

Parámetros seminales y hematológicos en gatos domésticos inmunocastrados mediante una vacuna contra GnRH. Resultados preliminares

Seminal and hematological parameters in domestic cats immunocastrated with a GnRH vaccine. Preliminary results

Segura Ochoa, Jorge Jagger; Nuñez Favre, Romina; García, María Florencia; Stornelli, María Cecilia; García Mitacek, María Carla; Carrasco Sangache, Washington Fernando; Stornelli, María Alejandra

Jorge Jagger Segura Ochoa

Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador

 **Romina Nuñez Favre**
rnfavre@fcv.unlp.edu.ar

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

María Florencia García

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

María Cecilia Stornelli

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

 **María Carla García Mitacek**

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

 **Washington Fernando Carrasco Sangache**

Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador

 **María Alejandra Stornelli**

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ANALECTA VETERINARIA

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1514-2590

Periodicidad: Frecuencia
continua vol. 42, e069, 2022
analecta@fcv.unlp.edu.ar

Recepción: 18 Agosto 2022

Revisado: 11 Octubre 2022

Aprobación: 26 Octubre 2022

URL:

<http://portal.amelica.org/ameli/journal/25/253057012/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/15142590e069>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional.

Resumen: La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) constituye un excelente blanco farmacológico para el manejo reproductivo de animales de compañía, de producción y silvestres. En este trabajo se evaluó el efecto de la vacuna Improvac® contra GnRH para suprimir la espermatogénesis en el gato doméstico. A siete gatos adultos, clínicamente sanos y mantenidos en ambiente controlado, se les aplicaron dos dosis de la vacuna, con cuatro semanas de intervalo y utilizando la vía subcutánea. Los animales se evaluaron cada dos semanas durante 180 días. Los parámetros seminales, el volumen testicular y el tamaño de las espículas peneanas comenzaron a disminuir dos meses después de la primera dosis vacunal. Al final de la experiencia los parámetros seminales y el volumen testicular descendieron 90 % y 49 %, respectivamente, en relación con los valores iniciales y las espículas peneanas evidenciaron una atrofia casi completa. Los parámetros hematológicos se encontraron, durante todo el estudio, dentro de los valores normales para los gatos domésticos. Este es el primer trabajo que evalúa la efectividad de la vacuna Improvac® para el control reproductivo en gatos machos. Futuros estudios permitirán determinar la duración de la inmunocastración y el potencial reproductivo posterior a su utilización.

Palabras clave: inmuoconcepción, control reproductivo, castración.

Abstract: This study aims to assess the effect of the anti-GnRH vaccine Improvac® on the reproductive control of male domestic cats. Seven clinically healthy adult male cats were used. Cats were maintained in a controlled environment to avoid sperm variations due to photoperiod. Semen samples, testicular volume, penile spines quality, and blood samples for hemogram and serum glucose determination were evaluated every two weeks for 180 days. After three consecutive seminal evaluations, the first dose of the vaccine was administered, followed by a second dose 4 weeks later. Reductions in seminal parameters, testicular volume, and penile spines size were observed in six cats two months after vaccination and continued until the end of the study. By this time, seminal parameters and testicular volume decreased 90 % and 49 %, respectively, compared to initial values. Penile spines showed almost complete atrophy. Hematologic parameters observed during the study period were within normal values for domestic cats. This is the first report that

assessed the immunocontraceptive effectiveness of the Improvac® vaccine for reproductive control in male domestic cats. Further studies are necessary to determine the duration of the contraceptive effect and fertility after vaccination.

Keywords: immunocontraception, reproductive control, castration.

