

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE UNA VACUNA ANTI-GNRH  
COMO MÉTODO INMUNO-CONTRACEPTIVO EN FELINOS  
MACHOS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias

Autor: MVZ. Jagger Segura Ochoa  
Director: MV, Dra. Cs Vet, María Alejandra Stornelli.  
Codirector: MV, Dra. Cs Vet, Romina Nuñez Favre.

Lugar de Trabajo: Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal,  
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad  
Nacional de La Plata.

Miembros del Jurado: Dra. Alejandra Larsen  
Dr. Marcelo Rezende Luz  
Dr. Daniel Cavestany

La Plata, Buenos Aires, febrero 2023

*A mis padres que han sido un ejemplo a imitar y me han guiado por el camino correcto. A mis Hermanos, cuñado, cuñadas y sobrinos por todo su cariño y apoyo moral que me han brindado.*

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios y a la Virgencita, por darme esa fuerza, ese cuidado tan grande, para seguir adelante en mi vida y en mis estudios.

A mi directora, maestra María Alejandra Stornelli, Dra. C. por aceptarme como alumno, diseñar y criticar de manera constructiva este trabajo, y dedicarme parte de su valioso tiempo, así como por haberme brindado todo su apoyo y compartir conmigo sus ideas.

A mi codirectora, maestra Romina Núñez Favre, Dra. C. por aceptarme como alumno, apoyarme, y brindarme todo su conocimiento para ser un mejor profesional, así como su ayuda incondicional y colaboración en este trabajo y muchas gracias por esa paciencia y así lograr culminar mis estudios.

Al Dr. Luzbel de la Sota, maestro por darme la oportunidad de cursar mis estudios y por ese apoyo incondicional.

A la Dra. Flor García, Dra. Cecililia Stornelli, agradecerles infinitamente por esa ayuda y apoyo incondicional para la realización de este trabajo, y a todos los que conforman la cátedra de reproducción en pequeños muchas gracias.

Al Dr. Fernando Carrasco por todo ese apoyo y ayuda para la realización de este trabajo.

A mis padres Eliecer Segura y Mariana Ochoa, a mis hermanos Jenny, Freddy, Zenén, Eliecer, a mi cuñado Ing. Jaime Wilfrido Aldáz Cárdenas, Dr. C, a mi Prometida Julieta Duedra y a toda mi familia por siempre estar a mi lado en las buenas y en las malas y brindarme ese apoyo incondicional.

Al país de Argentina especialmente a la Universidad Nacional de la Plata, “Facultad de Ciencias Veterinarias” por darme la oportunidad de cursar y culminar mis estudios de posgrado.

A la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente en especial al departamento de Medicina Veterinaria, por el apoyo incondicional, para continuar y culminar mi Doctorado en Ciencias Veterinarias.

A los miembros del jurado Dra. Alejandra Larsen, Dr. Marcelo Rezende y Dr. Daniel Cavestany por sus valiosas recomendaciones y sugerencias.

A Vitalcan por proporcionar el alimento para los gatos, gracias.

## ÍNDICE

CAPÍTULO I.	
INTRODUCCIÓN CONTROL REPRODUCTIVO EN FELINOS MACHOS	1
Agentes esterilizantes por inyección intratesticular	4
Tratamientos Hormonales	6
Agonistas de la hormona liberadora de gonadotrofinas	7
Métodos inmunológicos. Vacunas desarrolladas contra la hormona liberadora de gonadotrofinas	10
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
CAPÍTULO II.	
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE APLICACIÓN DE LA VACUNA IMPROVAC®	
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVO GENERAL	17
HIPOTESIS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Diseño experimental	17
Animales y cuidados	18
Toma de muestra y evaluación de semen	19
Toma de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
MARCO BIOETICO DEL USO DE ANIMALES	25
RESULTADOS	25

Reacciones adversas	25
Evaluación de semen y hallazgos físicos	26
Perfil de testosterona	29
Hallazgos hematológicos y bioquímicos	30
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	37
CAPÍTULO III. EFECTO DE LA VACUNA IMPROVAC® SOBRE LA MORFOLOGÍA GONADAL	
INTRODUCCIÓN	38
OBJETIVO GENERAL	40
HIPOTESIS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Diseño experimental	41
Orquiectomía	41
Determinación del grado de desarrollo gonadal	41
Estudios morfológicos epididimales	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
MARCO BIOÉTICO DEL USO DE ANIMALES	48
RESULTADOS	49
Desarrollo de la hilera seminal	49
Estudio histológico epididimal	49
Morfometría epididimal	50

DISCUSIÓN	52
CONCLUSIÓN	55
BIBLIOGRAFÍA	56

## LISTA DE PUBLICACIONES

### TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS PERIÓDICAS CON REFERATO

1. Parámetros seminales y hematológicos en gatos domésticos inmunocastrados mediante una vacuna contra GnRH. Resultados preliminares. Segura Ochoa JJ, Nuñez Favre R, García MF, Stornelli, MC, García Mitacek MC, Carrasco Sangache WF, Stornelli, MA (2022). Comunicación corta. *Analecta Veterinaria* Vol. 42. Fecha de publicación: Octubre 2022. ISSN: 1514-2590.
2. Immunocontraception of male domestic cats using GnRH vaccine Improvac. Jagger Segura Ochoa, Romina Nuñez Favre, María Florencia García, María Cecilia Stornelli, Washington Carrasco Sangache, Ramiro Rearte, Luzbel de la Sota, María Alejandra Stornelli. *Theriogenology*, Volume 198, 1 March 2023, Pages 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.12.020>.

### TRABAJOS PUBLICADOS EN CONGRESOS

1. Evaluación de la eficacia de una vacuna anti-GnRH sobre la producción espermática en felinos domésticos. Segura Ochoa, Jorge; García, María Florencia; Tebes Micaela; Nuñez Favre, Romina; Washington Carrasco Sangache; Stornelli, María Cecilia; Stornelli, María Alejandra. XXI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Casilda, 9, 10 y 11 de diciembre de 2021.

2. Evaluación de parámetros hematológicos en gatas (*Felis catus*) tratadas con una vacuna anti-hormona liberadora de gonadotropina. Resultados preliminares. Carrasco Sangache WF, García Mitacek MC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Segura Ochoa JJ, Tebés M, Stornelli MA. XXI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Casilda, 9, 10 y 11 de diciembre de 2021.
3. Immunocontraception of male domestic cats using anti GnRH vaccine Improvac<sup>®</sup>. Segura Ochoa J, Nuñez Favre R, García MF, Stornelli MC, Carrasco Sangache WF, Tebes M, De la Sota RL, Stornelli MA. ISCFR-EVSSAR 2020+2 – June 30th- July 2nd, 2022 – Milan, Italy.
4. Efecto de la aplicación de una vacuna anti GnRH sobre las células epididimales del felino. Segura Ochoa J.; García M.F.; Nuñez Favre R.; Praderio R.G. y Stornelli M.A. XXII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas FCV-UNR 2022. Casilda, 5, 6 y 7 de Diciembre de 2022.
5. Eficacia de una vacuna anti-GnRH sobre el volumen testicular y espículas peneanas en felinos domésticos (*Felis silvestris catus*). García M.F., Nuñez Favre R., Segura Ochoa J., Pintos M.E., Stornelli M.A. XXII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas FCV-UNR 2022. Casilda, 5, 6 y 7 de Diciembre de 2022.
6. Control de la reproducción en caninos machos mediante la vacuna anti-GnRH Improvac<sup>®</sup>. García M.F., Nuñez Favre R., Segura Ochoa J., Stornelli M.C., Stornelli M.A. Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas FCV-UNR 2022. Casilda, 5, 6 y 7 de Diciembre de 2022.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

µg	Microgramo
AC	Acetato de clormadinona
C	Cuerpo
Ca	Cabeza
CaCL <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CE	Concentración espermática
Cel Cla	Células claras
Cel Osc	Células oscuras
Co	Cola
CON	Control
dl	Decilitro
DMA	Acetato de delmadinona
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
ET	Total de espermatozoides
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
im	Intramuscular
iv	Intravenosa

kg	Kilogramo
LH	Hormona luteinizante
LSM	Medida de mínimos cuadrados
m	Metros
ME	Morfología espermática
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
MOT	Motilidad
MPA	Medroxiprogesterona
NaCL	Cloruro de calcio
ng	Nanogramo
Sc	Sucutaneo
SE	Error estandar
TRT	Tratados
V	Voltios
VIA	Viabilidad
VIG	Vigor
VOL	Volumen
Zn	Zinc

$\mu\text{l}$ 

Microlitros

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Viabilidad espermática. ....	20
Figura 2. Morfología espermática. ....	21
Figura 3. Muestra de sangre para el hemograma, en un tubo con EDTA .....	22
Figura 4. Muestra de sangre para determinar los parámetros bioquímicos, se colocó en un tubo sin anticoagulante. ....	23
Figura 5. Centrifugación de la muestra de sangre para bioquímica y T2 . ....	23
Figura 6. Obtención del suero sanguíneo para determinar los parámetros bioquímicos. ....	24
Figura 7. Concentración de testosterona sérica en gatos tratados con dos dosis de la vacuna Improvac. ....	29
Figura 8. Túbulo seminífero con espermátidas redondas. Grado de maduración 1 (G1) .....	43
Figura 9. Túbulo seminífero con espermátidas alargadas. Grado de maduración 2 (G2). ....	43
Figura 10. Túbulo seminífero con espermátidas con cola. Grado de maduración 3 (G3) .....	44
Figura 11. Túbulo seminífero con espermátidas maduras. Grado de maduración 4 (G4). ....	44
Figura 12. Corte de epidídimo teñido con Hematoxilina-Azul de toluidina. Células oscuras. ....	46
Figura 13. Corte de epidídimo teñido con Hematoxilina-Azul de toluidina. Células	

claras. ....	46
Figura 14. Corte de epididimo teñido con Hematoxilina PAS. ....	47
Figura 15. Medición de una célula epididimal.....	47

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Parámetros reproductivos registrados en gatos tratados con dos dosis de la vacuna contra GnRH Improvac <sup>®</sup> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Tabla 2. Valores hematológicos y bioquímicos observados en gatos tratados con dos dosis de la vacuna contra GnRH Improvac <sup>®</sup> ..	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Tabla 3. Grado de desarrollo gonadal en gatos controles y vacunados con Improvac <sup>®</sup> .....	49
Tabla 4. Porcentajes de células claras, oscuras en epidídimos de gatos controles y vacunados con Improvac <sup>®</sup> .....	50
Tabla 5. Porcentajes de células PAS+ y PAS- en epidídimos de gatos controles y vacunados con Improvac <sup>®</sup> .....	50
Tabla 6. Largo y ancho de células epididimales de gatos controles y vacunados con Improvac <sup>®</sup> .....	51

## RESUMEN

### EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE UNA VACUNA ANTI-GNRH COMO MÉTODO INMUNO-CONTRACEPTIVO EN FELINOS MACHOS

La contracepción en el gato doméstico es considerada necesaria para prevenir la ocurrencia de enfermedades reproductivas, así como para evitar la superpoblación de gatos callejeros los cuales representan un riesgo para la población humana. Si bien el método de elección para el control reproductivo es la castración quirúrgica, es costosa y requiere cuidados postquirúrgicos, por lo cual desde hace varias décadas se han evaluado alternativas médicas para controlar la reproducción. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la vacuna anti GnRH Improvac<sup>®</sup> como método contraceptivo en gatos machos. Para ello se mantuvieron en ambiente acondicionado 12 gatos adultos (2 a 5 años) clínicamente sanos. Se realizaron muestreos hematológicos y seminales cada dos semanas, desde seis semanas antes de la vacunación (pretratamiento, n=3) hasta 24 semanas después de la primera aplicación. Los gatos se dividieron aleatoriamente en dos grupos: el grupo tratado (TRT, n=9) recibió la vacuna anti GnRH (Improvac<sup>®</sup>) y el grupo control (CON, n=3) solución salina, dos dosis con un intervalo de 4 semanas. Los gatos vacunados mostraron una disminución significativa de los parámetros seminales, volumen testicular y concentración de testosterona sérica hasta el final del estudio. Las características morfológicas testiculares y epididimales acompañaron la disminución de la concentración de testosterona sérica y la regresión del desarrollo de la hilera seminal. No se observaron efectos adversos en ninguno de los animales manteniendo los valores hematológicos y bioquímicos

dentro del rango de valores fisiológicos para la especie. Estos resultados sugieren que la vacuna Improvac<sup>®</sup> podría utilizarse como método contraceptivo en gatos domésticos.

**PALABRAS CLAVE:** gato, contraceptivo, morfología espermática, GnRH.

## SUMMARY

### EFFECT OF THE APPLICATION OF AN ANTI-GNRH VACCINE AS AN IMMUNO-CONTRACEPTIVE METHOD IN MALE FELINES

Contraception in the domestic cat is useful to prevent reproductive diseases, as well as to control overpopulation of unowned cats. Gonadectomy is the method of choice for reproductive control, however, it is expensive and requires post-surgical care. So, medical alternatives to control reproduction in cats have been evaluated. The aim of this study was to evaluate the efficacy of the anti GnRH vaccine Improvac<sup>®</sup> as a contraceptive method in male cats. Twelve clinically healthy adult cats (2 to 5 years) were kept in a conditioned environment. Hematological and seminal sampling was performed every two weeks, from six weeks before vaccination (pretreatment, n=3) until 24 weeks after. Cats were randomly divided into two groups: the treated group (TRT, n=9) received anti GnRH vaccine (Improvac<sup>®</sup>) and the control group (CON, n=3) saline, two doses with an interval of 4 weeks. The day of the first application was defined as day 0 (D0).

Vaccinated cats showed a significant decrease in seminal parameters, testicular volume, and serum testosterone concentration until the end of the study. In the same way, testicular and epididymal morphology were along to the decrease in serum testosterone concentration. No adverse effects were observed, and hematological and biochemical values were within the range of physiological values. These results suggest that Improvac<sup>®</sup> vaccine could be used as a contraceptive method in domestic cats.

**KEY WORDS:** tomcat, contraceptive, sperm morphology, GnRH.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### CONTROL REPRODUCTIVO EN FELINOS MACHOS

La contracepción en el gato doméstico es considerada necesaria para prevenir la ocurrencia de enfermedades reproductivas, así como para evitar la superpoblación y a partir de ella la ocurrencia de poblaciones de gatos ferales. Es importante considerar que el gato doméstico (*Felis silvestris catus*) es una especie altamente prolífica, esto hace que en ciertas condiciones sea necesaria la supresión de la fertilidad para controlar y evitar la sobrepoblación (Goericke-Pesch y col., 2014).

Las poblaciones de gatos callejeros, en las grandes urbes, quedan conformadas por animales que sufren las inclemencias del tiempo, falta de alimento y atención cuando están enfermos. Paralelamente, se convierten en un riesgo para la población humana en relación con transmisión de enfermedades y lesiones (mordeduras, arañazos) que puedan ocurrir cuando las personas tratan de interactuar con estos felinos.

Se han evaluados variados métodos contraceptivos para el control reproductivo en felinos, dentro de los cuales se incluyen aquellos que involucran técnicas quirúrgicas, como la orquiectomía y la vasectomía, así como los tratamientos médicos (progestágenos, andrógenos, implantes de melatonina, análogos y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina GnRH). Otro grupo de métodos contraceptivos son los inmunoccontraceptivos, que generan anticuerpos contra diferentes compuestos como el receptor de la hormona

luteinizante (LH), el antígeno espermático, las proteínas de la zona pelúcida del ovocito o, la GnRH, (Kutzler y Wood 2006; Favre y col., 2014; Goericke-Pesch y col., 2014; Asa 2018). Adicionalmente, se ha evaluado la inyección intratesticular de agentes esterilizantes, también denominada castración química (Root Kustritz, 2018).

Dentro de los métodos quirúrgicos la gonadectomía es el método de elección para el control de la reproducción en aquellos animales que no son destinados a la reproducción. La orquiectomía anula las facultades reproductivas y la acción de las hormonas sexuales, disminuyendo el riesgo de desarrollar patologías prostáticas y neoplasias (Bavera y Peñafort, 2006). De esta forma no solo se controla la reproducción y las patologías asociadas a hormonas sexuales, sino también las conductas sexuales secundarias como el marcado territorial, el vagabundeo y el comportamiento agresivo, evitando infecciones y lesiones asociadas a peleas entre machos durante la época reproductiva (Griffin y col., 2010; Cafazzo y col., 2019; Pelaez y col., 2018).

Desde el siglo pasado se demostró que la vasectomía provoca la azoospermia luego de 2 a 21 días post cirugía (Pineda y Leeds, 1976; Silva y col., 1993). Es una técnica quirúrgica segura y menos invasiva que la orquiectomía (Hernández y Moran, 2022). Esta técnica quirúrgica implica la extirpación de una porción o la oclusión de ambos conductos deferentes, evitando de esta manera que los espermatozoides sean eyaculados durante la cópula. Si bien este método permite evitar gestaciones, la producción androgénica se mantiene, por lo cual persisten las características y conductas sexuales secundarias; así como los riesgos de enfermedades dependientes de andrógenos (Johnston y col., 2020). Las razones

anteriores limitan la utilización de vasectomía como método contraceptivo.

La esterilización quirúrgica es costosa, no está disponible en muchos lugares, y requiere cuidados postquirúrgicos, además de esto los propietarios pueden ser renuentes a practicar la esterilización quirúrgica debido a compasión, cambios de comportamiento o debido al costo de la cirugía. Si bien hay planes estatales gratuitos de esterilización los mismos no logran esterilizar a un número de animales tal que permita evitar la formación de poblaciones de gatos ferales. Esto hace que sean necesarios otros métodos económicos, seguros y eficaces para controlar la reproducción (Massei & Miller, 2013; Root Kustritz, 2018).

Dentro de los tratamientos médicos varios métodos contraceptivos se han probado en felinos con éxito variable tanto en el control de la reproducción como en la ocurrencia de efectos colaterales que comprometan la salud de los animales. Los métodos investigados van desde tratamientos hormonales con progestágenos, andrógenos, implantes de melatonina, análogos y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hasta la inmunocntracepción mediante vacunación para formar anticuerpos contra: la GnRH, el receptor de la hormona luteinizante (LH), el antígeno espermático y las proteínas de la zona pelúcida del ovocito (Kutzler and Wood 2006, Favre y col., 2014, Goericke-Pesch y col. 2014, Asa 2018). Adicionalmente, se ha estudiado la aplicación de agentes esterilizantes por inyección intratesticular para castración química, que evitan la espermatogénesis, pero pueden generar complicaciones, a veces graves (Root Kustritz 2018).

