses de edad y el momento de la castración, independientemente del tratamiento, lo cual indica que el efecto de la inmunización sobre el crecimiento testicular sucede principalmente durante el período de mayor respuesta inmunológica, ya que los testículos de los toros del grupo T5 crecieron más que los de otros grupos durante el periodo en que fueron aplicadas las inmunizaciones⁽¹⁰⁾ y esta diferencia fue conservada hasta la edad adulta. Aumentos similares en el tamaño testicular han sido indicados previamente para toros Holstein⁽⁶⁾ y Shorthorn⁽⁷⁾ inmunizados contra testosterona durante los primeros meses de vida y evaluados entre los 12 y 18 meses de edad.

Estudios previos a escala microscópica indican que la hipertrofia testicular en los animales inmunizados contra testosterona está asociada a una hipertrofia e hiperplasia y mayor actividad de las células de Leydig^(8,14), lo cual se refleja en una mayor capacidad de esteroidogénesis, tanto *in vivo*^(4,7) como *in vitro*⁽¹⁵⁾ y explica, al menos parcialmente, el aumento en las concentraciones plasmáticas de esta hormona en los animales durante el período de inmunización^(7,8,10). Aparentemente estas concentraciones altas no se mantienen por

partially, the increase in plasma concentrations of this hormone in the animals during the immunization period^(7,8,10). Apparently these high concentrations are not maintained for long periods of time after the immunizations are suspended^(7,16) because in the present study there was no difference among groups in testosterone concentration; however, because of the pulsatile release pattern of this hormone the concentrations found in a single blood sample might not reflect the average concentrations in an animal. In addition, Leydig cell density at the adult age was not affected by the treatments, although an exhaustive evaluation of these cells could not be done, which would yield information about the size of their population and their activity.

The importance of increased SC and testis weight is based on the fact that these characteristics are highly correlated with sperm production of the animal and other reproductive characteristics⁽¹⁷⁾. In the present study, the increase in SC and testicular tissue in group T5 was associated with increased sperm production, both per unit of parenchymal tissue (35 %) and per paired testes (81 %), as compared with the control group.

Although it has been suggested that in animals immunized against testosterone the increased testis size is due mainly to the hypertrophy of Leydig

mucho tiempo después de que se suspenden las inmunizaciones^(7,16), pues en el presente estudio no hubo diferencia entre grupos en los niveles séricos de testosterona, aunque por la naturaleza pulsátil de la liberación de esta hormona, debe considerarse la posibilidad de que las concentraciones encontradas en una sola muestra de sangre no reflejen las concentraciones promedio en un animal. Además, la densidad de células de Leydig en la edad adulta no fue afectada por los tratamientos, aunque no se pudo hacer una evaluación más completa de estas células que nos diera mayor información del tamaño de su población y de su actividad.

La importancia de un incremento en la CE y el peso de los testículos se basa en que estas características están altamente correlacionadas con la producción espermática del animal y otras características reproductivas⁽¹⁷⁾. En el presente estudio, el aumento de la CE y la masa testicular en el grupo T5 estuvieron asociados con un aumento de la producción espermática, tanto por unidad de parénquima testicular (35 %), como total por toro (81 %), con relación al grupo testigo.

Aunque en animales inmunizados contra esteroides sexuales se ha sugerido que el mayor crecimiento testicular puede deberse principalmente a la hipertrofia de las células de Leydig y al aumento en el volumen del tejido intersticial^(8,14), es de suponerse que la inmunización también tiene algún efecto sobre los túbulos seminíferos. Aparentemente, la proporción relativa de tejido tubular no se ve alterada por la inmunización^(8,18), lo cual concuerda con el hecho de que el diámetro de los túbulos seminíferos no haya sido diferente entre los grupos del presente estudio; sin embargo, si el tamaño testicular es mayor, entonces la masa total del tejido tubular aumenta en la misma proporción que aumenta el peso del parénquima testicular^(8,18). Esto podría explicar nuestras observaciones y las de otros autores^(6,7), con relación a que la producción espermática total aumenta en mayor porcentaje que la producción por gramo de tejido testicular.

La unión de los anticuerpos producidos a la testosterona circulante, disminuye la disponibilidad

cells and to the increase in interstitial tissue^(8,14), immunization might also have an effect on the seminiferous tubules. Apparently the relative proportion of tubular tissue is not altered by immunization^(8,18), which is in agreement with the fact that the diameter of the seminiferous tubules was not different among groups in the present study. Nevertheless, if the testis size is greater then the total mass of tubular tissue increases in the same proportion as the testicular parenchyma weight increases^(8,18). This could explain our observations and those of other authors^(6,7) that the total sperm production increases in a greater percentage than the production per gram of testicular parenchyma.

