



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“EFECTOS DE UNA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA LA HORMONA
LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH-I) EN LA ESPERMATOGÉNESIS,
ESTEROIDOGÉNESIS Y CAMBIOS CONDUCTUALES ASOCIADOS, EN CANINOS
MESTIZOS.”**

MARÍA OLGA BARGSTED ARAVENA

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias biológicas
Animales**

PROFESOR GUÍA: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA M.V. PH.D.

**SANTIAGO – CHILE
2010**



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“EFECTOS DE UNA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA LA HORMONA
LIBERADORA DE GONADOTROGINAS (GnRH-I) EN LA ESPERMATOGÉNESIS,
ESTEROIDOGÉNESIS Y CAMBIOS CONDUCTUALES ASOCIADOS, EN CANINOS
MESTIZOS.”**

MARÍA OLGA BARGSTED ARAVENA

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias biológicas
Animales**

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA
PROFESOR CONSEJERO: BESSIE URQUIETA
PROFESOR CONSEJERO: ULISES VERGARA

**SANTIAGO – CHILE
2010**

ÍNDICE

ÍNDICE.....	0
RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
Perros en Chile y el mundo	5
Problemas conductuales asociados a testosterona.....	6
Sistemas de control poblacional	7
Métodos de control de reproducción	7
Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I)	11
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
1. Animales experimentales.....	18
2. Preparación del péptido a inocular	18
3. Inmunización y toma de muestras	20
4. Procesamiento y evaluación de las muestras	20
5. Evaluaciones conductuales	23
6. Análisis histológico testicular.....	24
RESULTADOS	25
Identificación del péptido GnRX G/Q recombinante purificado por electroforesis.....	25
Determinación de los niveles de IgG anti-GnRX G/Q desde el suero de los animales inmunizados.....	26
Determinación de los niveles de IgG anti-GnRH desde el suero de los animales inmunizados.....	27
Medición de la concentración sérica de testosterona.....	28
Niveles de IgG y concentración sérica de testosterona de diferentes individuos	29
Evaluación conductual.....	31
Agresividad.....	31
Marcaje de orina	34
Líbido: Enfrentamiento a orina de hembra en celo	35
Estudio histológico	36
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

La población canina en Chile y el mundo, va en un permanente aumento, generando problemas tanto para los humanos como para los mismos animales. Por esto, existe actualmente gran interés en encontrar métodos eficientes, seguros y económicamente viables para la implementación de programas de control poblacional.

Para controlar la población existen diversos mecanismos. Aquellos que pretenden disminuir la natalidad y por consiguiente, frenar el crecimiento, están enfocados en disminuir la reproducción de los individuos. Alternativas que involucran incluyan a los machos son altamente atractivas, por el mayor potencial reproductivo de los mismos, en relación al potencial de las hembras. Entre las diferentes técnicas, la inmunocastración surge como una posible herramienta para lograr estos objetivos, ya que ofrece ventajas en comparación a tratamientos hormonales, químicos, irradiativos y a la esterilización quirúrgica.

Por lo anteriormente descrito se realizó este estudio, que tuvo como objetivo, visualizar los efectos de una vacuna recombinante contra la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-I) en la fertilidad canina, mediante la evaluación y observación de cambios en la espermatogénesis, esteroidogénesis y en conductas asociadas a la testosterona, tales como la agresividad, marcaje territorial y libido.

Para esto, se inmunizaron 7 perros adultos mestizos con el péptido recombinante GnRX G/Q. Se aplicó una dosis única al día 1 y 21 con 250µg de proteína en 1 ml de adyuvante y al día 425, a dosis única con 500µg de proteína en 1 ml de adyuvante. Se evaluaron las concentraciones de inmunoglobulinas, concentraciones séricas de testosterona y, se realizaron observaciones y estudios conductuales. Además, se realizó un estudio histopatológico de testículo y epidídimo, al final del ensayo.

En todos los animales inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q hubo un aumento en la producción de inmunoglobulinas anti GnRXG/Q a partir del día 60 post vacunación. Además, fue posible observar que existe inmunogenicidad cruzada entre la hormona nativa GnRH-I y la proteína recombinante inoculada. Así mismo, se pudo visualizar una gran variabilidad individual en las respuestas de esteroidogénesis y conductuales. Recomendamos continuar con estudios para estandarizar dosificación y para evaluar la sensibilidad de diferentes *kits* disponibles para la estimación de las concentraciones plasmáticas o séricas de testosterona.

Sin embargo, la inmunización fue capaz de disminuir la actividad espermatogénica y generar alteraciones en testículo y epidídimo de los animales vacunados, en relación al control no tratado.

Por lo tanto, creemos que la vacuna creada en el laboratorio BIOVETEC de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, puede proponerse como una alternativa para el futuro control de la fertilidad e intervenir de manera efectiva en el problema de los caninos como plaga urbana.

SUMMARY

Canine population in Chile is permanently growing in number, generating huge trouble for humans as for the animals. This is why there is a big interest in finding efficient, safe and economically profitable methods for a good population control program. To do so, there are different mechanisms. Those focus on birth control, intent to reduce fertility and reproduction.

In this sense, a method that involves males is highly attractive, because of the great reproductive potential that males have as they are compared with females. In this category fits immunocontraception techniques. They also highlight because of their benefits compare to other methods like hormones, chemical injection, irradiatives and surgery.

The main objective of this study, was to test the effects of a recombinant peptide vaccine against gonadotropin releasing hormone (GnRH-I) in dogs fertility. This was accomplished by measuring spermiogenesis, steroidogenesis, aggression and sexual behaviour.

To this purpose, 7 grown healthy crossbreed dogs were immunized with recombinant peptide GnRX G/Q. They were inoculated at day 1 and 21 with 250µg of protein in 1 ml of adjuvant, and at day 425, with 500µg of protein in 1 ml of adjuvant. We measured concentrations of total immunoglobulin and testosterone from serum samples. The animals were also followed through the study for behaviour analysis. At the end of the experiment surgery was made, and testes were extracted for histopathological examination.