### **Agentes esterilizantes por inyección intratesticular**

En varios países se usa la castración química (Muñoz y col., 2011), la que forma parte de métodos de control poblacional en Latinoamérica (Oliveira y col., 2012). La inoculación de agentes químicos en los testículos induce destrucción de los túbulos seminíferos y de las células de Leydig, descenso de la producción de testosterona y posterior atrofia testicular (Başa y Canpolat, 2019). Estas sustancias también se inyectan en epidídimos o conductos deferentes induciendo azoospermia por necrosis de las paredes tubulares (Singh y col., 2020; Vargas y col., 2020). La castración química en relación a algunas de sus características (método sencillo de realizar y económico) es un método interesante para programas de esterilización masiva en animales domésticos y silvestres ya que generalmente una sola aplicación es suficiente para inducir azoospermia (Kutzler y Wood, 2006). Sin embargo, la castración química produce inflamación y dolor que puede llevar a dermatitis y ulceraciones escrotales, e inducen reacciones sistémicas como letargia, pérdida de apetito, vómitos y diarrea (Basa y Canpolat, 2019). Las sustancias empleadas en la esterilización química, cuando se administran volúmenes excesivos, incrementan el riesgo de necrosis de la piel del escroto (Oliveira y col., 2012; Leoci y col., 2014). Varias sustancias químicas han sido efectivas para inducir infertilidad entre las que se pueden mencionar las siguientes.

#### *Digluconato de clorhexidina*

Las inyecciones intraepididimales de una solución acuosa de digluconato de clorhexidina al 4,5% en la cola de los epidídimos produjo oligospermia o azoospermia en el 90% de los gatos durante 140 días. El método de vasectomía

química por inyección intraepididimal de agentes esclerosantes parece ser seguro y adecuado para programas de esterilización a gran escala para controlar el crecimiento de la población felina (Pineda y Dooley, 1984).

#### *Cloruro de calcio*

En gatos el tratamiento intratesticular con 40 mg cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) fue eficaz para inducir azoospermia. A nivel histológico se observó atrofia de células intersticiales, degeneración y calcificación de los túbulos seminíferos 60 días luego del tratamiento. Sin embargo, se observaron signos sistémicos como decaimiento, edema escrotal y dolor testicular (Baran y col., 2010). Asimismo, Jana y Samanta (2011), observaron azoospermia y reducción en la concentración de testosterona sérica luego de una única dosis intratesticular de 0,25ml de  $\text{CaCl}_2$  (al 5, 10 o 20%), evidenciando necrosis testicular completa con reemplazo por tejido fibroso. Por su parte, Paranzini y col. 2018, evaluaron la efectividad de una dosis de  $\text{CaCl}_2$  al 20% con DMSO al 0,5%, demostrando azoospermia y reducción del 50% del volumen testicular, 80 días luego del tratamiento. El estudio histológico testicular reveló diferentes grados de degeneración y necrosis de los túbulos seminíferos, con vacuolización de las células de Sertoli.

#### *Gluconato de Zinc*

Diferentes productos conteniendo 13,1 mg de gluconato de Zn/ml neutralizado a pH 7 con arginina están disponibles para su utilización en felinos. Entre los cuales puede mencionarse *EsterilSol*, cuya administración en gatos de seis meses de edad, redujo las concentraciones de testosterona en suero sanguíneo y

provocó atrofia testicular y azoospermia sin observarse reacciones en el lugar de la inyección durante los 12 meses de seguimiento (Kutzler 2015). La administración intratesticular de *Testoblock* fue eficaz para suprimir la espermatogénesis 60 a 120 días después del tratamiento, observándose disminución del tamaño testicular y atrofia de las espículas peneanas en la mayoría de los animales tratados. Adicionalmente se evidenciaron cambios conductuales como disminución de la agresión, de hábitos de vagabundeo, monta y marcado territorial con orina; persistiendo estas actividades en los gatos controles. La evaluación histológica testicular de los animales tratados reveló escasas células germinales en el epitelio de los túbulos seminíferos, que en su mayoría estaban atrofiados. Algunos túbulos se encontraron aumentados de tamaño a expensas de expansión de su luz, pero con menor cantidad de células germinales, espermátidas no desarrolladas, y células de Sertoli con vacuolización intracitoplasmática y membrana basal engrosada. También se evidenciaron hialinizaciones del tejido intertubular e infiltraciones de colágeno, fibroblastos y células inflamatorias rodeando las células de Leydig (Oliveira y col., 2013). Recientemente se ha evaluado la inyección intratesticular de glicerol-gluconato Zn (0,7 ml de glicerol 70% y 0.3 ml de gluconato de Zn (4.5 mg), resultando efectivo para inducir azoospermia en todos los individuos, conjuntamente con una reducción del 65% el tamaño testicular y del 76% del tamaño de las espículas peneanas 46 días luego del tratamiento (Hernández y Moran, 2022).

### **Tratamientos Hormonales**

El tratamiento con progestágenos (Acetado de megestrol, acetado de medroxiprogesterona) es frecuentemente utilizado en para reducir el marcado

territorial, la libido y la agresividad en gatos machos (Kutzler, 2006). Un estudio realizado en dos gatos logró el control completo del interés sexual y del comportamiento relacionado mediante una dosis oral semanal de 5 mg de Medroxiprogesterona (MPA), acetato de clormadinona (AC) o acetato de delmadinona (DMA). Al utilizar dosis menores, 2,5 mg el uso de DMA logró igual efecto, pero el uso de CAP o MA no fue efectivo en dosis reducida (Jöchle y Jöchle, 1975). El efecto de estos compuestos sobre la espermatogénesis no ha sido publicado. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, al igual que en las hembras, en los felinos machos los progestágenos han sido asociados a efectos adversos graves como tumores mamarios (Skorupski, 2005; Jacobs, 2010), fibroadenomatosis mamaria y diabetes mellitus (Goericke-Pesch y col., 2010).

### **Agonistas de la hormona liberadora de gonadotrofinas**

#### *Deslorelina*

La deslorelina es un agonista de la GnRH, su utilización mediante implantes de liberación lenta, continua y prolongada produce desensibilización de la adenohipófisis a esa hormona y consecuentemente, se inhibe la producción y secreción de gonadotropinas hipofisarias, y la esteroidogénesis (Trigg y col., 2006).

En gatos, los implantes de deslorelina (4,7 mg; Suprelorin<sup>®</sup>) provocaron una disminución significativa de la concentración de testosterona en suero sanguíneo y del volumen testicular a partir de la cuarta semana de aplicado el implante. Momento en el cual se observó en todos los gatos disminución de la libido, monta y el marcaje de territorio con orina. Las espículas peneanas evidenciaron atrofia

completa 10 semanas después de colocado el implante (Goericke-Pesch y col., 2011; Goericke-Pesch y col., 2014).

Resultados similares fueron observados por Novotny y col. (2012), quienes además reportaron una disminución gradual y progresiva del conteo espermático desde el segundo al cuarto mes de aplicado el implante y, el restablecimiento de la espermatogénesis 4 meses después de removido el implante. Un estudio posterior reveló que la azoospermia en los animales tratados fue alcanzada entre 5 a 7 meses de aplicado el implante (Novotny y col., 2014).

Además, un aumento de la concentración y del recuento total de espermatozoides ha sido observado un mes después de colocado el implante; este incremento es seguido por una drástica disminución de los de los parámetros seminales, suprimiéndose la producción espermática durante 22 a 25 meses (Nuñez Favre y col., 2018). Similares resultados fueron obtenidos con la utilización de implantes de mayor concentración (9,4 mg) siendo el periodo de eficacia hasta 24 a 28 meses (Romagnoli y col., 2019). El uso de un implante agonista de GnRH en gatos parece ser una alternativa para el control reproductivo reversible a largo plazo, ya que demostró ser efectivo y no provocar reacciones adversas.

### *Buserelina*

La administración intravenosa de buserelina (25 µg), disminuyó la concentración de testosterona en suero sanguíneo, el volumen testicular y produjo desaparición de las espículas del pene a partir de la cuarta semana de aplicado el tratamiento (Goericke-Pesch y col., 2013).

### *Melatonina*

En los animales que presentan estacionalidad reproductiva, es decir que alternan periodos de actividad sexual seguidos por periodos de reposo a lo largo del año, las variaciones en la cantidad de horas luz diarias (fotoperiodo) es esencial para regular la duración e intensidad de estos periodos. El estímulo físico generado por las horas luz es captado por el sistema nervioso central a través de la retina y es traducido por la glándula pineal a un estímulo hormonal, la melatonina.

La secreción nocturna de esta hormona refleja la duración de la noche, regulando así la secreción pulsátil de GnRH desde el hipotálamo. En los felinos, esta hormona disminuye la intensidad y frecuencia de los pulsos secretorios de GnRH, regulando de esta forma la actividad reproductiva (Nuñez Favre, 2013). Es así como esta hormona ha sido utilizada en esta especie como método anticonceptivo de administración oral (Kutzler, 2015) o mediante implantes de liberación lenta (Nuñez Favre y col., 2014).

En gatos machos adultos, un implante de 18 mg de melatonina disminuyó temporalmente la producción y la calidad espermática durante  $120 \pm 15$  días, sin que se manifiesten efectos colaterales adversos. Si bien los implantes fueron efectivos para disminuir significativamente la calidad de semen, los animales continuaron siendo potencialmente fértiles. La calidad seminal recobró los valores previos al tratamiento a los  $140 \pm 7$  días de aplicado el implante (Favre y col., 2014).

### **Métodos inmunológicos. Vacunas desarrolladas contra la hormona liberadora de gonadotrofinas**

La castración inmunológica es una alternativa exitosa a otros métodos de control de la reproducción y su efecto es temporal (Bradford y Mellencamp, 2013). La inmunocostrucción utiliza la capacidad del sistema inmune para generar anticuerpos contra hormonas o células reproductivas para producir esterilidad y pérdida del comportamiento sexual en machos y hembras (Courchamp and Cornell 2000; Rhodes, 2017). El efecto dependerá de la inmunogenicidad y potencial contraceptivo de la vacuna diseñada. Asimismo, el adyuvante utilizado y la vía de administración, también son factores que intervienen en la potencial respuesta inmunológica (Sharma y col., 2012). Cuando pasa el efecto de la inmunización y los niveles de anticuerpos son insuficientes para unirse bloquear el blanco farmacológico, por ejemplo, la GnRH endógena, esta hormona estimula a la adenohipófisis y se producen FSH y LH, lo que lleva al retorno de la función reproductiva (Bradford y Mellencamp, 2013). En terneros prepúberes (3 a 6 semanas de edad) la inmunización contra GnRH disminuyó significativamente las concentraciones hormonales de LH y de testosterona, el crecimiento de los testículos y la circunferencia escrotal, retrasando además la edad de aparición de la pubertad (Janett y col., 2012). En caninos la castración inmunológica mediante vacunas dirigidas contra GnRH ha sido utilizado para el control reproductivo (Elhay y col., 2007; Bradford y Mellencamp, 2013).

En el gato doméstico, se ha desarrollado una vacuna contra la GnRH conjugada con toxoide tetánico u ovoalbúmina que ha tenido resultados variables. Si bien el conjugado con toxoide tetánico no generó infertilidad, el conjugado con

ovoalbúmina produjo una supresión pasajera en la concentración de testosterona sérica y de la producción espermática (Kutzler and Wood 2006; Rhodes, 2017).

La vacuna contra la GnRH GonaCon<sup>®</sup>, fue producida para control de fertilidad en animales silvestres, específicamente para venados; sin embargo, ha probado tener cierta efectividad en gatos. El primer diseño de esta vacuna utilizó GnRH sintética conjugada con metaloproteínas del molusco *Megathura crenulata* para potenciar su acción inmunógena, combinada con AdjuVac<sup>®</sup>, adyuvante de Freud's completo modificado por contener menor concentración de *Mycobacterium avium* (Levy y col. 2004, Levy 2011). Administrada a dosis única por vía intramuscular en machos y hembras, produce una titulación de anticuerpos elevada, con supresión de la fertilidad, pero la respuesta muestra gran variación entre individuos. Asociado a la administración de la vacuna se observó en el sitio de aplicación, la formación de granulomas estériles e indoloros (Levy y col. 2004, Levy 2011). Este efecto secundario motivó la modificación de la formula por lo cual se utilizó otra proteína transportadora del molusco *Concholepas concholepas* y se incrementó la concentración antigénica. Si bien esta nueva formulación fue efectiva para producir altos títulos antigénicos y suprimir la actividad reproductiva indujo la formación de masas granulomatosas en mayor proporción que la formulación anterior (Vansandt y col. 2017).

Otro tipo de vacuna contra la GnRH es Improvac<sup>®</sup>, formulada a base de un péptido sintético análogo a la GnRH conjugado con toxoide de difteria, cuyo adyuvante es una emulsión acuosa en aceite, la cual promueve buena respuesta antigénica contra la hormona liberadora de hormonas sexuales suprimiendo de esta forma la función reproductiva temporariamente. Esta vacuna se encuentra aprobada

para uso en cerdos macho enteros para evitar el olor y sabor asociado a hormonas sexuales que deprecian el valor de la carne (Zamaratskaia y col. 2008). Su efecto es comparable a los de una castración quirúrgica, disminuye las concentraciones de hormonas sexuales y, por lo tanto, reduce la conducta sexual y la agresividad (Andersson y col. 2012). El efecto de esta vacuna sobre la función reproductiva también se ha observado en yeguas y corderos (Janett y col. 2003, Earl y col. 2006, Botha y col. 2008).

En perros adultos se utilizó una única dosis de Improvac<sup>®</sup> (200 µg de GnRH-conjugado) observándose disminución de la concentración de testosterona sérica a partir de la segunda semana alcanzando valores basales a partir de la sexta semana. Conjuntamente, se observó azoospermia a partir de la cuarta semana, la cual se mantuvo hasta la decimosexta semana, momento en que se dio por finalizada la experiencia. Durante este estudio no se observaron efectos secundarios indeseables (Ajadi y Gazal, 2016). La aplicación de dos dosis de la vacuna contra la GnRH, con un intervalo de 30 días, produjo disminución gradual y progresiva de la motilidad y concentración de los espermatozoides en el eyaculado a partir del día siete de la primera aplicación, alcanzándose azoospermia de manera variable a partir de los 15, 30 o 45 días de la segunda aplicación (Elisane y col., 2017).

Los resultados observados en estas especies sugieren que la acción inmunosupresora gonadal inducida por la vacuna Improvac<sup>®</sup> podría ser de aplicabilidad en el control reproductivo de felinos domésticos. Sin embargo, su eficacia aún no ha sido probada en felinos domésticos, es así como se plantearon los siguientes objetivos.

**OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la eficacia de la vacuna anti-GnRH (Improvac<sup>®</sup>) como método contraceptivo en gatos machos.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estudiar el efecto de la aplicación de dos dosis de vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre la concentración sérica de hormonas esteroideas sexuales.
- Estudiar el efecto de la aplicación de vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre el desarrollo de la hilera seminal.
- Estudiar el efecto de la aplicación de vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre la morfología (estructura histológica, morfometría y volumen) de los testículos.

## CAPITULO II

### EVALUACIÓN DEL EFECTO DE APLICACIÓN DE LA VACUNA IMPROVAC®

#### INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de gatos libres o asilvestrados sin propietario son un problema de alto impacto económico y social a nivel mundial (Robertson, 2008). Las poblaciones de gatos en libertad generan problemas asociados con la salud pública, la propagación de enfermedades zoonóticas, la transmisión de enfermedades a otros animales, incluidos los gatos domésticos, la depredación de la vida silvestre y el bienestar de ellos mismos (Robertson, 2008). Teniendo en cuenta que el gato doméstico (*Felis silvestris catus*) es una especie muy prolífica que puede producir una camada de 1 a 6 gatitos 1,6 veces al año (Nutter y col., 2004), el control reproductivo es crucial para hacer frente a la sobrepoblación y sus problemas asociados (Goericke-Pesch y col., 2014). Sin embargo, a pesar de que la población de gatos libres o sin propietario crece exponencialmente sin intervención y produce muchos efectos indeseables (Nutter y col., 2004; Budke y Slater, 2009), el manejo de las comunidades de gatos libres es controvertido (Robertson, 2008; McCarthy y col., 2013). La eutanasia se ha utilizado para evitar el sufrimiento innecesario de los gatos sin propietario y prevenir la depredación de la vida silvestre (Robertson, 2008; Carrión y col., 2008; Phillips y col., 2005). Sin embargo, la eutanasia de animales sanos no es una opción, por lo cual el control de la tasa de natalidad se convierte en el objetivo principal. Es así como, la gonadectomía se

convierte en el método de elección para el control reproductivo de aquellos animales que no están destinados a la reproducción. Además, cuando se realiza a una edad temprana reduce el riesgo de infecciones y lesiones asociadas a las peleas entre machos durante la época reproductiva. Asimismo, los gatos castrados tienen menos probabilidades de ser abandonados ya que se ha identificado que estar sexualmente intactos contribuye al abandono (Cafazzo y col., 2019). También se ha observado que la castración en gatos disminuye la agresividad (Griffin B, 2011; Cafazzo y col., 2019). Sin embargo, la esterilización quirúrgica es costosa, no está ampliamente disponible y requiere atención posquirúrgica. Además, los propietarios pueden ser reacios a realizar la esterilización quirúrgica por compasión, por los cambios de comportamiento que pueden ocurrir o por el costo de la cirugía. Aunque existen planes de esterilización estatales gratuitos, éstos no logran castrar suficientes animales para evitar la formación de poblaciones de gatos asilvestrados. Este hecho hace necesario el uso de métodos de control reproductivo alternativos, de bajo costo, seguros y efectivos (Griffin B, 2012; Root Kustritz, 2018).