Binding of specific antibodies with the circulating testosterone reduces the availability of this hormone to the receptors at the hypothalamus-pituitary axis, and reduces the negative feedback towards this axis⁽⁵⁾. This increases the secretion of gonadotropins whose concentrations in blood are related to the antibody titers during the first weeks after immunization⁽¹⁵⁾. In the present study, the immunization against testosterone did not affect LH concentrations, which could be due to the fact that the immunization had been administered several months before blood samples were collected. Furthermore, because of the pulsatile release pattern of this hormone, a single sample might not necessarily reflect the average concentrations in an animal. Although during the immunization period some animals in the T5 group presented LH pulses with greater amplitudes than those observed in any other group⁽¹⁰⁾. The increase in the secretion of LH stimulates the steroidogenesis and testosterone secretion by Leydig cells, which in addition to the greater concentrations of FSH^(7,18) could explain the increase in the total amount of tubular tissue within the testes as has been previously suggested^(8,18), and therefore, enhance daily sperm production, because these two hormones stimulate spermatogenesis⁽¹⁹⁾.

High concentrations of FSH early in the animal's life induce proliferation of Sertoli cells⁽²⁰⁾ whose population is positively related to testis size and sperm production during the adult age^(21,22). Therefore, an increase in the number of these cells

de esta hormona para los receptores del eje hipotálamo-pituitaria y reduce la retroalimentación negativa hacia este eje⁽⁵⁾, con lo cual aumenta la secreción de gonadotropinas, cuyas concentraciones plasmáticas se relacionan con los títulos de anticuerpos durante las primeras semanas después de la inmunización⁽¹⁵⁾. En el presente estudio, la inmunización contra testosterona no afectó las concentraciones de LH, lo cual pudo deberse a que la última inmunización había sido administrada muchos meses antes de estas observaciones; también debe considerarse que, por la naturaleza pulsátil de esta hormona, una sola muestra no necesariamente refleja las concentraciones promedio de un animal, aunque durante el período de inmunización algunos animales del grupo T5 presentaron pulsos de LH con amplitudes mayores que las observadas en los otros grupos⁽¹⁰⁾. El aumento en la secreción de LH estimula la esteroidogénesis y la secreción de testosterona por las células de Leydig, lo cual, aunado al incremento en las concentraciones de FSH^(7,18), podría explicar el aumento en la cantidad total de tejido tubular dentro de los testículos sugerido anteriormente^(8,18) y por lo tanto, el aumento de la producción espermática, ya que se sabe que estas dos hormonas favorecen la espermatogénesis⁽¹⁹⁾.

Las concentraciones altas de FSH durante edades tempranas del animal favorecen la proliferación de las células de Sertoli⁽²⁰⁾, cuya población se relaciona positivamente con el tamaño testicular y la producción espermática durante la edad adulta^(21,22); por lo tanto, un aumento del número de estas células durante la etapa prepuberal puede tener efectos permanentes sobre la producción espermática del animal⁽²⁰⁾. Las observaciones hechas en el presente estudio no permiten saber si la población de células de Sertoli fue afectada, ya que éstas no fueron evaluadas. Sin embargo, debido a que los animales del presente estudio tenían un año de edad cuando fueron inmunizados⁽¹⁰⁾, es poco probable que esta población celular haya sido afectada, ya que en toros *B. taurus* se ha visto que la capacidad de proliferación de estas células es reducida drásticamente a los 4 meses de edad⁽²²⁾. Debido al

in the prepubertal animal might have permanent effects on the sperm production capacity of the animal⁽²⁰⁾. The observations made in the present study did not allow to know if the Sertoli cell population was affected because these cells were not evaluated. Nevertheless, since the animals of the present study were one year old when immunizations were administered⁽¹⁰⁾ it is unlikely that this cell population had been affected. Previous studies in *B. taurus* bulls indicated that the proliferation capacity of these cells is drastically reduced by 4 months of age⁽²²⁾. Due to the poor reproductive development of the bulls at the time of immunization and to the strong influence of *B. indicus* they had, one should not disregard the possibility that the cell populations within the testes had not reached their maturity at that stage and that they could have been affected in some way by the immunization against testosterone.

In conclusion, the immunization against testosterone, using the 5 mg dose of the immunogen, in crossbred Zebu bulls during the prepubertal age induces a greater testicular mass and increases daily sperm production. These changes are maintained until the adult age of the animals, with apparent no effect on semen characteristics and body growth. Nevertheless, more studies are required to optimize the immunization methods to obtain a more uniform immune and reproductive response in the animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by CONACYT and the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM, as part of the master's thesis of the first author. We acknowledge Dr. Juvencio Lagunes Lagunes and the personnel of the Experimental Station "Las Margaritas" for the facilities given to perform this project.

End of english version

pobre desarrollo reproductivo de los toros al momento de las inmunizaciones y a la fuerte influencia de *B. indicus* que tenían, no puede descartarse la posibilidad que las poblaciones celulares dentro de los testículos no hayan alcanzado su madurez a esa edad, y que hubieran sido afectadas en alguna forma por la inmunización contra testosterona.