In all animals immunized with recombinant peptide GnRX G/Q there was an increase in immunoglobulin production anti GnRX G/Q by day 60. It was also possible to demonstrate cross reactivity with native GnRH hormone. In testosterone and behavioural measures, there was highly variable response among individuals. More studies should be made in relation to appropriate dosification and to compare sensitivity of different testosterone kit assay. However, the vaccine was able to decrease testes activity, as well as produce histological alterations of the testicular and epididymal tissue.

Therefore, we believe that the vaccine created in BIOVETEC laboratory, in Universidad de Chile's Veterinary and Pecuary Sciences Faculty, could be a reliable alternative for the future of fertility control. In that way we can effectively intervene in dogs urban plague problem.

INTRODUCCIÓN

Los perros han acompañado al hombre durante miles de años. Sin embargo, en este último tiempo, la población canina ha ido en considerable aumento, tanto en Chile como en el resto de mundo, convirtiéndose en un problema social de gran envergadura.

Por esto, es de vital importancia la creación de protocolos que logren controlar el número de animales, principalmente de aquellos perros vagabundos o callejeros, que pueden significar un alto riesgo sanitario, tanto por la diseminación de enfermedades zoonóticas, mordeduras, por generar accidentes de tránsito, contribuir a la contaminación ambiental, como por el impacto en el bienestar de ellos mismos.

Para lograr este objetivo, se ha intentado disminuir la población mediante la eliminación de un alto número de animales. Este procedimiento es ineficaz y objetado desde el punto de vista ético. Así, el método de control poblacional más frecuentemente empleado consiste en el control de la natalidad, a través de la esterilización de los individuos.

Entre las alternativas de esterilización se describen, la castración quirúrgica y el uso de hormonas sexuales, que se caracterizan por ser poco aplicada a los machos, que tienen un mayor impacto en el incremento poblacional que las hembras. También existe la castración química, pero entre sus desventajas destacan su alto costo, ser dolorosa, y por lo tanto, poco empleada y mal percibida por la sociedad.

Actualmente, han aparecido otras opciones, como la inmunocastración, mediante la cual se podrían disminuir considerablemente los efectos adversos de las anteriores y es además capaz de suplir algunas deficiencias de los métodos tradicionales, como poder implementarse tanto en hembras como machos y ser poco invasiva, entre otros.

Dentro de la inmunocastración, existen las vacunas anti-hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-I), que mediante la inducción de inmunoglobulinas específicas,

logra una reducción de los niveles de esta hormona hipotalámica. Esto produce una disminución del estímulo para la síntesis y secreción de gonadotrofinas, conduciendo finalmente a la caída de la concentración sérica de esteroides sexuales y por ende, a una falla en la espermatogénesis, en los machos y la detención del ciclo estral en las hembras, generando en ambos la esterilidad.

De igual manera, la disminución de testosterona en los machos, afectaría ciertas conductas ligadas a ella, particularmente la agresividad, el marcaje territorial y la atracción de hembras en celo.

Por lo anteriormente expuesto, en el laboratorio BIOVETEC de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se probó el efecto de una nueva vacuna recombinante contra la hormona GnRH-I, sobre la esteroidogénesis, espermatogénesis y algunas variables conductuales asociadas, de manera de evaluar la factibilidad de su uso como una alternativa para el futuro control de la fertilidad, interviniendo de manera efectiva el problema de los caninos como plaga urbana.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Perros en Chile y el mundo

Actualmente, los perros se han convertido en los animales de compañía preferidos por los seres humanos. Sin embargo, se reconoce la relevancia sanitaria de la interrelación que ocurre entre hombre y perro, por el papel de esta especie animal, como transmisor directo o como huésped de numerosas enfermedades, de importancia en la salud pública. A esto se agrega el desinterés de algunos propietarios por el cuidado animal, la falta de control médico veterinario regular, y el desconocimiento de normas sanitarias básicas y de manejo. Todo lo anterior se traduce en un exceso de animales, producto de su reproducción descontrolada, incrementando el riesgo de salud para las personas, aumento de perros callejeros y vagabundos, la contaminación por heces, molestia social y crueldad. Así como también en un aumento de mordeduras y ataques de perros a las personas (Rojas, 2005).

A nivel nacional, puntualmente en Santiago, la población canina ha sido descrita como una población joven, con un predominio de machos y mestizos. Es más, se estima que la población canina ha aumentado en los últimos años, siendo cada vez más estrecha la proporción hombre: perro (Acuña, 1997). De acuerdo a las características de la población canina en la ciudad de Santiago, se puede consignar que existe un predominio de perros machos. En cuanto al tamaño, predomina la talla mediana y la población adulta es la numéricamente más importante (Echeverría, 2004). Asimismo, Espínola (2004) concluyó que la población canina con dueño, observada en las calles de Santiago, es bastante numerosa, fluctuando entre 150.136 y 215.606 perros.

Estudios demográficos en la comuna de Lo Prado clasifican a la población canina como joven, dado que el 62,9% de la población son individuos menores de 5 años. Además, considerando que los porcentajes de esterilización en caninos, alcanza 8,3% en hembras y 0,5% en los machos, puede deducirse que existiría un gran potencial de crecimiento de la población de perros, si no se realiza un control adecuado de su reproducción (Rojas, 2005).

Bustamante (2008), analizó demográficamente la población de perros de la comuna de Santiago. Observó que el crecimiento se ha mantenido constante en los últimos 5 años, estimándose que en la actualidad, la población canina alcanzaría los 37.383 ejemplares y los programas de esterilización quirúrgica realizados a través de las Municipalidades en diferentes comunas, aumentan significativamente la proporción de hembras esterilizadas, pero esto no parece tener un efecto directo en la disminución del tamaño poblacional.