Los estudios sobre protocolos terapéuticos para el control médico de la reproducción se han llevado a cabo durante varias décadas, lo que demuestra que la anticoncepción no quirúrgica puede combinarse con programas de castración quirúrgica para manejar poblaciones de animales callejeros (Robertson, 2008; Kutzler y Wood, 2006; Palmer y col., 2018). Los métodos anticonceptivos estudiados en felinos incluyen tratamientos hormonales (progestágenos, andrógenos, implantes de melatonina, análogos o antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina -GnRH-) o la generación de anticuerpos frente a diferentes sustancias implicadas en la reproducción (hormona liberadora de

gonadotropina, receptor de hormona luteinizante -LH-, antígeno espermático y proteínas de la zona pelúcida del ovocito), así como la castración química, a través de la aplicación de agentes esterilizantes mediante inoculación intratesticular o intraepididimal (Goericke-Pesch y col., 2014; Root Kustritz, 2018; Kutzler y Wood, 2006; Giménez y col., 2009; Asa, 2018). Aunque estos métodos han sido efectivos para el control de la reproducción, su aplicación a gran escala es dificultoso debido a su alto costo, a la frecuencia de aplicación y/o a los efectos secundarios sobre la salud animal.

La vacuna Improvac<sup>®</sup> ha sido desarrollada utilizando un análogo de GnRH asociado a toxoide diftérico, con lo cual se logra estimular la producción de anticuerpos contra la hormona GnRH, evitando la unión de la hormona endógena a los receptores gonadotróficos hipofisarios (Mechas y col., 2013). En consecuencia, las hormonas gonadotróficas LH y FSH se reducen, lo que da como resultado la disminución o inhibición de la espermatogénesis en los machos y una falla en el desarrollo folicular y en la ovulación en las hembras (Benavides y col., 2012). Sin embargo, aún se desconoce su efecto en el gato doméstico, la dosis efectiva para lograr la infertilidad y la duración de su efecto. De esta forma, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la vacuna contra la GnRH Improvac<sup>®</sup> sobre la producción espermática en gatos adultos. Basado en la hipótesis de que la vacuna Improvac<sup>®</sup> reduce la secreción de hormonas hipofisarias sexuales, y en consecuencia la producción de testosterona y el desarrollo de la espermatogénesis, permitiendo el control de la reproducción sin producir efectos secundarios adversos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre la calidad de semen.

Estudiar el efecto de la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre los valores hematológicos y bioquímicos.

Estudiar el efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre la concentración sérica de hormonas esteroideas sexuales.

## **HIPOTESIS**

La aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> disminuye la producción espermática, la síntesis y secreción de hormonas sexuales, manteniendo los valores hematológicos y bioquímicos dentro del rango reportado para la especie.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño experimental**

Se incluyeron en el experimento gatos machos sexualmente maduros alojados en un ambiente controlado. Los parámetros reproductivos y las muestras hematológicas se registraron cada dos semanas, desde seis semanas antes de la vacunación hasta 24 semanas después de la primera dosis. Después del período de aclimatación, se recolectaron las muestras pretratamiento (n=3), luego los gatos se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Al grupo tratado (TRT, n=9) se le administró la vacuna contra la GnRH (Improvac<sup>®</sup>, Zoetis Belgium SA, 0,5 ml sc) dos veces con un intervalo de 4 semanas, y al grupo control (CON, n=3) se le

administró solución salina (0,5 ml sc) con la misma frecuencia e intervalo que el grupo tratado. Las vacunaciones se realizaron el día 0 (D0) y el día 28 (D28) según las instrucciones del fabricante. El día 0 del estudio se definió como el día de la inmunización primaria con la vacuna o el placebo.

### **Animales y cuidados**

Se seleccionaron doce (n=12) gatos machos adultos, mestizos, de 2 a 5 años con un peso promedio de 4,2 kg. Cada gato fue alojado en jaulas individuales (0,75 x 1,50 x 2,00 m) y alimentados con alimento comercial para gatos (Balance Control de pH; Vitalcan, Argentina) y agua *ad-libitum*. Los gatos se alojaron en una habitación acondicionada, con iluminación artificial a través de lámparas led (150 a 300 lux a nivel del piso) y ciclos de fotoperíodo alterno cada 2 meses para preservar la calidad del semen. Antes del inicio del estudio, los gatos se mantuvieron en el ambiente durante 187 días para familiarizarse con el nuevo ambiente (45 días) y para evidenciar el efecto del programa de iluminación sobre la producción espermática (dos ciclos espermatogénicos & maduración, 142 días; Nuñez Favre y col., 2014).

Una vez por semana a todos los animales se les realizó un examen físico general para controlar su estado de salud. Además, se registraron diariamente las características de comportamiento, la ingesta de alimentos y agua, y la producción de heces y orina. Adicionalmente, durante los cinco días posteriores a la administración del tratamiento se midió y registró diariamente la temperatura rectal.

### **Toma de muestra y evaluación de semen**

Transcurrido el período de aclimatación al nuevo ambiente y manejo lumínico, se comenzó con la toma de muestras. La recolección de semen se realizó cada 2 semanas en cada gato utilizando un electroeyaculador manual (SireMaster, Ultra-Electronic ICE Inc, Manhattan, EEUU; Figura 1). Se colectaron tres muestras previo a la aplicación de la primera dosis vacunal (D0), continuando los muestreos durante 24 semanas. Para realizar la técnica de electroeyaculación los animales fueron anestesiados con dexmedetomidina (10 µg/kg im; Dexdomitor, Orion Pharma, Finlandia) y ketamina (10 mg/kg im; Ketamine 50, Holliday-Scott SA, Argentina). Se utilizó la técnica descrita por Howard y col. (1990) en la cual los animales recibieron un total de 80 estímulos divididos en 3 series con 2 a 3 minutos de descanso entre las mismas. La primera serie consiste en 10 estímulos a 2 voltios (V), 10 estímulos a 3V y 10 a estímulos 4V. La segunda serie consiste en 10 estímulos a 3V, 10 a 4V y 10 a 5V. La última serie consiste en 10 estímulos a 4V y 10 a 5V (Howard y col., 1990). La muestra de semen se recolectó en un tubo de 1,5 ml precalentado a 37°C y se evaluó de inmediato. Se usaron 10 µl de semen para estimar la motilidad (MOT, %) y el vigor (VIG, 0 a 5) subjetivamente bajo un microscopio óptico equipado con platina térmica con un aumento de 400 X en 5 a 7 campos microscópicos (Nuñez Favre y col., 2018; García y col., 2020). El volumen (VOL, µl) de la eyaculación se midió con micropipeta de volumen variable (10 a 100 µl). La concentración espermática (CE, x 10<sup>6</sup>/ml) se evaluó con una cámara de Neubauer mediante la dilución de 5 µl de semen en 1 ml de solución fisiológica formolada. El VOL multiplicado por CE proporciona el número total de espermatozoides en el eyaculado (ET, x 10<sup>6</sup>; García y col., 2020). La viabilidad de los espermatozoides (VIA, % de espermatozoides vivos) se evaluó mezclando 10

μl de semen con 10 μl de colorante eosina-nigrosina sobre un portaobjetos durante 30 segundos sobre platina térmica a 37°C. Se realizó un extendido y se contaron 100 células por microscopía óptica a 1000 X (Figura 1). Para la morfología espermática (ME, % de espermatozoides con morfología normal) se realizó un extendido con 10 μl de semen y se tiñó con Tinción 15® (Biopur, Argentina). Se registraron 150 espermatozoides al azar bajo un microscopio óptico a 1000 X (Figura 2).

Luego de la evaluación de semen, se registró la calidad de las espículas peneanas (presencia, reducción o ausencia), así como la longitud (a), el ancho (b) y la profundidad (c) testicular para calcular el volumen testicular usando la ecuación de una esfera modificada:  $\text{volumen testicular} = 4/3 * \pi * (\frac{1}{2} a * \frac{1}{2} b * \frac{1}{2} c)$  en  $\text{mm}^3$  (Goericke-Pesch y col., 2011).



Figura 1.: Viabilidad espermática. Se observa un espermatozoide vivo (flecha negra) y dos espermatozoides muertos (flecha blanca); tinción eosina-nigrosina, 1000X.

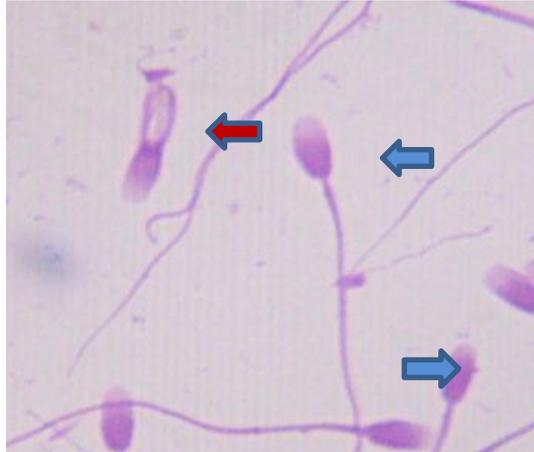


Figura 2. Morfología espermática. Se observan espermatozoides felinos con morfología normal (flecha azul) y un espermatozoide con Defecto de “Dag” menor (flecha roja): caracterizado por el super-enrollamiento de la cola sin involucrar la cabeza; tinción 15<sup>®</sup> Biopur SRL, 1000X

### **Toma de muestras sanguíneas y determinaciones hormonales**

Concluido el registro de las medidas testiculares se tomó una muestra de sangre a cada gato para realización de hemograma, bioquímica sanguínea y determinación de la concentración de testosterona sérica. La muestra para el hemograma se colocó en un tubo con EDTA (Figura 3) y posteriormente se procesó en un analizador hematológico semiautomático (Sysmex KX-21), el conteo diferencial de leucocitos se realizó en un extendido teñido con May-Grünwald Giemsa (Stornelli y col., 2012). La muestra para determinación de glucosa se colocó en un tubo EDTA/Fluoruro y su concentración se determinó en un espectrofotómetro (Metrolab plus 1600 Clinical Analyzer) mediante el reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa (BioSystems).

Finalmente, 2 ml de la muestra de sangre se colocaron en un tubo sin anticoagulante (Figura 4), se centrifugaron (Figura 5) y el suero se dividió en dos alícuotas (Figura 6) y se almacenó a -20 °C. Una alícuota se destinó a la determinación de los parámetros bioquímicos (urea, alanina aminotransferasa,

proteína total y albúmina), y la otra a la determinación de concentración de testosterona sérica. Los parámetros bioquímicos se determinaron con un autoanalizador (InCCA; DICONEX Ltd., Quilmes, Argentina) utilizando reactivos comerciales (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina), y la concentración de testosterona se determinó mediante quimioluminiscencia (Elecsys<sup>®</sup>, Progesterone II; Roche, Mannheim, Germany; los límites de detección fueron 0,025–15,0 ng/ml, 0,085–52,0 nmol/l).



Figura 3. Muestra de sangre para el hemograma, se colocó en un tubo con EDTA

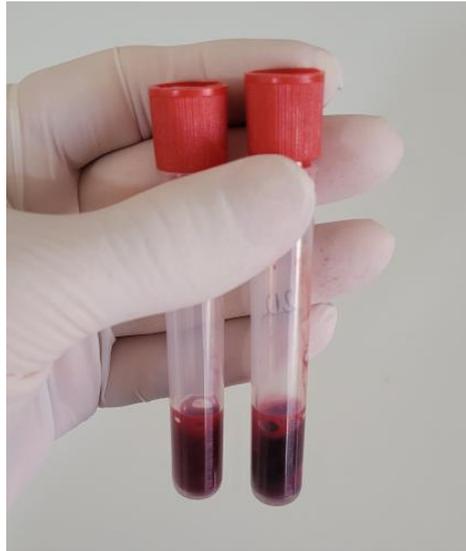


Figura 4. Muestra de sangre para determinar los parámetros bioquímicos, se colocó en un tubo sin anticoagulante.



Figura 5. Centrifugación de la muestra de sangre para bioquímica y T2.



Figura 6. Obtención del suero sanguíneo para determinar los parámetros bioquímicos.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las muestras pretratamiento (6 semanas antes del D0, n=3) + Día 0 (día de la inmunización primaria) se agruparon como Día 0. Los datos del grupo CON y el Día 0 se compararon con las muestras de las semanas 8, 16 y 24 (final de estudio). Se utilizó el Software de Análisis Estadístico (SAS 9.4). La variabilidad de los datos se explicó mediante un modelo de regresión lineal ajustado por tratamiento como predictor fijo único mediante medidas repetidas en el tiempo mediante Proc GLIMMIX. La variabilidad en la concentración de espermatozoides y la cantidad total de espermatozoides se evaluó ajustando un modelo de regresión generalizada con una distribución binomial negativa que incluyó los mismos predictores y estructura que el modelo de regresión lineal. Los resultados se presentan como

medias de mínimos cuadrados (LSM)  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para todos los análisis, se consideró significativo un valor P ajustado de  $\leq 0,05$ .

## **MARCO BIOETICO DEL USO DE ANIMALES**

Este experimento se realizó respetando las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y con las recomendaciones de la National Academy Science, Washinton DC, USA referidas al uso de gatos como animales de laboratorio. Estas recomendaciones fueron tenidas en cuenta en lo referente a la atención médico-veterinaria, ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas y toma de muestras (Garber y col, 2011). Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados siguiendo las indicaciones sobre el cuidado de los animales de experimentación indicados en la Guía internacional de principios para investigaciones biomédicas que involucran animales (CIOMS & ICLAS, 2012). Además, se respetaron las recomendaciones sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) FCV. UNLP (Protocolo número: 101-8-19T).

## **RESULTADOS**

### **Reacciones adversas**

Ninguno de los animales manifestó cambios en la ingesta de alimento y agua, manteniendo estable su peso durante todo el período de estudio (D0:  $4,12 \pm 0,42$  vs. SEM 24:  $4,07 \pm 0,37$  kg). Un aumento de la temperatura corporal, de 0,5 a

1°C, fue observado 24 a 48 horas después de aplicada la vacuna. No se detectó inflamación en el lugar de la inyección en ninguno de los gatos. Sin embargo, en todos los animales se palparon reacciones tisulares indoloras subcutáneas en el sitio de aplicación de la vacuna 10 a 15 días posteriores a la inoculación. Estas lesiones desaparecieron dentro de los 21 días, excepto en un gato, que mostró una reacción tisular de mayor tamaño y resolvió a los 45 días.

### **Evaluación de semen y hallazgos físicos**

Al inicio del estudio los parámetros seminales de todos los gatos se encontraron dentro del rango de valores comunicados para la especie.

Si bien se observó una reducción significativa en los parámetros seminales en todos los gatos tratados, mostrando uno de ellos una respuesta más lenta al tratamiento, solo uno presentó azoospermia. En todos los gatos tratados, los parámetros seminales comenzaron a disminuir de forma gradual y progresiva a partir de la semana 8 hasta el final del estudio. En la tabla 1 se puede observar el descenso de la motilidad progresiva, el vigor, el volumen del eyaculado y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales a la semana 8. Más tarde, a la semana 16 se observó una disminución significativa de la concentración y de la cantidad de espermatozoides totales. Mientras que la viabilidad espermática evidenció una disminución significativa en la semana 24.

En comparación con los valores seminales previos al tratamiento, los parámetros seminales más afectados fueron la concentración espermática y la cantidad de espermatozoides totales, que disminuyeron 89,5 y 91,6%, respectivamente; seguidos por la motilidad (74%), la viabilidad (60%), el vigor

espermático (48%), el volumen del eyaculado (31%) y la morfología espermática (13%).

Por otra parte, el volumen testicular disminuyó significativamente en la semana 8, continuando progresivamente hasta el final del estudio (tabla 1), representando una disminución del 21% a la semana 8, del 37% en la semana 16 y del 45 % en la semana 24 comparado con los valores del inicio del estudio (D0).

Las espículas peneanas comenzaron a disminuir en todos los gatos tratados a partir de la semana 8, seguidas de una reducción progresiva hasta una atrofia casi completa al final del estudio.

Tabla 1. Parámetros reproductivos registrados en gatos tratados con dos dosis de la vacuna contra GnRH Improvac®.

Parámetros reproductivos	Momento de la evaluación			
	Día 0	Semana 8	Semana 16	Semana 24
Evaluación de semen				
Motilidad (%)	71,06 ± 6,84	47,78 ± 8,10*	21,67 ± 9,92**	18,33 ± 14,03**
Vigor (0-5)	3,87 ± 0,34	2,89 ± 0,36*	2,17 ± 0,43*	2,00 ± 0,62*
Volumen (μl)	67,83 ± 6,98	43,89 ± 9,08*	35,83 ± 11,12*	46,66 ± 15,73
Concentración (x10 <sup>6</sup> /ml)	139,57 ± 25,75	158,80 ± 51,75	46,67 ± 21,26*	14,61 ± 8,77**
Cantidad de espermatozoides totales (x10 <sup>6</sup> )	8,36 ± 1,37	6,83 ± 2,05	1,58 ± 0,76**	0,70 ± 0,52**
Viabilidad (%)	62,56 ± 3,53	55,00 ± 4,92	48,67 ± 8,04	25,00 ± 9,84**
Morfología espermática (%)	54,46 ± 1,51	49,00 ± 1,84*	49,11 ± 3,45	47,13 ± 4,87
Volumen testicular (mm <sup>3</sup> )	2774,82 ± 118,35	2186,72 ± 145,60*	1737,02 ± 178,32**	1518,88 ± 252,18**

Los valores se expresan como medias de mínimos cuadrados ± error estándar (LSM ± SE). Las diferencias se indican \* P ≤ 0,05  
\*\*P ≤ 0,001.

### Perfil de testosterona

La concentración sérica de testosterona en el grupo control se mantuvo dentro del rango de valores normales establecidos para la especie, fluctuando entre 3,19 y 6,31 ng/dl durante todo el periodo de estudio. Similares variaciones fueron observadas en las muestras pretratamiento de los gatos tratados sin observarse diferencias significativas con los controles ( $4,67 \pm 0,4$  vs.  $4,49 \pm 0,7$  ng/dl respectivamente;  $P > 0,83$ ). Mientras que en la totalidad de los gatos tratados ( $n=9$ ) las concentraciones séricas de testosterona cayeron a niveles basales desde la semana 6 hasta la semana 20 luego del D0, observándose un ligero aumento estadísticamente no significativo a partir de la semana 22 hasta el final del estudio (Figura 8).