Se concluye que la inmunización contra testosterona, utilizando la dosis de 5 mg del inmunógeno en toros encastados de Cebú durante la etapa prepuberal, induce una mayor masa de tejido testicular e incrementa la producción espermática; estos cambios son mantenidos hasta la edad adulta de los animales, sin afectar aparentemente la calidad seminal y el crecimiento corporal; Sin embargo, se requiere un mayor número de estudios para optimizar los métodos de inmunización y obtener una respuesta inmune y reproductiva más uniforme de los animales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por CONACYT y la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, como parte de la tesis de maestría del primer autor. Se agradece al Dr. Juvencio Lagunes Lagunes y al personal del Campo Experimental "Las Margaritas", por las facilidades brindadas para la realización de este experimento.

LITERATURA CITADA

- Schanbacher BD. Hormonal regulation of the male pituitary. Proc. 10th Int Congr Anim Reprod Artif Insem IV. Urbana, IL, USA. 1984;I-1-I-9.
- Boockfor FR, Barnes MA, Kazmer GW, Halman RD, Bierley ST, Dickey JF. Effects of unilateral castration and unilateral cryptorchidism of the Holstein bull on plasma gonadotropins, testosterone and testis anatomy. J Anim Sci 1983;56:1376-1385.
- Schanbacher BD, Fletcher PW, Reichert LE, Jr. Testicular compensatory hypertrophy in the hemicastrated calf: effects of exogenous estradiol. Biol Reprod 1987;36:1142-1148.
- Wickings EJ, Becher A, Nieschlag E. Testosterone metabolism in rabbits actively immunized with testosterone. Endocrinology 1976;98:1142-1146.
- Nieschlag E, Wickings EJ. Biological effects of antibodies to gonadal steroids. Vitam Horm 1978;36:165-202.
- Walker MP, Thompson DL, Jr., Godke RA, Honey PG. Active immunization of prepubertal bulls against testosterone: seminal and testicular characteristics after puberty. Theriogenology 1984;22:269-278.
- D'Occhio MJ, Gifford DR, Hoskinson RM, Weatherly T, Flavel PF, Mattner PE, Setchell BP. Reproductive hormone secretion and testicular growth in bull calves actively immunized against testosterone and oestradiol-17 β . J Reprod Fertil 1987;79:315-324.
- Nieschlag E, Usadel KH, Schwedes U, Kley HK, Schöffling K, Krüskemper HL. Alterations in testicular morphology and function in rabbits following active immunization with testosterone. Endocrinology 1973;92:1142-1147.
- Haynes NB, Southee JA. Effects of immunization against steroid hormones on male endocrinology. In: Crighton DB editor. Immunological aspects of reproduction in mammals. 1st ed. London, UK: Butterworths; 1984:427-444.
- Jiménez-Severiano H, Jiménez-Krassel F, Menéndez-Trejo M. Endocrine and testicular responses of prepubertal Zebu crossbred bulls to active immunization against testosterone. Anim Reprod Sci 1996;41:169-181.
- Amann RP. Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR, Van Demark NL editors. The testis, vol. I, 1st ed. New York, USA: Academic Press; 1970:433-482.
- Salim B, Entwistle KW. Duration of the seminiferous epithelial cycle in hybrid *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. J Reprod Fertil 1982;66:729-734.
- SAS. SAS/STAT® User's Guide, Version 6. Cary NC, USA: SAS Institute Inc. 1990.
- Wrobel KH, Niederle P, D'Occhio MJ, Gifford DR, Setchell BP. Testicular morphology of Shorthorn bulls actively immunized against testosterone and estradiol-17 β . Reprod Dom Anim 1990;25:283-290.
- Nieschlag E, Usadel KH, Wickings EJ, Kley HK, Wuttke W. Effects of active immunization with steroids on endocrine and reproductive functions in male animals. In: Nieschlag E editor. Immunization with hormones in reproductive research. 1st ed. Amsterdam, The Netherlands: North-Holland Publishing Company; 1975:155-172.
- Thornycroft IH, Thornycroft NK, Scaramuzzi RJ, Blake CA. Radioimmunoassay of serum LH and testosterone in male rabbits actively immunized against testosterone. Endocrinology 1975;97:301-306.
- Coulter GH, Foote RH. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to reproductive traits in cattle: a review. Theriogenology 1979;11:297-311.
- Nieschlag E, Usadel KH, Kley HK, Schwedes U, Schöffling K, Krüskemper HL. A new approach for investigating hypothalamo-pituitary-gonadal and adrenal feedback control mechanisms: active immunization with steroids. Acta Endocrinol 1974;76:556-569.
- McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM, de Kretser DM. Hormonal control of spermatogenesis. Trends Endocrinol Metab 1995;6:95-101.
- Meachem SJ, McLachlan RI, de Kretser DM, Robertson DM, Wreford NG. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. Biol Reprod 1996;54:36-44.

21. Berndtson WE, Igboeli G, Parker WG. The number of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. *Biol Reprod* 1987;37:60-67.
22. Hochereau-de-Reviere MT, Monet-Kunts C, Courot M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J Reprod Fertil* 1987;(Suppl 34):101-114.