Problemas conductuales asociados a testosterona

A raíz de la sobrepoblación de caninos, el gran número de hembras y machos que deambulan por las calles generan problemas de tipo estético, de agresividad, atropellos por vehículos motorizados, entre otros (Espínola, 2004). Por esto, los problemas conductuales asociados al dimorfismo sexual y particularmente a la testosterona, son un objetivo claro para tratar de minimizarlos mediante técnicas socialmente aceptadas. En un estudio realizado en la ciudad de Santiago, se determinó que los perros entre 1 y 3 años de edad se presentaban con mayor frecuencia problemas de agresividad. Con relación al sexo, los machos fueron los más involucrados. En cuanto a las razas, las más incriminadas en problemas de agresiones fueron Rottweiler, Ovejero Alemán, Cocker Spaniel y Mestizos (Adasme, 2004).

Se ha visto que los perros recurren a la orina para marcar el territorio o, para mostrar su intolerancia frente a otros congéneres. Esta conducta es propia de los machos, que intentan colocar sus marcas de orina lo más elevadas posible. Esta conducta aparece a las 19 semanas de vida en relación con el aumento en los niveles de testosterona. Igualmente, los machos muestran gran interés por las secreción vulvar y orina de las hembras en celo, reflejándose entre otras, en un aumento del marcaje urinario y otras conductas reproductivas (De Miguel, 2005).

Se reconoce que los andrógenos tienen un efecto facilitador en la expresión de la agresividad canina, haciendo que un perro intacto reaccione más rápido, con mayor intensidad y por un tiempo prolongado (Overall, 1997). Además, la testosterona estimula el

“vagabundeo”, el marcaje de territorio mediante orina y facilita las peleas. Aunque la castración realmente disminuye estas conductas y, pareciera ser efectivo en la disminución de la agresividad en un 60% de los perros, no resuelve todos los casos de violencia entre perros (Frank, 2007). Root (2005) por otra parte, plantea que la castración puede ser una técnica efectiva para el control de algunas conductas en los machos caninos y felinos, siendo más notorio en las conductas con dimorfismo sexual, tales como el marcaje urinario, el vagabundeo, y el deseo de montar en los machos.

Sistemas de control poblacional

Eliminación: Estudios ecológicos demuestran que bajo condiciones óptimas, una población determinada de perros puede llegar a triplicar su número cada año. En condiciones reales, la población crece rápidamente y llega a un equilibrio según las capacidades del ambiente, dependiendo de la disponibilidad y calidad de los recursos (refugio, alimento y agua), actualmente entregados casi exclusivamente por el humano. También se ha observado que cualquier intento de reducción de la densidad de la población canina mediante el aumento de la mortalidad, es compensada rápidamente a través del incremento en la reproducción y del porcentaje de sobrevivencia. Así, la expectativa de vida de los sobrevivientes aumenta, porque tienen más y mejor acceso a los recursos disponibles (Wandeler *et al.*, 1988).

Así mismo, Butcher (2000) describe que para resolver el problema de la sobrepoblación canina, la eliminación de individuos capturados es inefectiva, ya que el tamaño de la población canina no controlada se recupera por la reproducción de los sobrevivientes y por migración, hasta nuevamente llegar a su nivel crítico.

Métodos de control de reproducción

Existen diversas opciones para la prevención de la actividad reproductiva, que finalmente lograrían disminuir la población al mediano plazo, en conjunto con programas de educación sobre tenencia responsable. A continuación se describen los de mayor relevancia:

Esterilización quirúrgica:

Ovariohisterectomía: Es la técnica más popular e implica la remoción bilateral de los ovarios más el útero. Las desventajas están asociadas al uso de anestesia general, y en

algunos casos se puede presentar incontinencia urinaria, cambios en la textura y color del pelaje.

Orquiectomía: Involucra la remoción quirúrgica de los testículos (Reyes M., 1997).

La castración quirúrgica es la vía más eficaz para prevenir preñez en animales domésticos, sin embargo, los costos son altos, es laborioso, requiere anestesia, pueden ocurrir infecciones post quirúrgicas y no es reversible (Kutzler y Wood, 2006).

Además, es muy baja la frecuencia de esterilización de perros machos, ya que socialmente no es aceptado, por tanto la tasa de esterilización está por debajo de lo necesario para lograr una disminución efectiva poblacional (Rojas, 2005).

Métodos mecánicos:

- Dispositivos intrauterinos e intravaginales: Éstos requieren su colocación quirúrgica, por lo que es difícil de aplicarlo masivamente e incluso no es recomendado su uso en general en perras, por la variabilidad de tamaños y por requerir sedación, por el riesgo de producir vaginitis y por no ser siempre efectivos. De uso exclusivo en hembras. (Reyes M., 1997).

Métodos farmacológicos:

Aquí se encuentran principalmente las hormonas, dentro de las cuales se pueden nombrar:

- Progestágenos: se pueden usar para la postergación del estro, los fármacos comercializados son Acetato de Medroxiprogesterona, Acetato de Megestrol y Proligestona. Las desventajas radican en la corta duración y/o baja eficacia, deben manejarse cuidadosamente las dosis, el momento y el tiempo de administración. Además de necesitar propietarios responsables para su aplicación. Por otra parte, se describe que los progestágenos usados tienen diversos efectos adversos tales como enfermedades uterinas, diabetes, tumores mamarios y están contraindicados en perras con antecedentes de infecciones del tracto genital o a nivel mamario.

- Testosterona: se ha usado en machos y hembras, con resultados que difieren en eficacia. Se deben considerar variables como la dosificación según raza o tamaño del animal. En prepúberes, está contraindicada su aplicación, por causar el cierre prematuro de los cartílagos de crecimiento de los huesos y anomalías urogenitales severas. (Reyes M., 1997).

En hembras, se describen efectos adversos como hipertrofia del clítoris, vulvovaginitis, aumento de las glándulas sebáceas, enronquecimiento de la voz y disminución del colesterol sanguíneo. No se recomienda su uso por mas de 2 años seguidos y tampoco se recomienda el uso en perros de raza Bedlington terries ya que presentan alta probabilidad de presentar falla hepática (Kutzler y Wood, 2006).