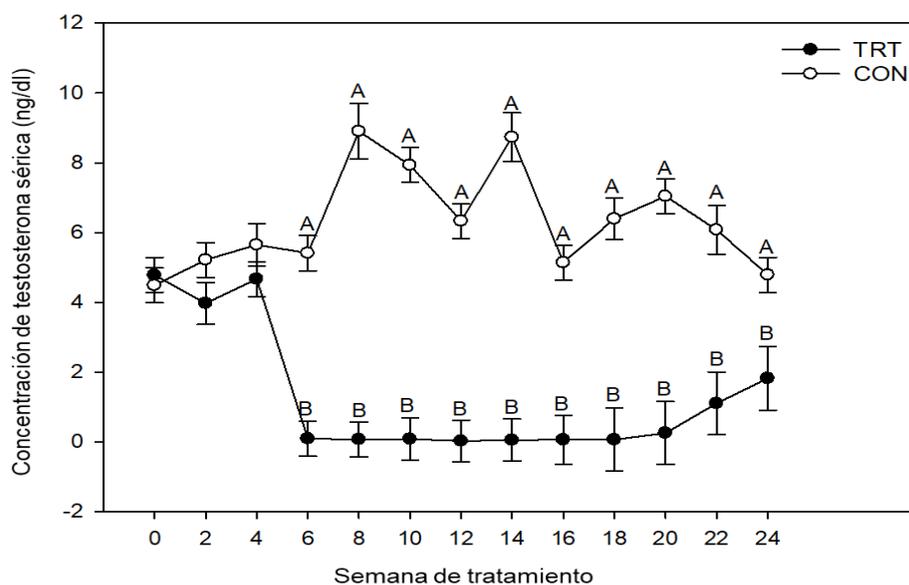


Figura 1. Concentración de testosterona sérica en gatos tratados con dos dosis de la vacuna Improvac. TRT, tratados. CON, controles. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\leq 0.05$ ).

### **Hallazgos hematológicos y bioquímicos**

Los valores hematológicos y bioquímicos correspondientes a los muestreos previos al tratamiento se encontraron dentro de los parámetros normales descritos para los gatos domésticos en la totalidad de los animales (Cinkenbeard & Meinkoth, 2000). Los valores correspondientes a estas evaluaciones no mostraron variaciones en los gatos pertenecientes al grupo CON. Sin embargo, los gatos TRT evidenciaron una disminución paulatina en la concentración de hemoglobina y en el conteo de eritrocitos a partir de la semana 8 y del hematocrito a partir de la semana 16, hasta el final del estudio (Tabla 2). A pesar de estas variaciones los valores se mantuvieron dentro de los rangos de referencia para la especie (Cinkenbeard & Meinkoth, 2000; Kaneko y col., 2002).

Tabla 2. Valores hematológicos y bioquímicos observados en gatos tratados con dos dosis de la vacuna contra GnRH Improvac®.

Parámetro	Período de tratamiento			
	Día 0	Semana 8	Semana 16	Semana 24
Glucosa (mg/dL)	73,63 ± 5,9	62,67 ± 8,2	67,00 ± 9,0	84,50 ± 14,3
Hematocrito (%)	33,77 ± 0,9	31,00 ± 1,7	29,00 ± 1,8*	27,00 ± 2,9*
Concentración de hemoglobina (g/dL)	11,25 ± 0,3	9,62 ± 0,5*	10,00 ± 0,5*	9,20 ± 0,8*
Eritrocitos (10 <sup>6</sup> /μL)	6,99 ± 0,1	6,10 ± 0,3*	5,71 ± 0,4*	5,61 ± 0,6*
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μL)	8,24 ± 0,9	7,95 ± 1,1	9,93 ± 1,6	8,80 ± 3,1
Sólidos totales (%)	8,12 ± 0,3	9,07 ± 0,5	9,28 ± 0,5	9,00 ± 0,8
Fórmula de leucocitaria (%)				
Neutrófilos segmentados	69,7 ± 2,3	80,5 ± 4,4*	78,8 ± 4,8	69,00 ± 7,6
Neutrófilos en banda	0,84 ± 0,3	1,14 ± 0,6	0,91 ± 0,6	1,21 ± 0,1
Linfocitos	25,57 ± 2,3	11,50 ± 4,18*	13,80 ± 4,6	22,50 ± 7,24
Monocitos	0,43 ± 0,2	0,71 ± 0,3	0,66 ± 0,3	0,33 ± 0,3
Eosinófilos	2,80 ± 1,1	6,08 ± 2,2	4,42 ± 2,4	7,12 ± 3,8
<i>Bioquímica sérica</i>				
Alanina aminotransferasa (U/L)	35,83 ± 4,0	28,33 ± 3,7	33,80 ± 9,8	45,00 ± 0,2
Urea (mg/dL)	43,75 ± 2,5	41,67 ± 3,8	41,67 ± 3,2	47,00 ± 0,1
Proteínas totales (g/dL)	6,79 ± 0,2	6,63 ± 0,3	6,74 ± 0,2	6,40 ± 0,4
Albúmina (g/dL)	2,53 ± 0,0	2,44 ± 0,1	2,36 ± 0,1	2,40 ± 0,1
Globulina (g/dL)	4,02 ± 0,4	3,71 ± 0,5	3,72 ± 0,7	4,00 ± 0,3

Los valores se expresan como medias de mínimos cuadrados ± error estándar (LSM ± SE). Las diferencias se indican \* P ≤ 0,05 \*\*P ≤ 0,001.

## DISCUSIÓN

El método frecuentemente utilizado para el control de la reproducción en los gatos es la castración quirúrgica. Este procedimiento es rápido y seguro; sin embargo, tiene las desventajas de ser definitivo, irreversible y costoso. Estas razones limitan su empleo, y dificultan su utilización en forma masiva (Welsh, 2018). Por el contrario, la contracepción mediante fármacos anticonceptivos es reversible, lo cual es una ventaja importante cuando se desea el control temporal de la reproducción. Además, su bajo costo y practicidad comparado con la cirugía brinda una opción para el control reproductivo de gatos callejeros al prolongar los tiempos entre camadas, permitiendo de esta forma el accionar más eficaz de los programas de castraciones quirúrgicas estatales (Murray y col. 2015).

En este experimento se evaluó el efecto de la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre la calidad de semen, observándose que, a pesar de la variabilidad en la respuesta a la inmunización, la administración de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> resultó efectiva para reducir significativamente los parámetros seminales en el 90% de los gatos, e inducir azoospermia en el 10% restante. La variabilidad en la respuesta a la vacuna contra GnRH también fue observada por Levy y col, 2004.

El efecto de la aplicación de la vacuna sobre la calidad de semen comenzó a observarse a partir de las 8 semanas, continuando la disminución de la calidad seminal de forma gradual y progresiva hasta el final del estudio. Los resultados de esta investigación concuerdan con los obtenidos por Levy y col (2004) en gatos de 9 a 12 meses de edad, quienes observaron una disminución en la cantidad de

espermatozoides totales mediante la aplicación de una sola dosis de 400 µg de una vacuna contra GnRH. Resultados similares fueron observados por Lee y col (2019) en gatos de 4 a 6 meses mediante la aplicación de la vacuna STF2-GnRH, observándose diferencias entre controles y tratados en el volumen testicular y las espinas peneanas. En perros tratados con una sola dosis por vía subcutánea de Improvac<sup>®</sup>, la disminución de la calidad espermática fue observada 2 semanas después del tratamiento seguida de azoospermia a la semana 4, condición que se mantuvo hasta la semana 16 (Ajadi y Oyeyemi, 2015; Ajadi y Gazalos, 2016). Similares resultados fueron observados por Elisane y col. (2017), con la aplicación de dos dosis de Improvac<sup>®</sup>, con 30 días de diferencia entre dosis; alcanzándose azoospermia 45 días después de la primera inmunización. Nuestros resultados en gatos concuerdan con lo comunicado por los mencionados autores aunque se observó una respuesta menor.

La disminución en la calidad seminal observada en este trabajo en los gatos tratados fue acompañada por una reducción progresiva del volumen testicular a partir de la semana 2 después D0, alcanzando la reducción máxima al final del estudio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en perros por Ajadi y Oyeyemi (2015), quienes observaron una disminución significativa de la circunferencia escrotal a partir de la semana 10 luego de la inmunización. De manera similar en equinos, el tratamiento con Improvac<sup>®</sup> redujo el ancho escrotal total un 37 % tres meses después del tratamiento (Chouriberry y col., 2017); mientras que en potros la reducción en el volumen testicular alcanzó el 50 % dos meses después del tratamiento con Improvac<sup>®</sup> (Birrell y col., 2021). En verracos, la inmunocastración con Improvac<sup>®</sup> redujo significativamente el peso testicular

(alrededor del 70%) 20 semanas luego de la inmunización primaria (Zamaratskaia y col., 2008). En concordancia, en lechones, la inmunización con Improvac<sup>®</sup> redujo aproximadamente el 60% del peso testicular 15 semanas después del tratamiento (Stojanovic y col., 2017). Si bien se observa variabilidad en la respuesta en relación a la especie, la etapa del desarrollo en la cual se encuentran los animales y la dosis aplicada, la respuesta a la inmunización sobre el volumen testicular resulta similar a lo observado en el presente trabajo en gatos. En este estudio la reducción en el tamaño de las espículas peneanas comenzó a evidenciarse en todos los gatos tratados a partir la semana 8, seguidas de una reducción progresiva hasta alcanzar una atrofia casi completa al final del estudio. Similarmente, Levy y col (2004) reportaron ausencia completa de las espículas peneanas en gatos tratados con una vacuna contra GnRH 6 meses posteriores a la inmunización.

En el presente experimento, el efecto de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre la concentración sérica de hormonas esteroideas sexuales se observó a partir de la semana 6, cuando se registraron valores basales para esta hormona, manteniéndose esta condición hasta la semana 20 luego de la primo vacunación. En perros, la disminución de la concentración sérica de T2 se observó a partir de la semana 4 (Ajadi y Gazalos, 2016) o de la semana 12 luego de la inmunización (Donovan y col 2012), en cerdos a partir de la semana 5 (Zamaratskaia y col., 2008; Claus y col., 2007). Mientras que en chivos (Giriboni y col., 2020), ciervos (Phraluk y col., 2015) y caballos, la T2 sérica comenzó a disminuir después de la primera inmunización y fue indetectable al día 28 (Birrell y col., 2021). Sin embargo, la inmunización con Improvac<sup>®</sup> en gatos si bien fue capaz de reducir los niveles de T2 hasta concentraciones basales a partir de la semana 6, solo indujo azoospermia

en un solo gato a la semana 12, mientras que la mayoría de los animales evidenciaron una disminución significativa de la calidad seminal a partir de las 16 semanas de aplicada la vacuna. Similares observaciones fueron registradas en cerdos inmunizados con Improvac<sup>®</sup>, observándose concentraciones séricas basales de T2 a partir de la semana 5 postratamiento (Zamaratskaia y col., 2008; Claus y col., 2007). Sin embargo, la espermatogénesis no se interrumpió por completo, ya que se recuperaron muestras de espermatozoides de la cola de los epidídimos hasta 22 semanas después de la segunda inmunización con Improvac<sup>®</sup> (Einarsson y col., 2009).

Este trabajo de tesis ha demostrado que la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> mantiene los parámetros hematológicos y bioquímicos dentro del rango normal para la especie durante todo el estudio (Clinkenbeard y Meinkoth, 2000; Kaneko y col., 2002). Este hallazgo concuerda con las comunicaciones en gatas (Carrasco y col., 2020; Carrasco Sangache y col. 2021; García Mitacek y col. 2021; Carrasco y col. 2022) y en perros tratados con la vacuna Improvac<sup>®</sup> (Ajadi y Gazalos, 2016 Novak y col., 2021), debido a que en ninguno de ellas se registraron variaciones de los parámetros hematológicos o bioquímicos por fuera del rango de referencia fisiológico para la especie.

El control de la reproducción en gatos mediante análogos de la GnRH ha mostrado efectividad, aunque en determinados casos la duración del efecto contraceptivo no es predecible, pudiendo además ocurrir eventualmente efectos adversos a largo plazo (Murray y col. 2015; Root Kustritz, 2018). En el presente estudio, ninguno de los gatos tratados presentó efectos adversos, manteniéndose constante la ingesta de alimentos, el consumo de agua y el peso de los animales

durante todo el periodo de estudio. Si bien se registró un aumento leve de la temperatura corporal (de 0,5 a 1°C) 24 a 48 horas posteriores al D0, el mismo fue transitorio y no se detectó inflamación en el lugar de la inyección en ninguno de los gatos. Estas observaciones difieren de las obtenidas en gatos que recibieron otras vacunas con un adyuvante que contenía micobacterias en aceite (adyuvante de Freund), debido a que lesiones malignas importantes fueron registradas en el sitio de aplicación con este adyuvante (Munson y col., 2005). Si bien el adyuvante presente en la vacuna Improvac (DEAE-Dextran, adyuvante acuoso de base oleosa no mineral) generó pequeñas reacciones indoloras subcutáneas palpables en el sitio de aplicación a los 10 a 15 días, las mismas resolvieron dentro de las 3 semanas en la mayoría de los gatos, representando una reacción mínima comparada con las generadas por el adyuvante de Freud.

En este estudio, se utilizó la vía de administración subcutánea, que es la recomendada por el fabricante, sin embargo, la inmunización por vía intramuscular en equinos mostró resultados prometedores (Birrell y col., 2021; Botha y col., 2008). Estudios adicionales en gatos deberían abordar la vía de administración para mejorar la respuesta.

Si bien ha sido ampliamente demostrado que los anticuerpos contra la GnRH pueden causar esterilidad tanto en gatos machos como hembras (Kutzler y Wood, 2006; Levy y col., 2004; Levy y col., 2011; Munks, 2012), los autores informaron la dificultad de lograr la esterilidad a largo plazo con una inyección de dosis única. De esta forma, el uso de dos dosis de vacunas Improvac® podría prolongar este efecto, ya que los gatos tratados no volvieron a los valores seminales previos al tratamiento seis meses después de la primera vacunación.

## CONCLUSIÓN

La vacuna contra la GnRH (Improvac<sup>®</sup>, Zoetis) redujo efectivamente la calidad seminal, el volumen testicular y la concentración de testosterona en suero sanguíneo sin modificaciones en el estado general de los animales ni ocurrencia de efectos adversos graves. Los valores hematológicos y bioquímicos no mostraron diferencias a lo largo del periodo de estudio.

Si bien se necesitan nuevas investigaciones para evaluar la vía de administración de la vacuna, la dosis-respuesta para la detención completa de la espermatogénesis, la duración de la immunoanticoncepción, y la fertilidad después del tratamiento, Improvac<sup>®</sup> se propone como una alternativa prometedora para el control de la reproducción en gatos y el control de las poblaciones de estos felinos, mientras se llevan a cabo los programas de control reproductivo permanente.

### CAPITULO III

#### **EFFECTO DE LA VACUNA IMPROVAC® SOBRE LA MORFOLOGÍA GONADAL**

El efecto del fotoperiodo sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal ha sido documentado en felinos. Se ha comunicado que en los gatos los testículos presentan cambios morfológicos estacionales relacionados con la producción espermática estacional y que acompañan a la estacionalidad reproductiva de la hembra. Es así que gatos castrados en primavera verano presentaron mayor porcentaje de túbulos seminíferos con espermátides maduras y espermátides con cola que aquellos animales castrados en otoño-invierno (Stornelli y col., 2009). De esta forma, ocurre una menor producción espermática durante el otoño-invierno, en concordancia con la temporada no reproductiva de la hembra asociada al aumento de melatonina sérica inducido por la disminución de las horas luz diarias (Nuñez Favre y col., 2012a). Es así que en gatos machos la aplicación de implantes de melatonina produjo cambios similares a nivel testicular (Nuñez Favre y col., 2014). Los mencionados estudios muestran que el eje hipotálamo hipofisario gonadal regulado por la melatonina está directamente relacionado con la producción espermática en el gato. En la misma línea de acción sobre la función testicular, se ha estudiado la anticoncepción en machos mediante inmuncontracepción usando como blanco la hormona GnRH para actuar sobre el eje hipotálamo hipofisario gonadal. Los estudios en gatos han mostrado que el uso de la vacuna anti GnRH GonaCon indujo disminución de la testosterona sérica y del volumen escrotal, observándose en el estudio microscópico testicular marcada atrofia tubular con

escasez de células germinales (Levy y col., 2004). Similares efectos se han observado con el uso de vacuna Improvac en cerdos, toros, ciervos, equinos y perros (Zamaratskaia y col., 2007, Janet y col., 2012, Phraluk y col., 2015, Ajadi y Gazal, 2016, Birrell y col., 2021). Los mencionados trabajos muestran que las vacunas anti GnRH afectan el desarrollo de la hilera seminal observándose en el testículo predominancia de tubulos seminíferos con escaso grado de desarrollo.

En el epidídimo ocurre la maduración y el almacenamiento espermático. La maduración permite a los espermatozoides estar potencialmente aptos para capacitarse en el tracto genital femenino, lo cual les permite más tarde penetrar la zona pelúcida y fecundar al oocito. Es así que los espermatozoides listos para ser eyaculados se almacenan en la cola del epidídimo. Durante el pasaje por el epidídimo, la mayor parte del fluido testicular, rico en NaCl es reabsorbido e intercambiado por K con el fin de deshidratar y estabilizar la membrana del espermatozoide, ya que las altas concentraciones de Na promueven la capacitación y la reacción acrosómica (Johnston y col., 1988, Axner 2006). Las células epididimales también producen y secretan fosfatasa alcalina. Ésta puede utilizarse para diferenciar entre un eyaculado incompleto, conteniendo solo fluido proveniente de las glándulas accesorias, de un eyaculado completo, conteniendo además fluido epididimal (Axner 2006). Este órgano tiene un epitelio pseudoestratificado en el cual pueden observarse tres tipos celulares (células principales, apicales y basales). En el gato doméstico las células principales pueden diferenciarse en células claras y oscuras. Esta característica tintorial observada al microscopio óptico podría relacionarse con diferencias en la fisiología de cada tipo celular (Reyna y col., 2008). Las células epididimarias tienen función secretora y

absortiva, íntimamente relacionadas con el proceso de maduración espermática. Se ha comunicado que las células oscuras alcanzan el menor porcentaje en invierno en concordancia con el mayor porcentaje de células claras, mientras que la situación inversa se observó durante los días de verano y otoño (Reyna y col., 2008, Stornelli y col. 2021). Concomitantemente se observó que durante los meses de primavera y verano se registró un mayor porcentaje de células epidididmales PAS positivas, en comparación con epidídimos de animales castrados en otoño e invierno (Savignone y col., 2007). Los mencionados estudios sugieren que en el gato doméstico existen variaciones funcionales del epitelio epididimal en concordancia con la producción espermática estacional. El uso de la vacuna Improvac<sup>®</sup> induciría cambios morfológicos relacionados con cambios funcionales en testículos y epidídimos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Es así que este experimento tuvo como objetivo evaluar el efecto de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre la morfología testicular y epididimaria.