Introducción

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) ha sido, por décadas, un excelente blanco farmacológico para el manejo reproductivo de animales de compañía, de producción y silvestres (Naz & Saver, 2016). Esto se debe a que la GnRH, sintetizada y liberada de manera pulsátil por el hipotálamo, estimula la liberación de las principales hormonas reproductivas hipofisarias (hormona luteinizante -LH- y folículo estimulante -FSH-), induciendo el desarrollo folicular y la ovulación en hembras y la producción espermática en machos. Por lo tanto, la aplicación de una vacuna que estimule la generación de anticuerpos específicos que neutralicen la actividad de GnRH, inhibirá la secreción de FSH y LH, causando infertilidad (Naz & Saver, 2016). Aunque se trata de una molécula con potente acción reproductiva, la GnRH es un decapeptido débilmente inmunogénico, por lo que ha sido conjugado con proteínas como metaloproteínas de *Megathura crenulata*, o toxoides como el tetánico o el de difteria para potenciar su acción inmunógena (Levy *et al.*, 2004; Naz & Saver, 2016). Si bien la efectividad de estas vacunas para el control reproductivo ha sido comprobada en animales de compañía (Levy *et al.*, 2011), actualmente no son utilizadas en Argentina debido a que, o bien no están disponibles para felinos, o su alto costo hace difícil su comercialización. Sin embargo, actualmente en Argentina se comercializa una vacuna contra GnRH (Improvac®) diseñada para su utilización en cerdos. Se encuentra formulada sobre la base de un péptido sintético análogo a la GnRH conjugado con toxoide de difteria, cuyo adyuvante es una emulsión acuosa en aceite. Esta emulsión promueve una buena respuesta antigénica contra la hormona liberadora de hormonas sexuales, suprimiendo de esta forma la función reproductiva. Es ampliamente utilizada en producción porcina debido a que mantiene las tasas de crecimiento y rendimiento, eliminando el olor y el sabor asociados a hormonas sexuales, lo que deprecia el valor de la carne (Cardelino, 2013; Zamaratskaia *et al.*, 2008). Esta vacuna también ha resultado eficaz para producir atrofia testicular y supresión de la función reproductiva en equinos, caprinos y caninos (Ajadi & Gasal 2016; Birrell *et al.*, 2021; Bishop *et al.*, 2015).

Los resultados observados en estas especies sugieren que su acción inmunosupresora gonadal podría ser de aplicación en el control reproductivo de felinos domésticos. Sin embargo, su eficacia aún no ha sido probada en felinos domésticos, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la vacuna Improvac® para suprimir la espermatogénesis en el gato doméstico.

Materiales y métodos

El diseño de esta investigación fue aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) (101-9-19T). Se utilizaron siete gatos adultos de dos a cinco años, clínicamente sanos, pertenecientes a la colonia reproductiva de la Cátedra de Reproducción Animal. Los animales se alojaron en jaulas individuales (0,75 x 1,5 x 2 m), bajo fotoperiodo de ciclos alternos para mantener la calidad de semen (Nuñez Favre *et al.*, 2012) y fueron alimentados con alimento balanceado premium (Balance Control de pH, Vitalcan, Argentina) y agua *ad libitum*.

Transcurrida la adaptación al nuevo ambiente (45 días) y el período que permite evidenciar el efecto lumínico sobre la calidad de semen (dos ciclos espermatogénicos de 46,8 días cada uno) se comenzó con la toma de las muestras seminales, mediante electroeyaculación cada dos semanas. Se incluyeron en el estudio animales que presentaron parámetros seminales acorde a lo establecido para la especie en tres evaluaciones seminales consecutivas (Nuñez Favre *et al.*, 2018). Luego (día 0 -Do-) se aplicó, en la región costal izquierda, la primera dosis (0,5 ml) de la vacuna anti-GnRH (Improvac®, Zoetis Belgium SA, Louvain-la-Neuve, Bélgica) utilizando la vía subcutánea. La segunda dosis se aplicó 30 días más tarde (D30), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los muestreos seminales se continuaron cada dos semanas, durante 180 días (D180). A todas las muestras seminales se les realizaron las siguientes pruebas de contrastación: motilidad (MOT, %), vigor (VIG), volumen (VOL, μ l), concentración espermática (CON, x10/ml), cantidad de espermatozoides totales (ET, x10), viabilidad (VIA %; tinción eosina-nigrosina) y morfología espermática (SM, % normal; Tinción 15., Biopur, Argentina). La toma de muestras y la evaluación seminal se realizaron según lo descrito por García *et al.* (2020). Antes de cada muestreo seminal se determinó el volumen testicular mediante la fórmula de la elipse y se registró subjetivamente el tamaño de las espículas penianas, también denominadas papilas queratinizadas del pene (Goericke-Pesch *et al.*, 2011). Concluida la evaluación del semen se tomó una muestra de sangre con EDTA para hemograma y una muestra de sangre con EDTA/fluoruro de sodio para determinación de glucosa plasmática. Las muestras para hemograma fueron procesadas con un analizador hematológico semiautomatizado (Sysmex KX-21, Venezuela), y el conteo diferencial de leucocitos se realizó en frotis teñidos con May-Grünwald Giemsa (Stornelli *et al.*, 2012). La determinación de glucosa se realizó mediante espectrofotómetro (Metrolab plus 1600 Clinical Analyzer, Argentina), utilizando el reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa de BioSystems. Se realizó análisis de varianza mediante procedimiento GLIMMIX del paquete estadístico SAS. Las variables concentración, cantidad de espermatozoides totales y conteos hematológicos fueron ajustadas a una distribución Poisson. Los resultados se presentan como diferencia de cuadrados mínimos \pm desvío estándar, con una significancia de $P \leq 0,05$.