Métodos químicos e irradiativos:

- Irradiativos: Realizados fundamentalmente en machos y requieren de unos 60 días de tratamiento con rayos X, por lo que se estima poco práctico y muy costoso.

- Vasectomía Química: Este método involucra la inyección bilateral de sustancias irritantes dentro de las colas de los epidídimos. La reacción cicatricial que se produce a nivel del tejido epididimario en el sitio de inyección, bloquea el pasaje de los espermatozoides desde el epidídimo al conducto deferente. Evita las desventajas de la cirugía. Sin embargo, es importante considerar que se pueden producir algunas adhesiones entre el escroto y la cola del epidídimo cuando la solución cae dentro de la cavidad escrotal, pudiéndose desarrollar áreas necróticas y úlceras en el escroto. Se han buscado agentes esclerosantes que actúan inyectándolos a nivel de la cola del epidídimo, bloqueando los túbulos y produciendo finalmente azoospermia, pero se debe profundizar en estudios sobre sus reacciones adversas y el tiempo de duración de la infertilidad. (Reyes, 1997).

- Orquiectomía Química: Consiste en una inyección intratesticular de distintas soluciones que causan la interrupción de la generación de espermios y alteración de la producción de hormonas sexuales. Dentro de los agentes químicos que destruyan el tejido testicular, el más estudiado es el gluconato de Zinc. Éstos métodos son altamente eficaces, pero generalmente producen una gran respuesta inflamatoria, pueden inducir epididimitis, es doloroso y poco aceptado socialmente (Bowen, 2008).

Un ejemplo de lo anterior es el compuesto llamado Neutersol® (gluconato de zinc con arginina). En el año 2002 la FDA (food and drug administration) en E.E.U.U aprobó su comercialización para el uso en cachorros de 3 a 10 meses de edad. La dosis a inyectar depende del tamaño testicular, que va generalmente de 10 a 27 mm. El producto fue sacado del mercado y dejó de comercializarse en Estados Unidos el año 2005. Su aplicación requería sedación, no podía ser aplicado en animales criptóquidos ni con malformaciones

testiculares, no producía bajas considerables de testosterona y no lograba inducir cambios en libido u otras conductas sexuales indeseadas. Producía gran inflamación de escroto y testículos así como también vómitos (Root, 2005).

Vacunas anticonceptivas:

No existe un método anticonceptivo ideal, pero por definición eficiente, seguro, económicamente asequible, de largo periodo de acción, reversible y que requiera pocas administraciones. Dada entonces, la necesidad de encontrar un método efectivo de control de población canina, es que las vacunas anticonceptivas se han propuesto como una alternativa que cumplen con la mayoría, si no todas las propiedades de la anticoncepción ideal (Naz *et al.*, 2005).

Las moléculas que se han estudiado para el uso de vacunas principalmente en humanos, atacan a la función gamética, tales como antígenos espermáticos, a antígenos contra la zona pelúcida y contra el desarrollo del cigoto:

- Vacunas Anti-Espermatozoides: Son aplicables en hombres y mujeres, ya que los espermatozoides tiene tanto auto como iso-antígenos, y por ende, ambos sexos pueden producir anticuerpos. Sin embargo, en general no producen una respuesta prolongada en el tiempo y generalmente son de baja eficacia. Actualmente se están realizando estudios para asociar diferentes antígenos para generar una mejor respuesta (Naz *et al.*, 2005).

- Vacunas Anti- Zona Pelúcida (ZP): Durante la fertilización, la ZP que rodea el ovocito en los mamíferos juega un rol fundamental en el reconocimiento y unión del espermatozoide al ovocito. Es capaz de generar respuesta mediante la formación de anticuerpos contra sus glicoproteínas, teniendo variabilidad de eficacia entre los distintos tipos. En general se recomienda el uso de las glicoproteínas purificadas e idealmente creadas a partir de proteínas recombinantes, para evitar la contaminación con componentes ováricos y para poder producirlo masivamente. Como desventajas se describe en algunos casos, la disrupción del ciclo menstrual y que se ha encontrado gran variabilidad de eficacia en diferentes especies de primates no humanos (Gupta *et al.*, 2004).

- Vacunas Anti-HCG: La gonadotropina coriónica humana (HCG) es una hormona liberada inicialmente por el blastocisto, por lo que vacunas a este nivel actuarían posterior a la

fertilización. Las mujeres permanecen con ovulación, producción de hormonas sexuales y ciclo menstrual normales. Los anticuerpos anti-HCG previenen la implantación del embrión en el endometrio. Uno de los mayores problemas para generar una vacuna efectiva y sin efectos adversos radica en eliminar la alta reacción cruzada que existe entre la hormona HCG y las hormonas sexuales: folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), según la especie. Hasta la fecha además, se reconoce una efectividad cercana al 60-80%, lo cual en humanos no es aceptado para la comercialización, por lo que permanece en estudios para encontrar un adyuvante más adecuado (Naz *et al.*, 2005).

Se han hecho pruebas para generar vacunas anti-zona pelúcida en animales, sin embargo hasta la fecha no hay datos concluyentes. Por ejemplo, en un estudio realizado por Srivastava *et al.* (2002) obtuvieron resultados de esterilidad en machos, pero no en hembras, aunque en ellas si se observaron cambios a nivel histológico ovárico como la inhibición del crecimiento folicular, posiblemente debido a atrofia de la zona pelúcida.

De las moléculas estudiadas para generar vacunas de uso principalmente en animales, están las dirigidas a la producción de gametos, atacando a la hormona folículo estimulante (FSH), y a la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I):

- Vacuna Anti- FSH: Las pruebas hasta ahora realizadas describen que las vacunas son toleradas, pero sin conseguir una disminución en el recuento espermático ya que no ha sido posible conseguir títulos de anticuerpos adecuados (Delves, 2004).