## **HIPOTESIS**

- La aplicación de la vacuna produce cambios morfológicos en testículos y epidídimos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Este experimento complementa el estudio realizado en el Capítulo II, por lo tanto, el diseño experimental es el descrito en el mencionado capítulo.

### Orquiectomía

Los animales fueron anestesiados con una combinación de Xilacina (0,5 mg/kg im.; Sedomin, Laboratorios Koning SA, Argentina); Tramadol 1mg/kg im., (Algen Laboratorio Richmond), Argentina [preanestesia]; Ketamina (5 mg/kg iv; Vetanarcol, Laboratorios Koning SA, Argentina) y Diazepam (0,4 mg/kg iv, Diazepán Laboratorio Lamar SA, Argentina); para el mantenimiento (Thurmon y col., 1996). Inmediatamente después de la cirugía, recibieron Amoxicilina (22 mg/kg i.m., Amoxicilina. Laboratorios Rio de Janeiro-Alfasan, Argentina) y Tramadol 1 mg/kg sc (Algen Laboratorio Richmond, Argentina).

Inmediatamente después de finalizada la cirugía, los testículos y epidídimos fueron lavados con solución fisiológica, y separados. Luego, los testículos fueron fijados en solución de Bouin y los epidídimos en solución formolada tamponada al 10% para su posterior procesamiento histológico.

### Determinación del grado de desarrollo gonadal

Las muestras testiculares fueron procesadas mediante la técnica de inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 3 µm de espesor con micrótopo de deslizamiento y se colorearán con Hematoxilina y Eosina. Las secciones obtenidas

se observaron a 400 aumentos, y se evaluó el grado de desarrollo de la hilera seminal. Se seleccionaron para su estudio un total de 20 túbulos seminíferos cortados transversalmente por muestra. Los mismos se clasificaron de acuerdo con el grado de maduración de las espermátides en cuatro grados (G): G1, túbulos con espermátidas redondas (Figura 9); G2, túbulos con espermátidas alargadas (Figura 10); G3, túbulos con espermátidas con cola (Figura 11); G4, túbulos con espermátidas maduras (Figura 12) y se contaron las células intersticiales de Leydig observadas en los mismos campos microscópicos (Stornelli y col., 2009, Nuñez Favre y col., 2014).

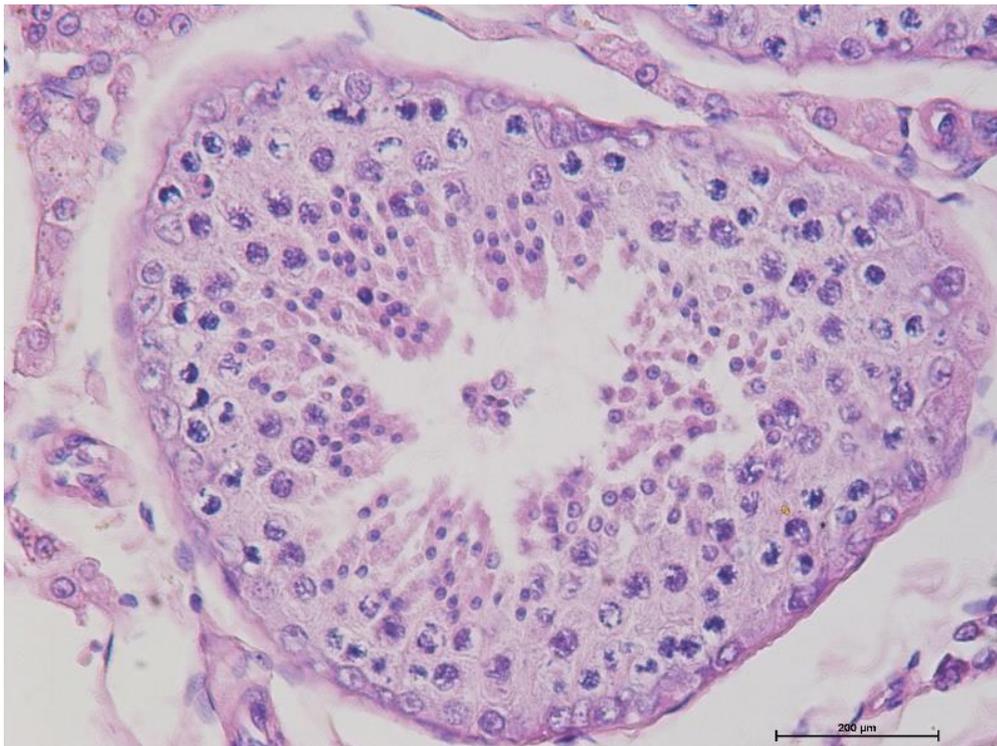


Figura 2. Túbulo seminífero con espermátidas redondas. Grado de maduración 1 (G1).

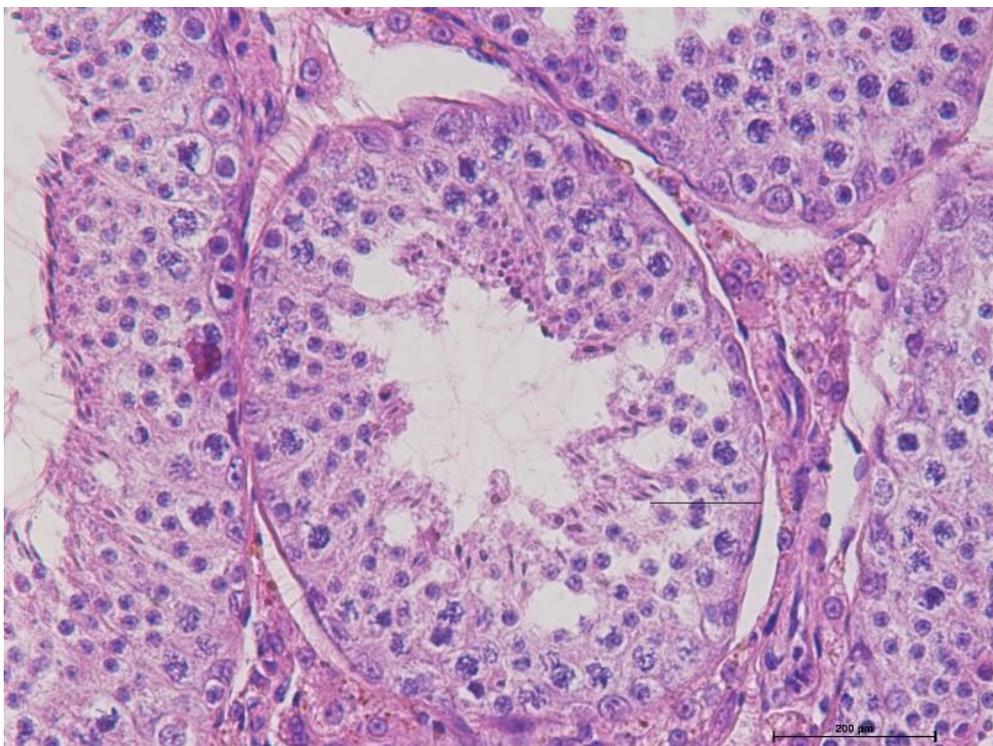


Figura 3. Túbulo seminífero con espermátidas alargadas. Grado de maduración 2 (G2).

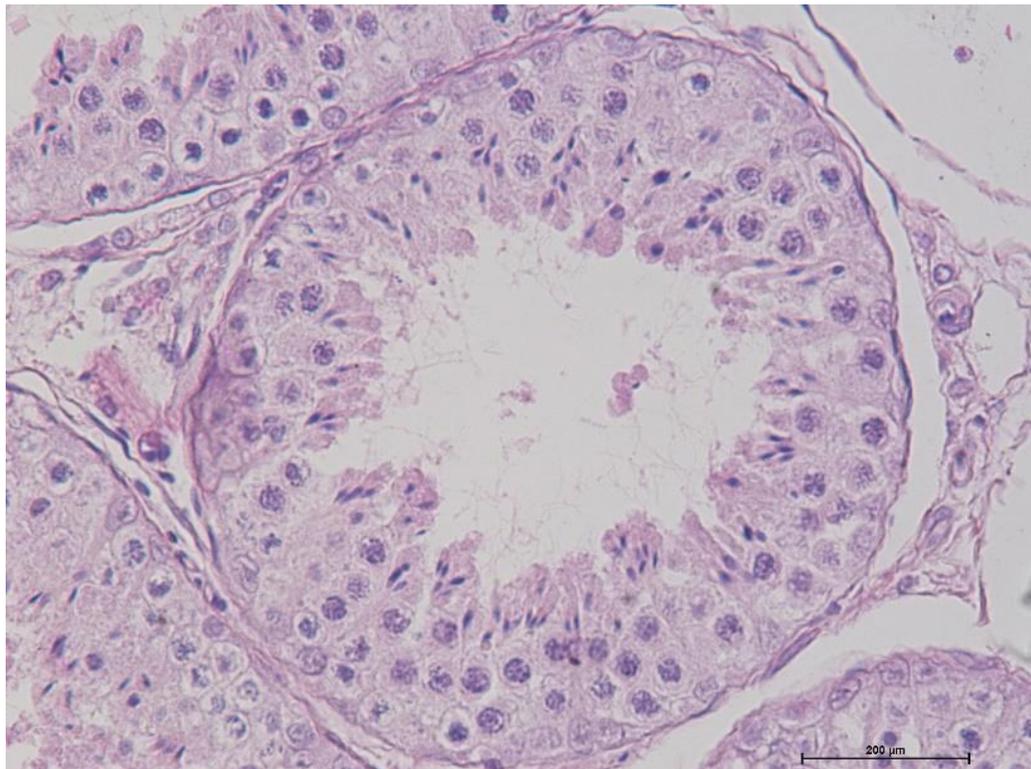


Figura 4. Túbulo seminífero con espermatidas con cola. Grado de maduración 3 (G3).

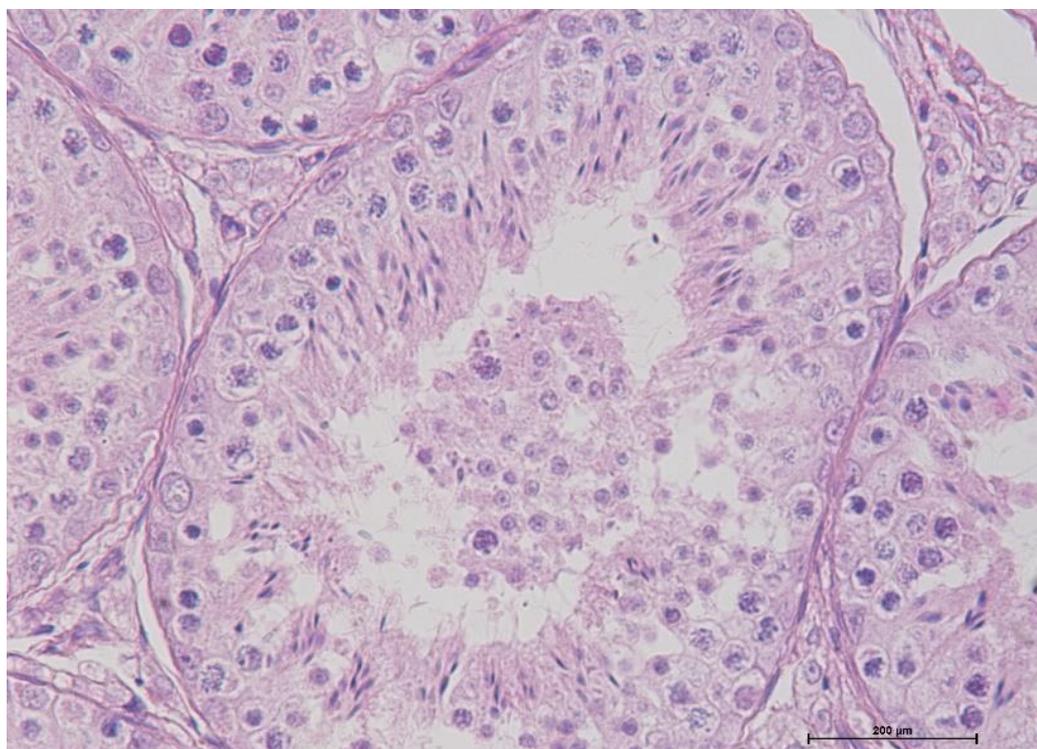


Figura 5. Túbulo seminífero con espermatidas maduras. Grado de maduración 4 (G4).

### **Estudios morfológicos epididimales**

Las muestras epididimales de cada región del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) fueron procesadas por separado mediante la técnica de inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor con micrótopo de deslizamiento y se colorearon con Hematoxilina y Eosina (H&E), Hematoxilina-Azul de toluidina y Hematoxilina-PAS (Figuras 13, 14, 15 y 16). Las secciones obtenidas se observaron bajo objetivo de inmersión (1000X).

Se realizó el conteo de 200 células principales en cada muestra teñida con H&E y con Hematoxilina-Azul de toluidina y se registró la cantidad de células claras y de células oscuras en cada región epididimal. También se realizó el conteo de 200 células principales en cada muestra teñida con Hematoxilina-PAS obteniéndose el porcentaje de células con contenido citoplasmático PAS positivo (PAS+).

Para el estudio morfométrico epididimal se utilizaron muestras teñidas con H&E, y se capturaron imágenes utilizando un Microscopio óptico Nikon Eclipse e200 Led conectado a una cámara. En cada una de las muestras se midió a 400 X la altura y el ancho de 10 células por campo en 5 campos elegidos al azar. Para realizar las mediciones se utilizó el programa de análisis de imágenes para histomorfometría Image J-Fiji 1.46.

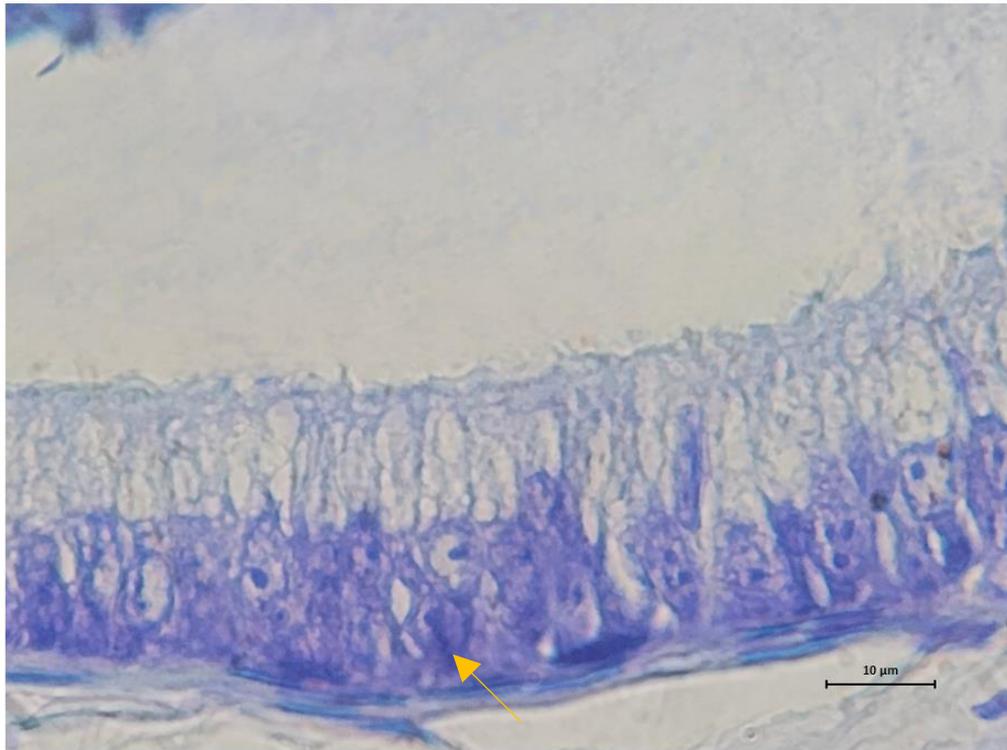


Figura 6. Corte de epidídimo teñido con Hematoxilina-Azul de toluidina donde se observan células oscuras (flecha amarilla).

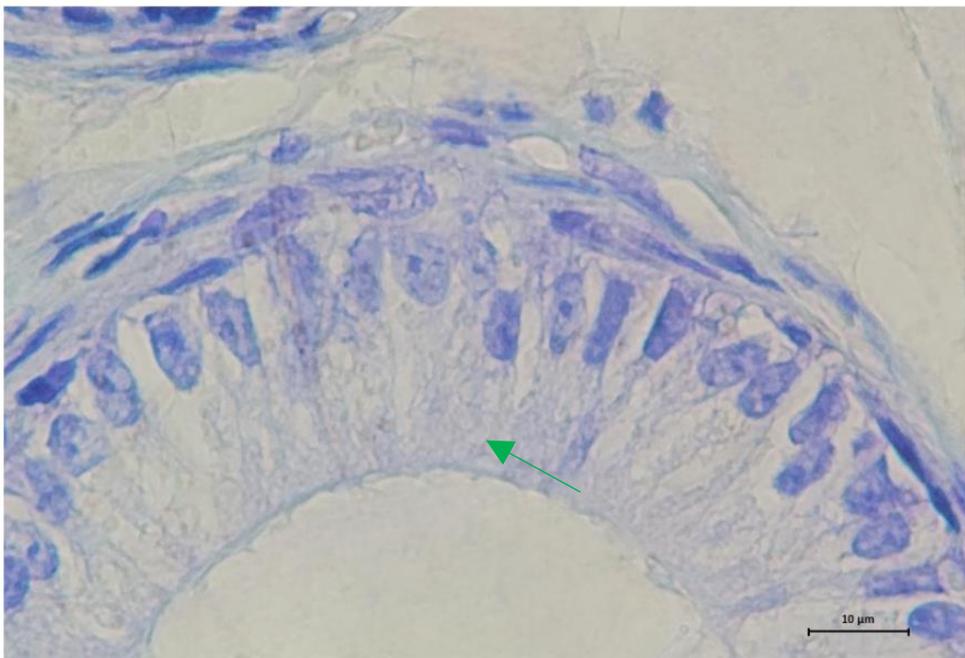


Figura 7. Corte de epidídimo teñido con Hematoxilina-Azul de toluidina donde se observan células claras (flecha verde).