Resultados

Entre las 24 y las 48 horas posteriores al Do, se observó un aumento leve

transitorio de la temperatura corporal (de 0,5 a 1 °C). En seis gatos, todos los parámetros seminales comenzaron a disminuir a los dos meses después del Do, continuando el descenso hasta el final del estudio, momento en el que se observaron diferencias significativas, con respecto a los valores iniciales (Tabla 1). El volumen testicular descendió 21% a los 2 meses, 41% a los 4 meses y 49% a los seis meses (2902,01±22,00 mm³ vs. 2292,80±19,55 mm³; 1704,18±18,46 mm³; y 1500,54±27,39 mm³; respectivamente; P<0,001). Las espículas peneanas disminuyeron su tamaño a partir del segundo mes, evidenciando una atrofia casi completa hacia el final del estudio. En uno de los gatos se observó una respuesta más lenta, el volumen testicular, los parámetros seminales y el tamaño de las espículas peneanas comenzaron a disminuir al cuarto mes, continuando hasta el final del estudio.

Tabla 1. Evaluaciones seminales en gatos (n=7) inmunocastrados mediante dos dosis de la vacuna contra GnRH Improvac®

Evaluación de semen	Periodo de tratamiento (días)		
	0	90	180
Motilidad (%)	70,00 ± 3,4	34,12 ± 2,6**	2,50 ± 1,1**
Vigor (0-5)	3,60 ± 0,8	2,44 ± 0,7	1,36 ± 0,8*
Volumen (µl)	131,67 ± 4,7	60,00 ± 3,5**	50,00 ± 5,0**
Concentración (x10 ⁶ /ml)	150,00 ± 5,0	88,16 ± 4,2**	10,08 ± 2,2**
Cantidad de espermatozoides totales (x10 ⁶)	22,76 ± 2,0	4,91 ± 1,0**	0,70 ± 0,6**
Viabilidad (%)	63,00 ± 4,5	47,00 ± 4,4*	30,00 ± 6,6*
Morfología espermática (% normal)	67,16 ± 4,7	36,32 ± 9,0*	36,95±4,10*

Los valores se encuentran expresados como diferencia de cuadrados mínimos ± error estándar. * diferencias significativas P ≤0,05; ** diferencias altamente significativas P ≤0,001.

Tabla 2. Valores hematológicos observados en gatos (n=7) inmunocastrados mediante dos dosis de la vacuna contra GnRH Improvac®

Parámetro	Periodo de tratamiento (días)						
	0	30	60	90	120	150	180
Glucosa (mg/dL)	70,00 ± 3,2	67,29 ± 3,1	66,86 ± 3,1	65,40 ± 3,6	67,50 ± 3,4	68,33 ± 3,7	65,50 ± 6,5
Hematocrito (%)	35,86 ± 1,3	29,29 ± 1,3*	29,29 ± 1,3*	28,80 ± 1,6*	30,67 ± 1,4*	29,00 ± 2,0*	27,00 ± 2,5*
Concentración de hemoglobina (g/dL)	11,83 ± 0,4	9,57 ± 0,4**	9,67 ± 0,4**	10,00 ± 0,5*	10,33 ± 0,4*	9,50 ± 0,6*	9,20 ± 0,7*
Recuento de eritrocitos (10 ⁶ /µL)	7,47 ± 0,3	6,03 ± 0,3**	6,07 ± 0,3**	5,72 ± 0,3**	6,33 ± 0,3*	6,01 ± 0,4*	5,61 ± 0,5*
Recuento de leucocitos (10 ³ /µL)	8,60 ± 1,3	9,56 ± 1,4	9,07 ± 1,4	9,61 ± 1,7	9,37 ± 1,5	9,07 ± 0,3	8,76 ± 3,3
Sólidos totales (%)	8,26 ± 1,1	8,43 ± 1,1	9,17 ± 1,1	9,23 ± 2,0	9,40 ± 1,3	9,60 ± 2,0	9,00 ± 2,1
Fórmula leucocitaria (%)							
Neutrófilos segmento	69,29 ± 3,7	73,43 ± 4,0	80,29 ± 4,2*	72,60 ± 4,6	77,33 ± 4,4*	72,67 ± 6,0	69,00 ± 7,1
Neutrófilos en banda	1,00 ± 0,5	0,71 ± 0,4	2,29 ± 1,0	1,80 ± 0,1	1,50 ± 0,8	0,67 ± 0,6	3,00 ± 2,3
Linfocitos	28,43 ± 5,1	21,71 ± 4,0	13,86 ± 2,7*	15,60 ± 3,5*	14,50 ± 3,0*	21,67 ± 6,1	22,50 ± 7,7
Monocitos	0,43 ± 0,2	0,71 ± 0,3	0,71 ± 0,3	0,20 ± 0,2	0,67 ± 0,3	0,33 ± 0,3	0,27 ± 0,2
Eosinófilos	5,00 ± 0,9	3,43 ± 1,0	2,86 ± 1,0	7,60 ± 1,2	5,12 ± 1,0	4,67 ± 1,2	5,50 ± 1,7