Diferente es el caso de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I), que ha sido capaz de generar mejores respuestas en los animales y ha sido probada en diferentes mamíferos, tanto en machos como en hembras con alto potencial de investigación (Naz *et al.*, 2005).

Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I)

La hormona liberadora de gonadotrofinas es altamente conservada en mamíferos en machos y hembras, por lo que tecnologías para el control de la fertilidad, basadas en esta hormona tiene un amplio rango de aplicaciones en diferentes especies. Además de usos muy variados, tales como el control de fertilidad, libido, mejorar la calidad de la carne, principalmente en cerdos, mediante la eliminación de olores desagradables producidos por

la testosterona en la canal y su aplicación en terapias para neoplasias hormono-dependientes (Turkstra y Meloen, 2006).

Actividad y función:

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I, del inglés gonadotropin-releasing hormone), también conocida como hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH, del inglés luteinising-hormone releasing hormone) es un péptido formado por 10 aminoácidos, producida por neuronas hipotalámicas. Es transportada vía axones por los vasos portales a la eminencia media donde se libera a la circulación sanguínea. Los vasos sanguíneos llegan hasta la hipófisis, permitiendo la llegada de la GnRH en altas concentraciones. Aquí se une a los receptores de las células gonadotropas para lograr la estimulación y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) a la circulación sanguínea. Su secreción y liberación en hipófisis ocurre de forma pulsátil, por lo que la secreción y liberación de FSH y LH es secretada también de forma pulsátil (Talwar, 1999).

En los machos, la LH estimula la síntesis y secreción de andrógenos, principalmente testosterona, a partir de las células de Leydig a nivel testicular. La FSH por otra parte, se une a receptores específicos en las células de Sertoli para estimular la producción de algunos factores de crecimiento y de la proteína ligadora de andrógenos (ABP), que es necesaria para mantener alta la concentración de testosterona en los túbulos seminíferos. En las hembras, la FSH induce el crecimiento folicular y secreción de estradiol e inhibina en las células de la granulosa. Los altos niveles de estradiol, producidos por folículos maduros, producen una retroalimentación positiva a nivel hipotalámica en el proestro, causando el alza de LH responsable de la ovulación. En este período, la inhibina secretada por las células de la granulosa, inhiben la secreción de FSH. Luego de la ovulación, las células de la teca y la granulosa luteinizadas comienzan a producir altos niveles de progesterona, que a su vez inhibe la secreción de LH y FSH a nivel hipofisiario (Christiansen, 1989).

Además, se reconoce que la hormona liberadora de gonadotrofinas tendría posibles roles directos en órganos extrahipofisarios, como en el testículo, próstata y placenta (Turkstra y Meloen, 2006).

Isómeros:

Además del decapeptido clásico conocido como GnRH-I (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂), existen 2 isómeros, encontrados principalmente en vertebrados inferiores, pero que también están en mamíferos incluyendo al humano (GnRH-II y GnRH-III). Sin embargo, su rol fisiológico aún no ha sido descrito. Por esto, se reconoce a la GnRH-I como la hormona más importante en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, por lo que se representa clásicamente como GnRH. (Naz *et al.*, 2005).

Uso de agonistas y antagonistas para inducir esterilidad

Existen agonistas (análogos) de GnRH: péptidos similares a la hormona endógena que han sido modificados principalmente en los sitios de degradación enzimática, permitiéndoles mantenerse en el torrente sanguíneo por más tiempo. Su mecanismo de acción radica en la permanencia de altos niveles de la hormona liberadora de gonadotropinas en el tiempo, lo cual produce una disminución de los receptores libres de GnRH y desensibilización de las células gonadotropas hipofisiarias (Hannesdóttir *et al.*, 2004).

Sin embargo, según lo descrito por Tarlatzis y Kolibianakis (2007), los agonistas producen un alza inicial de hormonas sexuales, tanto LH como FSH y pueden permanecer elevadas por varios días. Además en las pruebas con distintas especies, se ha observado que los resultados son inconsistentes. Han sido usados para prevenir la ovulación en vacas, mientras que en los toros estimulaba la actividad gonadal. Por otra parte, existe una proporción de animales que continúa ciclando durante el tratamiento con agonistas de GnRH, es decir, hay individuos que no responden a este método.

El mecanismo de acción en el caso de los antagonistas, está basado en la unión permanente del receptor GnRH, previniendo que la hormona endógena se pueda unir al receptor. Si bien éstas no producen alza inicial obteniendo resultados inmediatos, los efectos entre machos y hembras y en diferentes especies son altamente variables, el alto costo de producción y el hecho de que no se han logrado efectos prolongados, lo han convertido en una alternativa muy poco utilizada (Hoffmann y Engel, 2004).

Vacuna anti-GnRH:

La inmunización contra GnRH ha sido estudiada para producir esterilidad en los animales. Ésta se produce mediante una neutralización de la hormona GnRH en la circulación sanguínea portal hipofisiaria mediada por la formación de anticuerpos que se unen específicamente a la hormona endógena, dejándola inactiva para continuar la cadena de estimulación y liberación de hormonas sexuales. Esto resulta en la supresión de la secreción de gonadotrofinas, inhibiendo el desarrollo folicular y la ovulación, al igual que el comportamiento reproductivo, en el caso de las hembras (Herbert y Trigg, 2005). En los machos, la supresión de la liberación de LH y, en menor grado la de FSH, genera disminución de testosterona, afectando la espermatogénesis y el comportamiento sexual (Hoffmann y Engel, 2004).

Inmunización pasiva contra GnRH:

La inmunización pasiva consiste en la administración de anticuerpos séricos, protectores a un individuo susceptible, lo que proporciona una protección temporal por semanas o meses (Maldonado, 2007). Sus efectos se pueden observar rápidamente, desde las 24 hrs. post inmunización, sin embargo requiere de la inoculación de una gran cantidad de antisuero, administraciones frecuentes para lograr la disminución hormonal necesaria, para ser considerada esterilizante (Talwar, 1999).