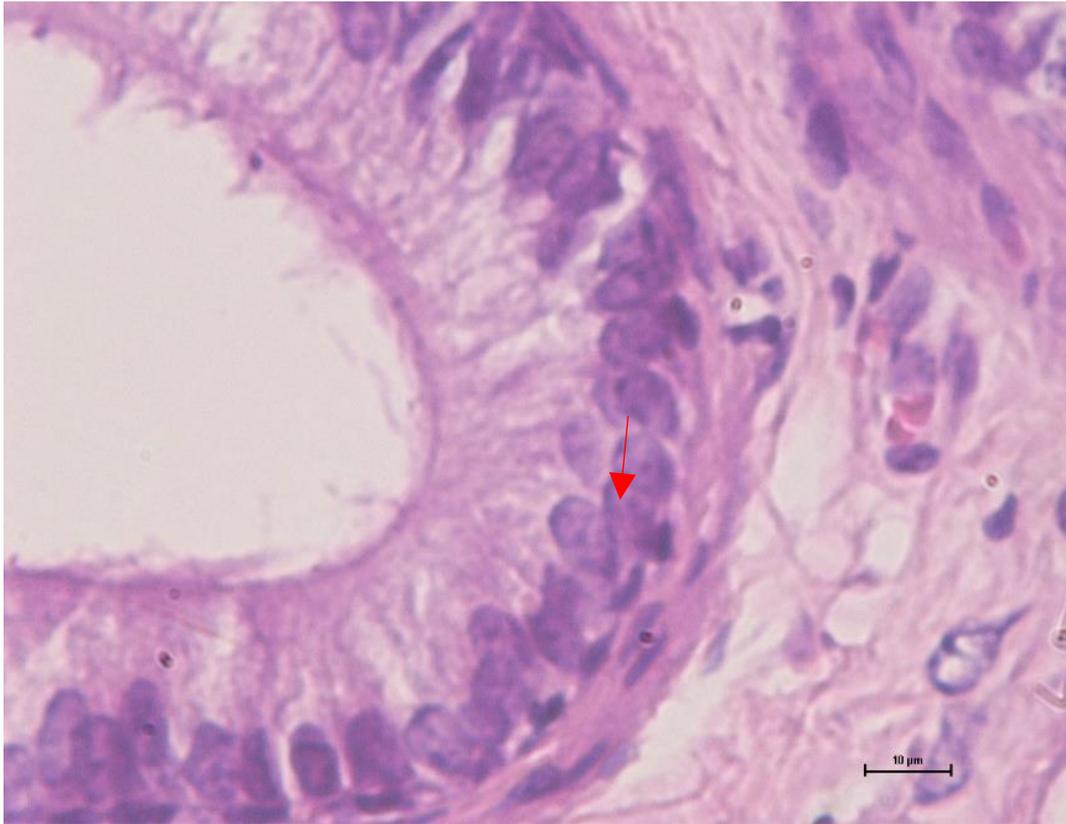


Figura 8. Corte de epidídimo teñido con Hematoxilina-PAS donde se observan células PAS + (flecha roja).

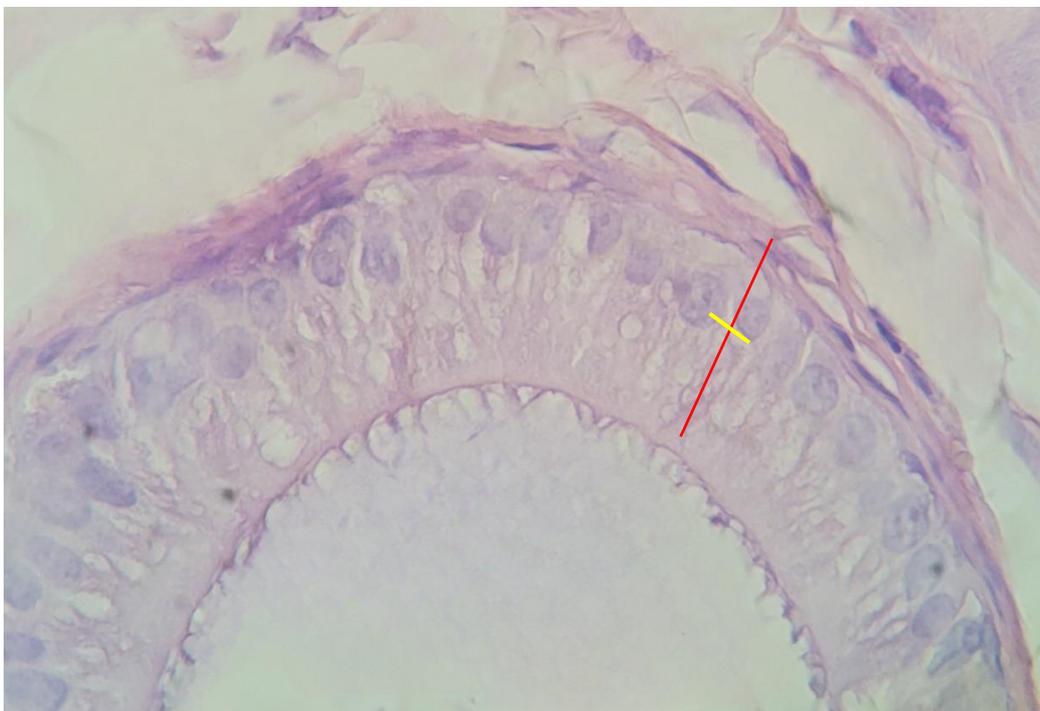


Figura 9. Mediciones realizadas en células epididimales. Largo (línea roja) y Ancho (línea amarilla).

## **ANALISIS ESTADISTICO**

El grado de desarrollo de la hilera seminal, el porcentaje de células epididimales principales claras y oscuras, y el porcentaje de células epididimales PAS+ y PAS- el fueron comparados entre los grupos mediante análisis de varianza (ANOVA) con el paquete GLIMMIX de SAS.

## **MARCO BIOETICO DEL USO DE ANIMALES**

Este experimento se realizó siguiendo las mismas pautas para el cuidado y uso de animales de laboratorio detalladas en el capítulo II.

## RESULTADOS

### Desarrollo de la hilera seminal

En los gatos controles se registró una mayor cantidad de túbulos seminíferos con mayores grados de desarrollo de la hilera seminal (grados 3 y 4) en comparación con los gatos TRT que mostraron mayor cantidad de túbulos con grado 1 y 2 (Tabla 3).

Tabla 3. Grado de desarrollo gonadal en gatos controles y vacunados con Improvac<sup>®</sup>.

Grado de desarrollo gonadal	Grupos			
	CON	TRT8	TRT16	TRT24
G1	2,50±0,5	16,67±0,2**	15,00±2,0**	13,33±1,1**
G2	1,00	2,67±1,5	3,50±2,4	4,00**
G3	11,00±1,0	3,67±0,8**	2,00±1,2**	2,50±0,5**
G4	5,50±1,1	1,00±0,7*	0**	2,50±0,5*

CON: control. TRT: tratado. TRT8: castrado a las 8 semanas. TRT16: castrado a las 16. TRT24: castrado a las 24 semanas. G1: grado de desarrollo gonadal 1. G2: grado de desarrollo gonadal 2. G3: grado de desarrollo gonadal 3. G4: grado de desarrollo gonadal 4. Diferencias indicadas con \* $P \leq 0.05$  \*\* $P \leq 0.001$ .

### Estudio morfológico epididimal

En los animales del grupo CON el porcentaje de células oscuras fue superior en comparación con el porcentaje de células claras en todos los segmentos del epidídimo (Ca, C, Co). Inversamente en los TRT el porcentaje de células oscuras fue inferior en comparación con el porcentaje de células claras en todos los segmentos (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de células claras, oscuras en epidídimos de gatos controles y vacunados con Improvac<sup>®</sup>.

Región epididimal	Grupos			
	Células claras		Células oscuras	
	CON	TRT	CON	TRT
Ca	13,0±1,0**	74,0±0,5**	87,0±1,0**	25,5±0,5**
C	11,0±1,0**	72,5±0,5**	89,0±1,0**	27,5±0,5**
Co	9,5±0,5**	71,5±0,5**	91,5±0,5**	28,5±0,5**

CON: control. TRT: tratado. Ca: cabeza. C: cuerpo. Co: cola. Diferencias entre CON y TRT indicadas con \* $P \leq 0.05$  \*\* $P \leq 0.001$ .

El porcentaje de células PAS- fue inferior en todos los segmentos (Ca, C, Co) tanto en CON como en TRT. No se observaron diferencias entre el porcentaje de células PAS- y PAS+ entre CON y TRT en ninguno de los segmentos (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de células PAS+ y PAS- en epidídimos de gatos controles y vacunados con Improvac<sup>®</sup>.

Región epididimal	Grupo			
	Cel PAS +		Cel PAS -	
	CON	TRT	CON	TRT
Ca	86,00±1,0 <sup>a</sup>	84,88±0,7 <sup>a</sup>	14,00±1,0 <sup>b</sup>	15,11±0,7 <sup>b</sup>
C	88,00±1,0 <sup>a</sup>	86,77±0,7 <sup>a</sup>	12,00±1,0 <sup>b</sup>	13,22±0,7 <sup>b</sup>
Co	89,00±1,0 <sup>a</sup>	89,00±0,7 <sup>a</sup>	11,00±1,0 <sup>b</sup>	11,22±0,7 <sup>b</sup>

CON: control. TRT: tratado. Ca: cabeza. C: cuerpo. Co: cola. Letras diferentes indican diferencias significativas en la misma columna,  $P \leq 0.05$ ;

### Morfometría epididimal.

En los animales CON y TRT pudo observarse un mayor largo en las células epididimales principales en el cuerpo y la cola del epidídimo en comparación con la cabeza (Tabla 6). Sin embargo, el ancho celular en los CON fue similar en las tres regiones del epidídimo, mientras que en los TRT el ancho fue superior en la

cabeza y en el cuerpo en comparación con la cola (Tabla 6). Al comparar CON con TRT el largo y ancho de las células principales fue superior en la cabeza y cola de los CON en comparación con los TRT ( $31,01 \pm 0,22$  vs.  $30,42 \pm 0,18$ ;  $30,36 \pm 0,21$  vs.  $29,97 \pm 0,16$ ;  $6,37 \pm 0,08$  vs.  $6,09 \pm 0,08$ ;  $6,23 \pm 0,08$  vs  $6,21 \pm 0,06$ ; respectivamente;  $P \leq 0.05$ ).

Tabla 6. Largo y ancho de células epididimales de gatos controles y vacunados con Improvac®.

Región epididimal	Grupo			
	Longitud celular		Ancho celular	
	CON	TRT	CON	TRT
Ca	$31,01 \pm 0,2^a$	$30,42 \pm 0,2^a$	$6,37 \pm 0,1^a$	$6,09 \pm 0,1^a$
C	$30,43 \pm 0,2^b$	$30,20 \pm 0,2^b$	$6,23 \pm 0,1^a$	$6,21 \pm 0,1^a$
Co	$30,36 \pm 0,2^b$	$29,97 \pm 0,2^b$	$6,11 \pm 0,1^a$	$5,92 \pm 0,1^b$

CON: control. TRT: tratado. Ca: cabeza. C: cuerpo. Co: cola. Letras diferentes indican diferencias significativas en la misma columna,  $P \leq 0.05$ .

## DISCUSIÓN

Los gatos del estudio estuvieron bajo un régimen lumínico que permite mantener una buena calidad seminal, una producción espermática similar a lo observado en gatos durante épocas del año con fotoperiodo natural largo (Nuñez Favre y col., 2012, Stornelli y col., 2009). Es así como los resultados de los gatos controles evidencian este hecho. Los resultados obtenidos en este capítulo muestran en los gatos controles un desarrollo de la hilera seminal, porcentaje de células claras y oscuras así como de células PAS+ y PAS- similares a lo comunicado en gatos sometidos a fotoperiodo largo natural (Stornelli y col., 2009; Reyna y col., 2008; Savignone y col., 2007). Por el contrario, los gatos TRT mostraron desarrollo de la hilera seminal y porcentaje de células claras y oscuras similares a gatos sometidos a fotoperiodo natural corto (Stornelli y col., 2009; Reyna y col., 2008; Savignone y col., 2007). Se ha documentado que los gatos sometidos a fotoperiodo natural poseen producción espermática estacional en relación con el fotoperiodo acompañando la estacionalidad reproductiva de la hembra (Nuñez Favre y col., 2012a; Nuñez Favre y col., 2012b; Stornelli y col., 2009). Es así como durante los días de menos horas luz, con aumento de la melatonina sérica circulante, disminuyen los pulsos de GnRH, disminuyendo la secreción de FSH y LH, lo cual determina la estacionalidad reproductiva de los felinos (Gimenez y col., 2009). La vacuna Improvac<sup>®</sup> actúa estimulando la producción de anticuerpos anti GnRH actuando sobre el eje hipotálamo hipofisiario gonadal, frenando la liberación de FSH y LH, lo cual determina, la disminución de testosterona sérica con la consecuente morfología testicular y epididimal, similar a gatos sometidos a fotoperiodo corto natural.

En concordancia con nuestros hallazgos estudios previos demuestran que los testículos de animales que recibieron vacunas anti GnRH muestran túbulos seminíferos con escaso desarrollo de la hilera seminal (Levy y Crawford 2004; Ajadi y Oyeyemi 2015; Einarsson y col., 2009).

Nuestros resultados son similares a los comunicados previamente por Levy (2004), quien observó que gatos tratados con una vacuna anti GnRH desarrollada por el Centro de Investigación Nacional de Vida Silvestre de Fort Collins, Colorado, USA, mostraban marcada atrofia tubular con vacuolas en las células de Sertoli y escasez de células germinales, mientras que en los gatos controles se observaban túbulos seminíferos poblados uniformemente por células de Sertoli y células germinales, así como producción y maduración de espermátides que se identificaban fácilmente en los lúmenes tubulares (Levy y Crawford 2004). El mismo efecto fue comunicado por Ajadi y Howaida (2015) al administrar una sola dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> en caninos, mostrando que los perros vacunados presentaban túbulos seminíferos con escaso desarrollo de la hilera seminal 4 meses posvacunación.

Si bien no hemos realizado una prueba de campo para estudiar la fertilidad de los gatos luego de la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup>, el escaso desarrollo de la hilera seminal observado en los gatos vacunados sugiere infertilidad asociada al tratamiento. Futuros estudios permitirán también evaluar la duración del efecto vacunal.

Las células epididimales secretan diferentes componentes brindando un medio óptimo para la maduración y almacenamiento espermático, con el fin de mantener viables y no capacitados a los espermatozoides hasta su eyaculación en el

tracto genital de la hembra (Parks y Hammerstedt, 1985; Cooper, 1998; Robaire y Hinton 2015). Se ha demostrado que la fisiología del epidídimo es altamente dependiente de la secreción de las células principales, que no solo contribuyen con iones, agua y ATP, sino que proveen esencialmente todas las proteínas secretadas al fluido luminal (Herms y Jacks, 2002). Se ha documentado que las células epididiales principales varían en su calidad tintorial y presencia de mucopolisacáridos en relación al fotoperiodo (Reyna y col., 2008, Savignone y col., 2007). Las características de las células epididimales principales en gatos vacunados con Improvac<sup>®</sup> son similares a las observadas en el epidídimo de gatos durante el fotoperiodo natural corto coincidiendo con una calidad seminal inferior a la observada durante el fotoperiodo natural largo (Savignone y col., 2007; Reyna y col., 2008; Nuñez Favre y col., 2012a;). Nuestros resultados muestran diferencias entre gatos controles y tratados en el porcentaje de células epididimales principales claras y oscuras, así como cambios en el largo y ancho de estas células, hechos que podrían relacionarse con cambios en la función epididimal, ocurriendo un medio ambiente no ideal para la maduración y almacenamiento espermático asociado a la respuesta a la vacuna Improvac<sup>®</sup>.

## CONCLUSIÓN

Se ha documentado que la vacuna Improvac<sup>®</sup> estimula la formación de anticuerpos anti-GnRH suprimiendo el efecto de la hormona GnRH, lo cual lleva a la inhibición de la síntesis de gonadotropinas, evitando así la reproducción (Novak y col., 2021). Es decir que la vacuna Improvac<sup>®</sup> induce la formación de anticuerpos contra la GnRH y evita así la unión con sus receptores, para de esta manera inhibir la síntesis de FSH y LH, produciendo en concordancia con lo observado en este estudio, la consecuente supresión de la gametogénesis y cambios epididimales que podrían relacionarse con un ambiente desfavorable para la maduración y almacenamiento espermático.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abu-Ahmed, H. M., & Howaida, M. (2015). Chemical sterilization of dogs using single bilateral intra-testicular injection of calcium chloride or clove oil. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 45(1), 26-32.
2. Ajadi, T. A., & Gazal, O. S. (2016). Effect of Surgical and Immunological Castration on Haematological Variables, Reproductive Hormones and Ejaculate Characteristics in Mongrel Dogs. *Niger J Physiol Sci*, 31(1), 37-42.
3. Ajadi, T., & Oyeyemi, M. (2015). Short-term effects of a single dose of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) vaccine on testicular and ejaculate characteristics of dogs. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18(2), 123-131.
4. Andersson K, Brunius C, Zamaratskaia G, Lundström KJA (2012) Early vaccination with Improvac<sup>®</sup>: effects on performance and behaviour of male pigs. 6, 87-95.
5. Asa CS (2018) Contraception in Dogs and Cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 48, 733-742. <https://10.1016/j.cvsm.2018.02.014>.
6. Axner E. (2006) Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66 (1): 14-24.
7. Ball, Barry A., y col. (2006) Effects of a GnRH cytotoxin on reproductive function in peripubertal male dogs. *Theriogenology* 66.4 766-774.
8. Baran, A., Ozdas, O. B., Gulcubuk, A., HAMZAOGLU, A. I., & TONGUC, M. (2010). Pilot study: intratesticular injection induces sterility in male cats. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Non-Surgical Methods of Pet Population Control* (pp. 8-10).
9. Başa, A., & Canpolat, I. (2019). Chemical sterilization in domestic animals. *Research in: Agricultural & Veterinary Sciences*, 3(1), 5-9.
10. Bavera, G; Peñafort, C. 2006. Castración de machos y hembras. (En línea). EC. Consultado, 14 diciembre 2014. Formato PFD. Disponible en [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/cria/40-](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria/40-)

[castracion\\_de\\_machos\\_y\\_hembras.pdf](#).