Los valores se encuentran expresados como diferencia de cuadrados mínimos ± error estándar. * diferencias significativas P ≤0,05; ** diferencias altamente significativas P ≤0,001.

Los valores hematológicos correspondientes a los muestreos previos a la vacunación se encontraron dentro de los parámetros considerados normales para los gatos domésticos (Cinkenbeard & Meinkoth, 2000). Se observaron diferencias en algunos de los valores hematológicos al comparar D0 con D30, D60, D90, D120, D150 y D180 (Tabla 2). Sin embargo, todos los valores se mantuvieron dentro del intervalo de referencia normal para la especie, tal como ocurrió con las muestras obtenidas antes de la aplicación de la vacuna.

En cuanto a la concentración de glucosa sérica, no se observaron diferencias durante el estudio (Tabla 2) y los sólidos totales evidenciaron un incremento paulatino no significativo, encontrándose levemente por encima del intervalo de referencia: 6 a 8 g/dl (Cinkenbeard & Meinkoth, 2000). Los animales presentaron, en el sitio de aplicación de la vacuna, una reacción tisular palpable en el tejido subcutáneo de aproximadamente un cm de diámetro, la cual resolvió dentro de los 14 a 21 días posteriores al D0.

Discusión y conclusiones

La reducción de los parámetros reproductivos observados en este estudio concuerda con los comunicados en gatos tratados con la vacuna Gonacon. (Levy *et al.*, 2004; 2011) y con implantes de GnRH (Goericke-Pesch *et al.*, 2011; Nuñez Favre *et al.*, 2018). Una respuesta variable entre individuos ha sido observada con la vacuna Gonacon®, aun con altos títulos de anticuerpos vacunales (Levy, 2011). Birrell *et al.* (2021) observaron una reducción del 50 % en el tamaño testicular 57 días posteriores a la aplicación de la primera dosis de la vacuna Improvac®. en potros y, si bien en nuestro trabajo la reducción fue más lenta (49% al D180), los hallazgos concuerdan con las observaciones en potros. En nuestro estudio los gatos presentaron una reacción tisular leve en el sitio de inoculación, la cual se resolvió en el transcurso de dos a tres semanas. De manera similar, se ha descrito la formación de granulomas estériles e indoloros en el sitio de inoculación de la vacuna Gonacon® en gatos ferales (Miller *et al.*, 2008). Asimismo, nuestros resultados demostraron que, si bien la aplicación de la vacuna Improvac®. indujo disminución del hematocrito, del recuento de eritrocitos y de la concentración de hemoglobina, estas disminuciones fueron acompañadas por un aumento en los sólidos totales, probablemente a expensas del aumento de las globulinas en respuesta a la vacuna Improvac®. Resultados similares fueron comunicados recientemente en gatas inmunizadas con la vacuna Improvac® como método anticonceptivo (Carrasco Sangache *et al.*, 2021). Además, la disminución del hematocrito y de la concentración de hemoglobina observada en nuestro estudio al D30 concuerda parcialmente con los hallazgos de Ajadi & Gazal (2016) en perros inmunocastrados mediante la vacuna Improvac® debido a que, en dicho estudio, la disminución de los mencionados parámetros fue observada a partir de la décima semana de tratamiento. Además, los autores consignaron una disminución de los leucocitos totales desde la aplicación de la vacuna hasta la semana seis, seguida de un aumento hasta la semana 16, hecho que no fue observado en este estudio.