Inmunización activa contra GnRH:

La hormona GnRH es un antígeno débil, debido a que es un decapeptido, por tanto, pequeño y de bajo peso molecular. Además, al vacunar contra péptidos endógenos, al no generar gran inmunogenicidad por si mismos, se recomienda usarlos junto a adyuvantes de potente acción. Sin embargo no muchos adyuvantes son permitidos para la aplicación en la práctica. Se ha visto que la inmunogenicidad de la hormona nativa puede incrementarse uniendo el péptido GnRH a moléculas de forma repetida (tándem), y se logra un efecto aun mayor si el péptido es “dimerizado” y se le introducen aminoácidos no nativos. Más aun, el efecto puede permanecer por más tiempo combinándolo con proteínas *carriers* y adyuvantes adecuados (Sáenz *et al.*, 2009).

Avances recientes en la tecnología de vacunas anti-GnRH incluyen el desarrollo de vacunas recombinantes, donde el antígeno consiste en varias copias de la hormona ligada en cada extremo con una proteína Carriers o transportadora, logrando pesos moleculares incluso mayores a los 50KDa, suficientemente grandes como para generar respuesta inmune. En un estudio realizado por Robbins Jelinski y Stotish (2002) se logro la inhibición de la reproducción en el 100% de gatas prepúberes por un periodo mayor a los 2 años y fue efectiva en el 75% de los gatos machos inmunizados.

La supresión del eje reproductivo mediante la inmunoneutralización de la GnRH depende de la cantidad de anticuerpos neutralizantes. Es por esto, que los niveles hormonales y la actividad gonadal se restaura cuando los títulos de anticuerpos bajan de cierto rango, siendo insuficiente para neutralizar completamente a la hormona liberadora de gonadotrofinas. En un estudio realizado en caninos adultos, luego de lograr reducir los niveles séricos de testosterona, los títulos de anticuerpos declinaron en un periodo aproximado de 50 semanas desde la inmunización. Luego de este período, los niveles de testosterona se estabilizaron en el rango normal para la especie Sin embargo, se describe que la reversibilidad de la inmunización anti-GnRH en animales jóvenes puede verse afectada o retardada, posiblemente por un impedimento en la funcionalidad hipotálica normal, aunque los mecanismos son todavía desconocidos (Miller, Rhyan y Killian, 2004).

En otro estudio se inmunizó sólo con una dosis de GnRH asociado a un adyuvante comercial (AdjuVac), que contenía *Mycobacterium avium*, logrando niveles de testosterona cercanos a cero por al menos 4 meses en gatos adultos (Turkstra y Meloen, 2006). En estos estudios se ha observado un éxito anticonceptivo que va entre el 50 a 90%, incluso se ha visto hasta 100% de eficacia. Así, se ha observado que el control de la fertilidad en un periodo cercano a los 12 meses puede lograrse, aunque generalmente ha requerido múltiples vacunaciones.

En términos de usos de vacunas para controlar una población de cierta especie animal, se reconoce que no siempre es requerida una eficacia muy alta, particularmente cuando se cuenta con otras ventajas como el costo de producción, facilidad de aplicación, aceptación social, etc. A modo de ejemplo, Turner y Kirkpaytick (2002) observaron que una vacuna

con un 50 a 70% de eficacia fue capaz de reducir con éxito la población de caballos salvajes.

Cui (2003), realizó un estudio en China, sobre los efectos de una vacuna anti GnRH en corderos, donde las concentraciones plasmáticas de testosterona de los animales inmunizados, se mantuvieron en un nivel similar al de los corderos castrados quirúrgicamente, cercanos a cero. Además, observaron que la aparición de la conducta sexual fue retardada y disminuida en comparación con corderos enteros. En animales enteros es común observar el acercamiento a las hembras, que olfateen la zona perineal, golpeen la tierra con las manos, tengan respuesta flemen y haya erección. Sin embargo, de los corderos inmunizados, sólo un bajo porcentaje mostró débil interés por hembras en celo, conducta de monta, sin observar ninguna erección. Estos datos recopilados son similares a los obtenidos en animales castrados quirúrgicamente.

La hormona liberadora de gonadotrofinas es de las pocas hormonas peptídicas que han sido inmunoneutralizantes de forma efectiva con importantes resultados, principalmente en relación al efectivo control reproductivo en medicina veterinaria o para el control de algunos cánceres hormona dependiente en medicina humana (Sáenz *et al.*, 2009).

En el laboratorio de Biotecnología Veterinaria (BIOVETEC), de nuestra Facultad, se ha desarrollado una vacuna de estas características. Es un péptido recombinante con una estructura primaria repetida, que incorpora la secuencia aminoacídica de la hormona liberadora de gonadotrofinas, fusionada con una secuencia con actividad inmunogénica.

OBJETIVO GENERAL

Comprobar los efectos de la vacuna recombinante contra GnRH-I en la espermatogénesis, esteroidogénesis y cambios conductuales asociados en un grupo de caninos mestizos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la capacidad inmunogénica de la vacuna anti-GnRH-I, mediante la medición de inmunoglobulinas contra GnRH-I en el tiempo.
- Visualizar los cambios en la curva de concentración sérica de testosterona en los caninos inmunizados, antes de la inoculación y a lo largo del estudio.
- Observar variaciones conductuales en los animales vacunados contra GnRH-I.
- Describir los posibles cambios histológicos testiculares en los animales vacunados, al finalizar el estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales experimentales

Se utilizaron siete caninos macho para el grupo de inmunización. Todos mestizos y adultos, de entre dos y siete años de edad, sanos, que residen en la Facultad de Agronomía y Cs. Forestales de la Universidad de Chile. Para el segundo año de estudio, sólo se contó con 4 de los 7 individuos inmunizados.

Ellos fueron sometidos a las mismas condiciones de manejo a lo largo del estudio.

Como controles se utilizaron 2 perros mestizos adultos castrados quirúrgicamente el año anterior y 4 machos mestizos adultos enteros, de los cuales se castraron 2 individuos al finalizar el estudio.