11. Benka, V. A., & Levy, J. K. (2015). Vaccines for feline contraception: GonaCon GnRH–hemocyanin conjugate immunocontraceptive. *Journal of feline medicine and surgery*, 17(9), 758-765.
12. Botha A, Schulman M, Bertschinger H, Guthrie A, Annandale C, Hughes SJWR (2008) The use of a GnRH vaccine to suppress mare ovarian activity in a large group of mares under field conditions. 35, 548-554.
13. Bowen, R. A. (2008). Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. [Review]. *Anim Reprod Sci*, 105(1-2), 139-143. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.022.
14. Bradford, J.; Mellencamp, Martha A. 2013. Immunological control of boar taint and aggressive behavior in male swine, *Animal Frontiers*, Volume 3, Issue 4, 12–19, <https://doi.org/10.2527/af.2013-0028>.
15. Bailly-Chouriberry, L., Loup, B., Popot, M. A., Dreau, M. L., Garcia, P., Bruyas, J. F., & Bonnaire, Y. (2017). Two complementary methods to control gonadotropin-releasing hormone vaccination (Improvac®) misuse in horseracing: Enzyme-linked immunosorbent assay test in plasma and steroidomics in urine. *Drug testing and analysis*, 9(9), 1432-1440.
16. Benavides Valades, G., Ganswindt, A., Annandale, H., Schulman, M. L., & Bertschinger, H. J. (2012). Non-invasive assessment of the reproductive cycle in free-ranging female African elephants (*Loxodonta africana*) treated with a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine for inducing anoestrus. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1-10.
17. Birrell, J. R., Schulman, M. L., Botha, A. E., Ganswindt, A., Fosgate, G. T., & Bertschinger, H. J. (2021). Vaccination against GnRH as a prelude to surgical castration of horses. *Equine Veterinary Journal*, 53(6), 1141-1149.
18. Budke, C. M., & Slater, M. R. (2009). Utilization of matrix population models to assess a 3-year single treatment nonsurgical contraception program versus surgical sterilization in feral cat populations. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 12(4), 277-292.
19. Cafazzo, S., Bonanni, R., & Natoli, E. (2019). Unowned Free-Roaming Domestic Cats. *Animals*, 9(12).

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani9121105>.

20. Carrasco Sangache W, García Mitacek M, Stornelli M, García F, Coralli F, de la Sota R, y col. Efecto de la vacuna GnRH en reinas. Simposio Internacional de Reproducción Canina y Felina-EVSSAR 2020+2. Milán, Italia. 2022.
21. 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, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Santa Fe, Argentina.
22. Carrasco Sangache, Washington, F.; García Mitacek, María Carla; Stornelli, María Alejandra. 2022. Métodos contraceptivos en gatas: pasado, presente y futuro. *Analecta Veterinaria*; 42 <https://doi.org/10.24215/15142590e065>.
23. Carrión, V., Sevilla, C., & Tapia, W. (2008). Management of introduced animals in Galapagos.
24. CIOMS-ICLAS. Council for International Organizations of Medical Sciences. International Council of Laboratory Animal Science. 2012. International guiding principles for biomedical research involving animals.
25. Claus, R., Lacorn, M., Danowski, K., Pearce, M. C., & Bauer, A. (2007). Short-term endocrine and metabolic reactions before and after second immunization against GnRH in boars. *Vaccine*, 25(24), 4689-4696.
26. Clinkenbeard K, Meinkoth J. Hematología normal del gato. En: Feldman B, Zinkl J, Jain N, editores. *Hematología Veterinaria de Schalm*. 5ª ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. pág. 1064-8.
27. Cooper, T. G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 53, 119-136.
28. Courchamp F, Cornell SJJJoAE (2000) Virus-vectored immunocontraception to control feral cats on islands: a mathematical model. 37, 903-913.
29. De Gier J, Okkens AC, Kooistra HS, Vinke CM, 2012: Behaviour and the pituitary axis in dogs before and after surgical or chemical castration with the GnRH agonist deslorelin. In: 7th Quadrennial International Symposium on

- Canine and Feline Reproduction (ISCFR), Whistler, BC, Canada, July 26–29, p. 54.
30. De Gier J, Vinke CM, 2010: Use of deslorelin to control hypersexuality in male dogs. In *7th European Veterinary Society Small Animal Reproduction (EVSSAR) Congress*, Louvain-la-Neuve, Belgium, May 14–15, pp. 9– 11.
  31. 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, 403-405.
  32. Driancourt, M.A.; Briggs, J.R. (2020). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist implants for male dog fertility suppression: a review of mode of action, efficacy, safety, and uses. *Frontiers in Veterinary Science*, 7: 483. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00483>.
  33. Dunlap, K.L.; Reynolds, A.; Tosini, G.; Kerr, W.; Duffy, L. 2007. Seasonal and diurnal melatonin production in exercising sled dogs. *Comp. Biochem. Physiol*; 147: 863–867. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.015>.
  34. Dunshea, F.; Colantoni, C.; Howard, K.K.; McCauley, I.; Jackson, P.; Long, K.A.; Lopaticki, S.; Nugent, E.A.; Simons, J.A.; Walker, J.; Hennessy, D.P. 2001. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac<sup>®</sup>) eliminates boar taint and increases growth performance. *J. Anim. Sci.* 7: 2524–2535.
  35. Earl ER, Waterston MM, Aughey E, Harvey MJ, Matschke C, Colston A, Ferro VA (2006) Evaluation of two GnRH-I based vaccine formulations on the testes function of entire Suffolk cross ram lambs. *Vaccine*, 24, 3172-83. [10.1016/j.vaccine.2006.01.041](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.01.041).
  36. Einarsson, S., Andersson, K., Wallgren, M., Lundström, K., & Rodriguez-Martinez, H. (2009). Short-and long-term effects of immunization against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac<sup>™</sup>, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. *Theriogenology*, 71(2), 302-310.
  37. Elisane Alves, A., Dantas Mota, FM., Neves Martins, C., Almeida Miranda R., de Souza Resende, PR., Stedile Fujimoto, TA., Debs Guesine, T. (2017). Parâmetros seminais após administrações sequenciais de anti-GnRH como método de imunoesterilização em cães. XXII Congresso Brasileiro de

- Reprodução Animal, Santos, SP, Brasil. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.41, n.1, p.560, jan./mar. 2017. Disponível em [www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br).
38. England, G. C. (1997). Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, 51, 123-138.
  39. Evans, C.S., DeNicola, A.J., Eisemann, J.D., Eckery, D.C.; Warren, R.J. (2015). Administering GonaCon™ to white-tailed deer via hand-injection versus syringe-dart. *Human-Wildlife Interact.* 9, 265-272.
  40. Fahim, M. S., Wang, M., Sutcu, M. F., Fahim, Z., & Youngquist, R. S. (1993). Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, 47(1), 107-122.
  41. Ferro, V. A., Costa, R., Carter, K. C., Harvey, M. J., Waterston, M. M., Mullen, A. B., ... & Stimson, W. H. (2004). Immune responses to a GnRH-based anti-fertility immunogen, induced by different adjuvants and subsequent effect on vaccine efficacy. *Vaccine*, 22(8), 1024-1031. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.08.043>.
  42. Garber J, Wayne Barbee R, Bielitzki J, Clayton L, Donovan J, Kohn D, Lipman N, Locke P, Melcher J, Quimby F, Turner P, Wood G, Würbel H. 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C., The National Academies Press.
  43. García Mitacek MC, Carrasco Sangache WF, Stornelli MC, García MF, Coralli F, Praderio R, Stornelli MA. 2021. Evaluación de cambios ultrasonográficos uterinos en gatas tratadas con la vacuna Anti-GnRH Improvac. (Zoetis). Resultados preliminares. XXI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas FCV UNR. Santa Fe, Argentina.
  44. García, G.; Valiente, C.; Aquilano, D.; Corrada, Y.; Gobello, C. Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. *Theriogenology*;71(8):1234-1237. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.017>.
  45. Gimenez, F., Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., Savignone, C. A., Dorna, I. V., de la Sota, R. L., & Stornelli, M. A. (2009). Suppression of estrus in cats with melatonin implants. *Theriogenology*, 72(4), 493-499.

46. Gionfriddo, J. P., J. D. Eisemann, K. J. Sullivan, R. S. Healey, L. A. Miller, K. A. Fagerstone, R. M. Engeman, and C. A. Yoder. (2009). Field test of a single-injection gonadotrophin-releasing hormone immunocontraceptive vaccine in female white-tailed deer. *Wildlife Research* 36:177–184. <https://doi.org/10.1071/WR08061>.
47. Giriboni, J., Lacuesta, L., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. (2020). Chronic use of a GnRH agonist (deslorelin) or immunization against GnRH: effects on testicular function and sperm quality of bucks. *Domestic Animal Endocrinology*, 71, 106395.
48. Goericke-Pesch, S. (2010). Reproduction control in cats: new developments in non-surgical methods. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12(7), 539-546. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.05.005>.
49. 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<sup>®</sup>, regarding suppression of reproductive function in tomcats. *Theriogenology*, 75(5), 803-810.
50. Goericke-Pesch, S., Georgiev, P., Antonov, A., Vodenicharov, A., Navarro, C., & Wehrend, A. (2014). Reversibility of germinative and endocrine testicular function after long-term contraception with a GnRH-agonist implant in the tom—a follow-up study. *Theriogenology*, 81(7), 941-946.
51. Goericke-Pesch, S., Wehrend, A., & Georgiev, P. (2014). Suppression of fertility in adult cats. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 33-40.
52. Goericke-Pesch, S.; Georgiev, P.; Fasulkov, I.; Vodenicharov, A.; Wehrend, A. (2013). Basal testosterone concentrations after the application of a slow-release GnRH agonist implant are associated with a loss of response to buserelin, a short-term GnRH agonist, in the tom cat. *Theriogenology* 80, 65–69.
53. Graham, L.H.; Swanson, W.F.; Wildt, D.E.; Brown, J. L. (2004). Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. *Theriogenology*, 61(6), 1061-1076. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.05.004>.
54. Griffin, B., DiGangi, B. A., & Bohling, M. W. (2010). A Review of Neutering

- Cats. En J. R. August (Ed.), *Consultations in feline internal medicine* (6a ed., pp. 776–792). Saunders Elsevier
55. Griffin, B. (2011). The kindest cut of all. *Animal shelter*.
  56. Griffin, B. (2012). Nonsurgical sterilization of cats and dogs. *Shelter Medicine for Veterinarians and Staff*, 689-696.
  57. Hannesdottir, S. G., Han, X., Lund, T., Singh, M., Van Der Zee, R., Roitt, I. M., & Delves, P. J. (2004). Changes in the reproductive system of male mice immunized with a GnRH-analogue conjugated to mycobacterial hsp70. *Reproduction*, 128(3), 365-371. <https://doi.org/10.1530>.
  58. Herbst, K.L.; Coviello, A.D.; Page, S.; Amory, J.K.; Anawalt, B.D.; Bremner, W.J. A single dose of the potent gonadotropin-releasing hormone antagonist acyline suppresses gonadotropins and testosterone for 2 weeks in healthy young men. *J Clin Endocrinol*; 89(12):5959-5965. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-032123>.
  59. Hermo, L., & Jacks, D. (2002). Nature's ingenuity: Bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.90023>.
  60. Hernández-Encalada, C., & Moran-Obando, W. (2022). la Eficacia de glicerol y gluconato de zinc intratesticular como método anticonceptivo en gatos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 14(1), e908-e908. <https://doi.org/10.24188/recia.v14.n1.2022.908>.
  61. Howard, J. G., Brown, J. L., Bush, M., & Wildt, D. E. (1990). Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary—Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoal Motility and Morphology After Swim-Up Processing. *Journal of andrology*, 11(3), 204-215.
  62. Howe, L. M. (2006). Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66(3), 500-509.
  63. Jacobs TM, Hoppe BR, Poehlmann CE, FerraconeVJD, Sorenmo KU. (2010). Mammary adenocarcinomas in three male cats exposed to medroxyprogesterone acetate (1990–2006). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12 (2): 169-174.
  64. Jana, K., & Samanta, P. K. (2007). Sterilization of male stray dogs with a

- single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. *Contraception*, 75(5), 390-400.
65. Jana, K., & Samanta, P. K. (2011). Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. *BMC veterinary research*, 7(1), 1-16.
  66. Janett F, Lanker U, Jorg H, Hassig M, Thun R (2003) The castration of male lambs by immunization against GnRH. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 145, 291-9. 10.1024/0036-7281.145.6.291.
  67. Janett, F., Gerig, T., Tschuor, A. C., Amatayakul-Chantler, S., Walker, J., Howard, R., ... & Thun, R. (2012a). Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. *Theriogenology*, 78(1), 182-188.
  68. Janett, F.; Gerig, T.; Tschuor, A.C.; Amatayakul-Chantler, S.; Walker, J.; Howard, R.; Piechotta, M.; Bollwein, H.; Hartnack, S.; Thun, R. (2012b). Effect of vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva® in the prepubertal bull calf. *Anim. Reprod. Sci.* 131: 72–80.
  69. Jöchle W, Jöchle M. (1975). Reproductive and behavioral control in the male and female cat with progestins: Long-term field observations in individual animals. *Theriogenology*. 3 (5): 179-185.
  70. Johnson, AK, Jones, RL, Kraneburg, CJ, Cochran, AM, Samoylov, AM, Wright, JC, ... y Samoylova, TI (2020). Phage constructs targeting gonadotropin-releasing hormone for fertility control: evaluation in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2020;22(8):685-695. doi:[10.1177/1098612X19875831](https://doi.org/10.1177/1098612X19875831).
  71. Johnston SD, Osborne CA, Lipowitz AJ. Characterizations of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. *Proceedings of the 11th international congress anim reprod AI Dublin (1988)*, p. 560.
  72. Johnston, S. D.; Root Kustritz, M. y Olson, P. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. (1st.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
  73. Junaidi, A., Williamson, P. E., Cummins, J. M., Martin, G. B., Blackberry,

- M. A., & Trigg, T. E. (2003). Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reproduction, Fertility and Development*, *15*(6), 317-322.
74. Junaidi, A.; Williamson, P.E, Martin, G.B, Stanton, P.G, Black-berry, M.A, Cummins, J.M, Trigg, T.E, 2007. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous GnRH and LH in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod. Fert Dev* *19*, 891–898
75. Junaidi, A., Williamson, P. E., Martin, G. B., Blackberry, M. A., Cummins, J. M., & Trigg, T. E. (2009). Dose–response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reproduction in domestic animals*, *44*(5), 725-734. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01060.x>.
76. Kaneko, J.J.; Harvey, J.W. y Bruss, M.L. 2002. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press. Fifth ed. San Diego. pp 327-480.
77. Kaur, K., & Prabha, V. (2014). Immunocontraceptives: new approaches to fertility control. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/868196>.
78. Kétlen, G.; dos Anjos, R.; Rocha, F.; Nascimento, V.; Magno, A.; Martins, Aline.; de Queiroz, V.; Nunes, Andressa.; Débora, Arícia.; Almeida, G. (2022). Metastatic seminoma in a non-cryptorchid dog previously submitted to vasectomy: case report. *Research, Society and Dev*, *11* (4). DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27269>.
79. Kong, J., Su, F., Liu, Y. y col. The pharmacokinetics of buserelin after intramuscular administration in pigs and cows. *BMC Vet Res* *18*, 136 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03237-0>.
80. Kutzler, M., & Wood, A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, *66*(3), 514-525. doi: S0093-691X(06)00238-X [pii] 10.1016/j.theriogenology.2006.04.014.
81. Kutzler, M.A. (2015a). Alternative methods for feline fertility control: use of melatonin to suppress reproduction. *Journal of feline medicine and surgery*, *17*(9), 753-757. <https://doi.org/10.1177/1098612X15594988>.