Este es el primer trabajo que evalúa la efectividad de la aplicación de la vacuna Improvac® contra la hormona liberadora de gonadotrofinas para el control reproductivo en gatos machos. Si bien la utilización de esta vacuna

mostró variaciones individuales en su respuesta, resultó efectiva para reducir la calidad seminal. Futuros estudios permitirán determinar la duración de la inmunocastración y el potencial reproductivo posterior a la vacunación.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata por facilitar el lugar de trabajo y el ambiente acondicionado para la colonia felina. A la Universidad Estatal de Bolívar por financiar las becas doctorales de JSO y WCS. Este trabajo forma parte de los proyectos I+D V11/272 RLS y PIP CONICET. 11220200101936CO MAS.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses que pudiera haber influido de manera inapropiada en el desarrollo del presente trabajo.

Bibliografía

- Ajadi TA, Gazal OS. 2016. Effect of surgical and immunological castration on haematological variables, reproductive hormones and ejaculate characteristics in mongrel dogs. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*. 31:37-42.
- Birrell JR, Schulman ML, Botha AE, Ganswindt A, Fosgate GT, Bertschinger HJ. 2021. Vaccination against GnRH as a prelude to surgical castration of horses. *Equine Veterinary Journal*. 53(6):1141-9. <https://doi.org/10.1111/evj.13411>
- Bishop CC, Fleming PA, Barnes AL, Collins T, Miller DW. 2015. Immunisation against gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) reduces agonistic behaviours in male rangeland goats. *Animal Production Science*. 56(11):1882-7. <https://doi.org/10.1071/AN15076>
- Cardelino, GE. 2013. Evaluación del índice de conversión y consumo diario de alimento en lechones de sitio II y sitio III, en función de la utilización del inmunocastrador químico Improvac, Laboratorio Pfizer, a los 90 días y a los 121 días de vida. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/349/1/doc.pdf>
- Carrasco Sangache WF, García Mitacek MC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Segura Ochoa JJ, Tebés M, Stornelli MA. 2021. Evaluación de parámetros hematológicos en gatas (*Felis catus*) tratadas con una vacuna anti-hormona liberadora de gonadotropina. Resultados preliminares. XXI Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas FCV. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.
- Cinkenbeard KD, Meinkoth KC. 2000. Normal hematology of the cat. En: Schalm's Veterinary Hematology. 5th Ed. New Jersey, Willey-Blackwell, pp. 1064-8.
- García MF, Nuñez Favre R, Stornelli MC, Rearte R, Garcia Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli MA. 2020. Relationship between semen quality and seminal plasma cholesterol, triacylglycerols and proteins in the domestic cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 22(10):882-9. <https://doi.org/10.1177/1098612X19889072>
- Goericke-Pesch S, Georgiev P, Antonov A, Albouy M, Wehrend A. 2011. Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin, Suprelorin., regarding suppression of reproductive function in tomcats. *Theriogenology*. 75(5):803-10. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.020>

- Levy JK, Miller LA, Crawford PC, Ritchey JW, Ross MK, Fagerstone KA. 2004. GnRH immunocontraception of male cats. *Theriogenology*. 62(6):1116-30.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.025>
- Levy JK. 2011. Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. *American Journal of Reproductive Immunology*. 66(1):63-70.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01005.x>
- Miller L, Fagerstone K, Kemp J, Killian G, Rhyan J. 2008. Immune mechanisms and characterization of injection site reactions involved in the multi-year contraceptive effect of the GonaCon™ vaccine. *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference*. Davis, USA, 23:244-9. <https://doi.org/10.5070/V423110577>
- Naz RK, Saver AE. 2016. Immunocontraception for animals: Current status and future perspective. *American Journal of Reproductive Immunology*. 75(4):426-39.
<https://doi.org/10.1111/aji.12431>
- Núñez Favre R, Bonauro MC, Tittarelli CM, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA. 2012. Effect of refractoriness to long photoperiod on sperm production and quality in tomcats. *Reproduction in Domestic Animals*. 47:235-7. <https://doi.org/10.1111/rda.12049>
- Núñez Favre R, García MF, García Mitacek MC, Rearte R, Fontaine C, de la Sota RL, Stornelli MA. 2018. Reestablishment of sperm quality after long-term deslorelin suppression in tomcats. *Animal Reproduction Science*. 195:302-8.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.008>
- Stornelli MC, García Mitacek MC, Gimenez F, Bonauro MC, Videla Dorna I; de la Sota RL, Stornelli MA. 2012. Pharmacokinetics of eCG and induction of fertile estrus in bitches using eCG followed by hCG. *Theriogenology*. 78:1056-4.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.012>
- Zamaratskaia G, Rydhmer L, Andersson HK, Chen G, Lowagie S, Andersson K, Lundström K. 2008. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Animal Reproduction Science*. 108(1-2):37-48. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.001>