2. Preparación del péptido a inocular

2.1 Inducción de la expresión del péptido GnRX G/Q

Bacterias *E. coli* BL21 pLys S transformadas con el vector para GnRX G/Q, péptido diseñado en el Laboratorio Biovetec de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, fueron inducidas para expresar la proteína recombinante His-GnRX G/Q. Esto se realizó incubando las bacterias transformadas en 500 ml de medio Luria, en agitación orbital durante 6-7 horas hasta un OD₅₉₅ de 0.6. Luego se le agregó 0,1 mM de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) como inductor de expresión de la proteína recombinante y se incubó nuevamente en agitación orbital durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 4500 x g durante 20 min, se resuspendieron durante 60 minutos en 20 ml en tampón de lisis desnaturante (8 M Urea, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris pH 8,0) a 4°C y se aplicó ultrasonido durante 60 segundos para producir la ruptura de las bacterias y por lo tanto, la obtención de sus proteínas. Finalmente, el lisado fue centrifugado durante 20 minutos a 13.000 x g, obteniéndose un sobrenadante que contiene la proteína de interés.

2.2 Purificación de la proteína recombinante

La purificación se realizó utilizando la técnica de cromatografía de afinidad en columnas de níquel que permiten la retención de proteínas y péptidos con cola de histidina, como es el caso de GnRX G/Q. De esta forma, 4 mL de resina Ni-NTA fueron equilibradas con 10 volúmenes de tampón de unión (20Mm NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 20-40mM Imidazol, pH 7,4), se cargó con el sobrenadante obtenido en el punto anterior, conteniendo las proteínas recombinantes de interés, y se lavó posteriormente con 10 mL de tampón de unión. La elusión de las proteínas retenidas en la columna se realizó con tampón de elusión (20Mm NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 500mM Imidazol, pH 7,4).

2.3 Identificación de GnRX G/Q purificada por electroforesis

Alícuotas de la solución con la proteína recombinante purificada, fueron separadas mediante electroforesis monodimensional en geles de acrilamida al 12,5% en sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE, acrilamida:bisacrilamida 30:0,8% p/v 1,0 M Tris-Cl pH 8,8, 20% SDS, 10% APS, TEMED). Los geles fueron fijados y teñidos con una solución acuosa de metanol al 50% v/v, ácido acético al 10% v/v y azul de Coomassie al 1% p/v, a temperatura ambiente por 12 horas. Luego se destiñeron en una mezcla de ácido acético 5% v/v y metanol 25%.

2.4 Preparación de vacuna a inocular

El preparado final contuvo 250 µg del péptido recombinante GnRX G/Q y 1 ml de adyuvante acuoso. Fue sometido a vórtex por 45 segundos, quedando completo para su inoculación. Para la inoculación del día 425, se realizó nuevamente el procedimiento de inducción, purificación e identificación. Este preparado contuvo 500 µg del péptido recombinante GnRX G/Q y 1 ml de adyuvante.

3. Inmunización y toma de muestras

Se inmunizaron los animales con dosis única, el día 1 y el día 21, con 250 µg del péptido en 1 ml de adyuvante. Al día 425 (correspondiente al día 1 del segundo año) se inoculó con dosis única de 500 µg en 1 ml de adyuvante. La vacunación se hizo vía subcutánea, previa desinfección de la zona.

El día 1, previo a la inoculación, se procedió a extraer una muestra de sangre de 1 ml desde la vena cefálica. Ésta se almacenó individualmente en un tubo Falcon, sin anticoagulante, identificada con el nombre de cada animal y la fecha, para su posterior análisis. Luego se continuó tomando muestras de sangre los días 21, 60, 100, 140, 160 y 180 post-vacunación. Durante el segundo año de estudio, se tomaron muestras sanguíneas los días 1 (425), 30 (455) y 60 (485).

4. Procesamiento y evaluación de las muestras

Las muestras de sangre obtenidas, fueron refrigeradas a 4°C por 2 horas. Se centrifugaron a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Luego cada muestra de suero se traspasó a un tubo Eppendorf de 2 ml y se conservaron a -80°C para su posterior análisis.

4.1 Determinación de las variaciones en los títulos de anticuerpos IgG mediante ELISA contra el péptido recombinante GnRX G/Q:

Para la determinación de la respuesta anticuerpo-antígeno específicos y detección de los niveles de inmunoglobulinas contra el péptido recombinante en suero, se realizaron ensayos de ELISA indirectos (del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) bajo el siguiente protocolo:

- Placas de 96 pocillos de alta capacidad de unión (MaxiSorp, Nunc) fueron cubiertas con 50 µl por pocillo de solución de la proteína GnRX G/Q diluida en solución tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 150mM, NaHCO₃ 350mM, pH 9,6) a una concentración de 40 µg/ml y fueron dejadas toda la noche a 4°C.
- Luego los pocillos fueron lavados 5 veces con 180 µl de tampón de lavado (PBS, 0,05% Tritón) y para detener la reacción de adherencia, se usó 200 µl por pocillo del tampón de bloqueo (Soya al 1%). Fue dejado durante toda la noche a 4°C.

- Las placas fueron lavadas 5 veces con tampón de lavado. Luego se le aplicó 100 µl por pocillo y en duplicado, de los sueros a evaluar, como anticuerpo primario. Los sueros fueron preparados a una concentración de 1/500 en diluyente Soya al 0,1%, y dejados incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
- Se lavaron nuevamente las placas 5 veces con tampón de lavado y se incorporaron 100 µl del anticuerpo secundario de conejo anti-IgG canino conjugado con inmunoperoxidasa (Jackson Immunoresearch, Laboratories) a una dilución de 1/10.000 en diluyente Soya al 0,1%. Se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente.
- Luego se lavaron 5 veces más y se les agregó 100 µl del cromóforo TMB (1-Step™, Slow TMB-ELISA, Pierce, Chemical Company), que contiene el sustrato peróxido de hidrógeno que actúa con la enzima peroxidasa, que por oxidación provoca que los pocillos que poseen el anticuerpo buscado, cambien de color según su concentración. Se dejó por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente la reacción se detuvo con 100 µl de tampón de detención (50% agua destilada, 50% ácido sulfúrico 2 mol/L) y se leyó la reacción en un lector ELISA a una absorbancia (densidad óptica) de 450 nm.