82. Kutzler, M.A. (2015b). Intratesticular and intraepididymal injections to sterilize male cats: From calcium chloride to zinc gluconate and beyond. *Journal of feline medicine and surgery*, 17(9), 772-776.
83. 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 hormone. *Biology of Reproduction*, 51(6), 1076-1083.
84. Lee, Y. J., Jo, E. J., Lee, H. W., Hwang, B. R., Kim, Y. H., Park, B. J., ... & Han, J. S. (2019). Evaluation of infertility efficacy of the E. coli expressed STF2-GnRH vaccine in male cats. *Journal of veterinary science*, 20(3).
85. Leoci, R., Aiudi, G., Silvestre, F., Lissner, E. A., & Lacalandra, G. M. (2014). Alcohol diluent provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 1-7.
86. Leoci, R., Aiudi, G., Silvestre, F., Lissner, E. A., Marino, F., & Lacalandra, G. M. (2014). A dose-finding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. *Acta veterinaria scandinavica*, 56(1), 1-8.
87. Levy, J. K., & Crawford, P. C. (2004a). Humane strategies for controlling feral cat populations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(9), 1354–1360. <http://doi.org/10.2460/javma.2004.225.1354>.
88. Levy, J. K., Miller, L. A., Crawford, P. C., Ritchey, J. W., Ross, M. K., & Fagerstone, K. A. (2004b). GnRH immunocontraception of male cats. *Theriogenology*, 62(6), 1116-1130. <https://10.1016/j.theriogenology.2003.12.025>
89. Levy, J. K., Crawford, P. C., Appel, L. D., & Clifford, E. L. (2008). Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. *American journal of veterinary research*, 69(1), 140-143.
90. Levy JK (2011) Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. *Am J Reprod Immunol*, 66, 63-70. 10.1111/j.1600-

0897.2011.01005.x

91. Levy, J. K., Friary, J. A., Miller, L. A., Tucker, S. J., & Fagerstone, K. A. (2011). Long-term fertility control in female cats with GonaCon™, a GnRH immunocontraceptive. *Theriogenology*, 76(8),1517-1525.  
<https://10.1016/j.theriogenology.2011.06.022>.
92. Libermann, S., Martin, K. W., & Fransson, B. A. (2022). Laparoscopic Castration and Sterilization Techniques of the Male Dog. *Small Animal Laparoscopy and Thoracoscopy*, 267-275.
93. Loumaye E, Catt KJ, 1983: Agonist-induced regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 258, 12002–12009.
94. Ludwig, C., Desmoulins, P. O., Driancourt, M. A., Goericke-Pesch, S., & Hoffmann, B. (2009). Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist azagly-nafarelin as a removable implant “Gonazon”; a preclinical trial. *Theriogenology*, 71(7), 1037-1045.
95. Marín Sequeira, LY, & Castillo Gómez, AM (2018). Evaluacion de dos tecnicas quirurgicas de orquiectomia (Escrotal Vs. Pre-escrotal) en caninos domesticos de la ciudad de Camoapa, en el periodo de junio a julio del 2018 (Tesis de doctorado, Universidad Nacional Agraria).
96. Massei, G., & Miller, L. A. (2013). Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: A review of products and criteria for field applications. En *Theriogenology* (Vol. 80, Número 8, pp. 829–838).  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.016>.
97. Max, A.; Jurka, P.; Dobrzyńskim A.; Rijsselaere, T, 2015. Non-surgical contraception in male dogs and cats. *Acta Sci. Pol. Zootechnica* 14(1) 2015, 3–14.
98. McCarthy, R. J., Levine, S. H., & Reed, J. M. (2013). Estimation of effectiveness of three methods of feral cat population control by use of a simulation model. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(4), 502-511.
99. Miller, L. A., J. C. Rhyan, and G. J. Killian. (2004). GonaCon™, a versatile GnRH contraceptive for a large variety of pest animal problems. *Pro-ceedings*

- of the Vertebrate Pest Control Conference 21:269–273.  
[https://digitalcommons.unl.edu/icwdm\\_usdanwrc/371/](https://digitalcommons.unl.edu/icwdm_usdanwrc/371/).
100. Miller, L. A., Johns, B. E., & Killian, G. J. (2000). Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *American Journal of Reproductive Immunology*, 44(5), 266-274. <https://doi.org/10.1111/j.8755-8920.2000.440503.x>.
  101. Munks, M. W. (2012). Progress in development of immunocontraceptive vaccines for permanent non-surgical sterilization of cats and dogs. *Reproduction in domestic animals*, 47, 223-227.
  102. Munson L, Harrenstien LA, Acton AE, Graham PA, Chassy LM, Kirkpatrick JF. Respuestas inmunológicas y reacciones adversas a los inmunoanticonceptivos de zona pelúcida porcina con adyuvante de Freund en gatos domésticos. *Vacuna*. 2005; 23: 5646-54. <https://10.1016/j.vaccine.2005.05.044>.
  103. Muñoz, M., Vargas, I., & Soler-Tovar, D. (2011). Métodos para el control de población canina: Introducción. *Sapuvet*, 2(1), 63-79.
  104. Murray JK, Mosteller JR, Loberg JM, Andersson M, Benka VAW. 2015. Methods of fertility control in cats: Owner, breeder and veterinarian behavior and attitudes. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 17(9):790-9. <https://doi.org/10.1177/1098612X15594994>.
  105. Naz, R. K., Gupta, S. K., Gupta, J. C., Vyas, H. K., & Talwar, A. G. (2005). Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. *Human Reproduction*, 20(12), 3271-3283. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei256>.
  106. Novak, S., Yakobson, B., Sorek, S., Morgan, L., Tal, S., Nivy, R., ... & Raz, T. (2021). Short Term Safety, Immunogenicity, and Reproductive Effects of Combined Vaccination With Anti-GnRH (Gonacon) and Rabies Vaccines in Female Feral Cats. *Frontiers in Veterinary Science*, 429.
  107. Novotny, R.; Cizek, P.; Vitasek, R.; Bartoskova, A.; Prinosilova, P.; Janosovska, M. (2012). Reversible suppression of sexual activity in tomcats with deslorelin implant. *Theriogenology* 78, 848–857
  108. Novotny, R., Vitasek, R., Bartoskova, A., Cizek, P., Prinosilova, P., &

- Novakova, K. (2015). Azoospermia with variable testicular histology after 7 months of treatment with a deslorelin implant in toms. *Theriogenology*, 83 (7), 1188-1193.
109. Nuñez Favre, R; Bonaura, MC; Tittarelli CM; Mansilla-Hermann, D; de la Sota RL; Stornelli MA. (2012a). Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Reproduction in Domestic Animals*. ISSN 0936-6768 47 (Suppl. 6): 232-234.
110. Nuñez Favre, R; Bonaura, MC; Tittarelli CM; Stornelli, MC; de la Sota RL; Stornelli MA. (2012b). Effect of refractoriness to long photoperiod on sperm production and quality in tomcats. *Reproduction in Domestic Animals*. ISSN 0936-6768 47 (Suppl. 6): 235-237. <https://doi.org/10.1111/rda.12049>
111. Nuñez Favre, R. (2013). Efecto del fotoperíodo y de la administración de melatonina sobre la producción espermática en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*). Tesis doctoral <https://doi.org/10.35537/10915/27372>
112. Nuñez Favre, R., Bonaura, M. C., Praderio, R., Stornelli, M. C., de la Sota, R. L., & Stornelli, M. A. (2014). Effect of melatonin implants on spermatogenesis in the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Theriogenology*, 82(6), 851-856
113. Nuñez Favre, R., García, M. F., Mitacek, M. C. G., Rearte, R., Fontaine, C., de la Sota, R. L., & Stornelli, M. A. (2018). Reestablishment of sperm quality after long-term deslorelin suppression in tomcats. *Animal reproduction science*, 195, 302-308.
114. Nutter FB, Levine JF, Stoskopf MK. Capacidad reproductiva de gatos domésticos en libertad y tasa de supervivencia de gatitos. *J Am Vet Med Assoc*. 2004; 225:1399-402. <https://10.2460/javma.2004.225.1399>.
115. Oliveira, E. C., Moura, M. R., Silva Jr, V. A., Peixoto, C. A., Saraiva, K. L., de Sá, M. J. C., ... & de Pinho Marques Jr, A. (2007). Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. *Theriogenology*, 68(2), 137-145.
116. Oliveira, E. C., Moura, M. R. P., de Sá, M. J., Junior, V. A. S., Kastelic, J. P., Douglas, R. H., & Junior, A. P. M. (2012). Permanent contraception of dogs

- induced with intratesticular injection of a zinc gluconate-based solution. *Theriogenology*, 77(6), 1056-1063.
117. Oliveira, E. C. S., Fagundes, A. K. F., Melo, C. C. S., Nery, L. T. B., Rêvoredó, R. G., Andrade, T. F. G.,... & Silva Jr, V. A. (2013). Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. *The Veterinary Journal*, 197(2), 307-310.
  118. 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.
  119. Paranzini, C. S., Sousa, A. K., Cardoso, G. S., Perencin, F. M., Trautwein, L. G. C., Bracarense, A. P. F. R. L., & Martins, M. I. M. (2018). Effects of chemical castration using 20% CaCl<sub>2</sub> with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment. *Theriogenology*, 106, 253-258.
  120. Parks, J. E., & Hammerstedt, R. H. (1985). Developmental Changes Occurring in the Lipids of Ram Epididymal Spermatozoa Plasma Membrane. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod32.3.653>.
  121. Pelaez, Mirtha.; Echevarría, Luisa.; Soler-Tovar, D.; Falcón, N. (2018). Métodos de contracepción en el control poblacional de perros: un punto de vista de los médicos veterinarios de clínica de animales de compañía. *Salud tecnol. vet.* 2: 55-61.
  122. Pelaez, M., Echevarría, L., Soler-Tovar, D., & Falcón, N. (2019). Métodos de contracepción en el control poblacional de perros: un punto de vista de los médicos veterinarios de clínica de animales de compañía. *Salud Tecnol Vet*, 6, 55-61.
  123. Phillips, R. B., Cooke, B. D., Campbell, K., Carrion, V., Marouez, C., & Snell, H. L. (2005). Eradicating feral cats to protect Galapagos land iguanas: methods and strategies. *Pacific Conservation Biology*, 11(4), 257-267.
  124. Phraluk, O., Wajjwalku, W., Siriaroonrat, B., Booddee, O., & Thongtip, N. (2015). Effects of immunization against gonadotropin releasing hormone on

- reproductive functions in male rusa deer (*Rusa timorensis*). The Thai Journal of Veterinary Medicine, 45(1), 1.
125. Pineda, M. H., & Dooley, M. P. (1984). Surgical and chemical vasectomy in the cat. American journal of veterinary research, 45(2), 291-300.
  126. Pineda, M. H., Reimers, T. J., & Faulkner, L. C. (1976). Disappearance of spermatozoa from the ejaculates of vasectomized dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association, 168(6), 502-503
  127. Pineda, M. H., & Hepler, D. I. (1981). Chemical vasectomy in dogs. Long-term study. Theriogenology, 16(1), 1-11.
  128. Reyna JC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, Stornelli MC, Guzzetti J, García Mitacek MC, Stornelli MA. Influencia del fotoperiodo sobre la cantidad de células claras y oscuras en el gato doméstico. in IX Jornadas de divulgación técnico-científicas. 2008 Santa Fe.
  129. Rhodes, L. (2017). New approaches to non-surgical sterilization for dogs and cats: Opportunities and challenges. Reproduction in Domestic Animals, 52, 327-331.
  130. Richter, J. (1996). "Vaccination" against pregnancy: the politics of contraceptive research. The Ecologist, 26(2), 53-61.
  131. Riesenbeck, A.; Klein, R.; Hoffmann, B. (2002). Downregulation, eine neue, reversible Möglichkeit zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden. Prakt. Tierarzt 83, 512–520.
  132. Robaire, B., & Hinton, B. T. (2015). The Epididymis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 691–771. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00017-X>.
  133. Robbins, S. C., Jelinski, M. D., & Stotish, R. L. (2004). Assessment of the immunological and biological efficacy of two different doses of a recombinant GnRH vaccine in domestic male and female cats (*Felis catus*). Journal of reproductive immunology, 64(1-2), 107-119.
  134. Robertson, S. A. (2008). A review of feral cat control. Journal of feline medicine and surgery, 10(4), 366-375.
  135. Romagnoli, S., Siminica, A., Sontas, B. H., Milani, C., Mollo, A., & Stelletta, C. (2012). Semen quality and onset of sterility following administration of a

- 4.7-mg deslorelin implant in adult male dogs. [Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Reprod Domest Anim*, 47 Suppl 6, 389-392. doi: 10.1111/rda.12058.
136. Romagnoli, Stefano, y col. "Length of efficacy and effect of implant location in adult tom cats treated with a 9.4 mg deslorelin subcutaneous implant." *Journal of feline medicine and surgery* 21.6 (2019): 507-519.
137. Romero, G. G., Valiente, C., Aquilano, D., Corrada, Y., & Gobello, C. (2009). Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. *Theriogenology*, 71(8), 1234-37.
138. Root Kustritz MV. 2018. Population control in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 48(4):721-32. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.013>.
139. Sabeur, K., y col. "Effect of GnRH conjugated to pokeweed antiviral protein on reproductive function in adult male dogs. *Reproduction-Cambridge*- 125.6 (2003): 801-806.
140. Savignone CA, Reyna JC, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, García Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Presencia de mucopolisacaridos en el epitelio epididimal del gato domestico en diferentes epocas del año. in XXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. 2007.
141. Schiff, J. D., Li, P. S., Schlegel, P. N., & Goldstein, M. (2003). Rapid disappearance of spermatozoa after vasal occlusion in the dog. *Journal of andrology*, 24(3), 361-363.
142. Sharma S, Hinds LAJJop, sciences b (2012) Formulation and delivery of vaccines: ongoing challenges for animal management. 4, 258
143. Schrater, A.F. (1995). Immunization to regulate fertility: biological and cultural frameworks. *Social Science & Medicine*, 41(5), 657-671. [https://doi.org/10.1016/0277-9536\(95\)00037-8](https://doi.org/10.1016/0277-9536(95)00037-8).
144. Silva, L. D., Onclin, K., Donnay, I., & Verstegen, J. P. (1993). Laparoscopic vasectomy in the male dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, 399-401.
145. Singh, G., Kumar, A., Dutt, R., Arjun, V., & Jain, V. K. (2020). Chemical

- Castration in Animals: An Update. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(4), 2787-2807.
146. Sirivaidyapong, S., Mehl, N. S., & Trigg, T. E. (2012). Delay of puberty and reproductive performance in male dogs following the implantation of 4.7 and 9.4 mg GnRH-agonist deslorelin at an early pre-pubertal age. *Reprod Domest Anim*, 47 Suppl 6, 400-402. doi: 10.1111/rda.12066.
  147. Skorupski KA, Overley B, Shofer FS, Goldschmidt MH, Miller CA, Sørenmo KU. (2005). Clinical Characteristics of Mammary Carcinoma in Male Cats. *J Vet Intern Med*, 19:52–55.
  148. Slatter, D. H. (Ed.). (2003). *Textbook of small animal surgery* (Vol. 1). Elsevier health sciences.
  149. Stevens, J. D., Sosa, J. M., DeAvila, D. M., Oatley, J. M., Bertrand, K. P., Gaskins, C. T., & Reeves, J. J. (2005). Luteinizing hormone-releasing hormone fusion protein vaccines block estrous cycle activity in beef heifers. *Journal of animal science*, 83(1), 152-159. <https://doi.org/10.2527/2005.831152x>.
  150. Stojanovic, S., Uscebrka, G., Zikic, D., & Stukelj, M. (2017). Histological and morphometric examination of the testes of boars and male pigs immunocastrated with Improvac<sup>®</sup>. *Acta Scientiae Veterinariae*, 45(1), 7.
  151. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL. 2009. Seasonal changes in testis cell morphology in male domestic cats (*Felis catus*). *Reprod Dom Anim* 44 (2): 287-290. ISSN 0936-6768.
  152. Stornelli, M. C., Mitacek, M. G., Giménez, F., Bonaura, M. C., Dorna, I. V., de la Sota, R. L., & Stornelli, M. A. (2012). Pharmacokinetics of eCG and induction of fertile estrus in bitches using eCG followed by hCG. *Theriogenology*, 78(5), 1056-1064
  153. Stornelli MA. Efeitos da sazonalidade sobre espermatozoides epididimários e ejaculados .2021 *Revista del Colegio Brasileiro de Reproducción Animal*. 355-360. <http://cbra.org.br/portal/publicacoes/rbra/2021/rbra2021n4-capa.html>.
  154. Ström HB, Jigler E, Hagman R, Frössling J, 2010: Deslorelin treatment in

- male dogs. In: 7th European Veterinary Society Small Animal Reproduction (EVSSAR) Congress, Louvain-la-Neuve, Belgium, May 14–15, p. 92.
155. Tremblay, Y., & Bélanger, A. (1984). Reversible inhibition of gonadal functions by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in adult dog. *Contraception*, 30(5), 483-497.
156. Trigg, T. E., Wright, P. J., Armour, A. F., Williamson, P. E., Junaidi, A., Martin, G. B., ... & Walsh, J. (2001). Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 57, 255-261.
157. Trigg, T.E.; Doyle, A.G.; Walsh, J.D.; Swangchan-Uthai, T. (2006). A review of the advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*. 66:1507–12. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.02.037.
158. Valencia Araya, C.A. (2012). Técnicas de control de poblaciones caninas callejeras usadas a nivel mundial. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fvv152t/doc/fvv152t.pdf>.
159. Valiente, C., Corrada, Y., de la Sota, P. E., Gerez, P. G., & Gobello, C. (2007). Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. [Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Theriogenology*, 68(5), 687-692. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.062.
160. Valiente, C.; Romero, G.G.; Corrada, Y.; de la Sota, P.E.; Hermo, G.; Gobello, C. 2009. Interruption of the canine estrous cycle with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline. *Theriogenology*. 71(3):408-11. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.08.007. Epub 2008 Sep 11. PMID: 18789519.
161. Vansandt L, Kutzler M, Fischer A, Morris K, Swanson WJRida (2017) Safety and effectiveness of a single and repeat intramuscular injection of a GnRH vaccine (GonaCon™) in adult female domestic cats. 52, 348-353.
162. Vargas, J. G., Marín, Y. G., Fuster, M. R., Castillo, A. C., Jorge, W. R., Pachorro, F. A., & Zevallos, C. B. (2020). Chemical castration in dogs by the intra-epididymal application of sclerosing substances. *Revista de*

- Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP), 31(3).
163. Virendra, A., Shrivastava, O.P., Shukla, S.N., Shukla, M.K., Bajaj, N., Mishra, A., Vandre, R., Jatav, R.S. and Pradhan, S., 2020. Effect of Chemical Contraception on Serum Testosterone in Dogs. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(8), pp.2938-2943.
  164. Vitarella Beade, F. (2017). Captura, esterilización quirúrgica y reintroducción de gatos asilvestrados (*Felis silvestris catus*) mediante una combinación anestésica de dexmedetomidina y ketamina.
  165. Wang, M. (2002, April). Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In International Symposium on non-surgical methods for pet population control (pp. 62-65).
  166. Welsh P. 2018. Cat neutering: The earlier the better to tackle overpopulation. *Veterinary Record*. 182(10): 289-90. <https://doi.org/10.1136/vr.k1028>.
  167. Wicks, N., Crouch, S., & Pearl, C. A. (2013). Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. *Animal reproduction science*, 142(3-4), 149-159.
  168. Yoder, C. A., & Miller, L. A. (2010). Effect of GonaCon™ vaccine on black-tailed prairie dogs: immune response and health effects. *Vaccine*, 29(2), 233-239.
  169. Zamaratskaia, G., Rydhmer, L., Andersson, H. K., Chen, G., Lowagie, S., Andersson, K., & Lundström, K. (2007). Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using immunisation against GnRF, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Anim Reproduct Sci*, 108, 37-48.
  170. Zamaratskaia G, Andersson HK, Chen G, Andersson K, Madej A, Lundstrom K (2008) Effect of a gonadotropin-releasing hormone vaccine (Improvac) on steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs. *Reprod Domest Anim*, 43, 351-359. 10.1111/j.1439-0531.2007.00914.x.