Los resultados permitieron graficar los cambios que ocurren en los títulos de anticuerpos, correlacionándolos con los cambios colorimétricos que ocurren en la placa de ELISA.

4.2 Determinación de las variaciones en los títulos de anticuerpos IgG mediante

ELISA contra la proteína endógena GnRH-I:

Se midió la respuesta de anticuerpo-antígeno específicos para detectar los niveles de inmunoglobulinas contra la hormona endógena en los sueros. Estos también fueron medidos mediante ensayos de ELISA indirectos. Se pegaron 20 µl por pocillo de solución de GnRH (LHRH Olbricht Company) diluida en solución tampón de recubrimiento, a una concentración de 50 µg/ml. Luego, se siguió el mismo protocolo descrito para el péptido recombinante.

4.3 Determinación de las variaciones en las concentraciones de testosterona sérica mediante ELISA

Para la evaluación de la concentración de testosterona sérica en los animales control e inmunizados, se realizó un inmunoensayo enzimático competitivo (testosterona EIA Kit Cayman Chemical Co.):

- Se generó una solución estándar a una concentración de 5 ng/ml. Se obtuvo diluyendo 100 µl de la solución Testosterona EIA Standard, en 900 µl de agua ultrapura. Luego en 8 tubos ependorff se incorporó 900 µl de tampón EIA en el tubo 1 y 500 µl en los tubos 2 al 8. Al tubo 1 se le agregó 100 µl de la solución de testosterona estándar y se mezcló. De esta solución se sacaron 500 µl para agregarla al tubo 2, de este tubo 500 µl se agregan al tubo 3, y se repite el proceso en los tubos restantes. Las concentraciones logradas en los tubos estándar del 1 al 8 fueron: 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 pg/ml respectivamente.
- En las placas de 96 pocillos pre-cubiertas con un anticuerpo de ratón monoclonal, anti IgG de conejo, pre-bloqueadas, se le incorporaron 50 µl por pocillo de las 8 soluciones estándares de testosterona, en duplicado. Las muestras de suero a analizar, diluidas previamente en 1/50 con la solución tampón EIA, se agregaron en un volumen de 50 µl de cada muestra por pocillo, en duplicado. A todos los pocillos se le añadieron 50 µl de Acetylcolinesterasa unida a testosterona y 50 µl del antisuero de conejo para testosterona. Se dejó incubar en tampón EIA (Cayman Chemical Company) por 2 horas a temperatura ambiente, en agitación orbital, esto para permitir la competencia entre la testosterona libre en el suero y la unida a la acetilcolinesterasa.
- Se lavó la placa 5 veces con tampón de lavado, se añadieron 200 µl a cada pocillo, del reactivo de Ellman, y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente en agitación orbital.
- Las placas fueron leídas en un lector de ELISA a 405 nm.

Con las densidades ópticas de las muestras estándares de testosterona se construyó una curva calibradora. Esta curva patrón sirve de referencia para el cálculo de las concentraciones hormonales de las muestras. Un programa computacional calcula las concentraciones de las muestras problema, tomando como referencia las curvas patrón.

Con los datos obtenidos se realizaron gráficos para visualizar los cambios que ocurren en las concentraciones de testosterona en el tiempo, provocados por esta vacuna.

5. Evaluaciones conductuales

5.1 Encuesta

Se construyó una encuesta en conjunto con una especialista en etología clínica de animales pequeños. Esta fue aplicada a las personas encargadas de los perros del estudio. Se les entregó mensualmente, para que ellos registraran las observaciones realizadas durante sus turnos de trabajo, de lunes a viernes. Se les consultó sobre la agresividad hacia otros perros o hacia personas, enfrentamientos y posibles peleas. Esta información fue registrada en una planilla elaborada previamente.

5.2 Tabla de comportamiento

Se realizó una tabla de datos para registrar las observaciones realizadas a los individuos del estudio. Se observó durante 30 minutos a cada individuo, día por medio, desde el día 1 al 140 y desde el día 425 al 485 en el segundo año. Se determinó la presencia o ausencia de conductas afiliativas, agresivas, tiempo dedicado a actividades de reposo, entre otros.

5.3 Marcaje de orina

Se llevó a cada uno de los individuos por separado, a un sector desconocido para ellos, correspondientes a 500 metros de línea recta en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y se registraron todas las micciones realizadas en los días 1, 21, 60 y 100 del primer año y, en los días 425, 455 y 485 del segundo año de estudio.

5.4 Enfrentamiento con orina de hembra en celo

Se le presentó a cada uno de los individuos por separado, una gasa embebida en orina de hembra en celo y otra embebida en orina de hembra en diestro, en los días 1, 21, 60 y 100 del primer año y, en los días 425, 455, 485 del segundo año del estudio. La respuesta de los machos fue registrada a través de una cámara filmadora para su posterior análisis.

6. Análisis histológico testicular

El día 485 del estudio, los animales fueron sometidos a una castración quirúrgica bilateral. Ambos testículos fueron extraídos, pesados y fijados en solución de formalina tamponada (10% v/v).

Para realizar el análisis anátomo-histopatológico, los testículos y epidídimos se fijaron, se hicieron cortes de 5 μm de grosor, los que fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Se observaron bajo microscopio óptico Nikon, modelo Eclipse E400 y se fotografiaron con la videocámara incluida en el microscopio.

RESULTADOS

Identificación del péptido GnRX G/Q recombinante purificado por electroforesis

A partir del análisis electroforético realizado, fue posible visualizar una banda de aproximadamente 30kDa, que corresponde a la proteína recombinante His GnRX G/Q, como se observa en la figura número 1:

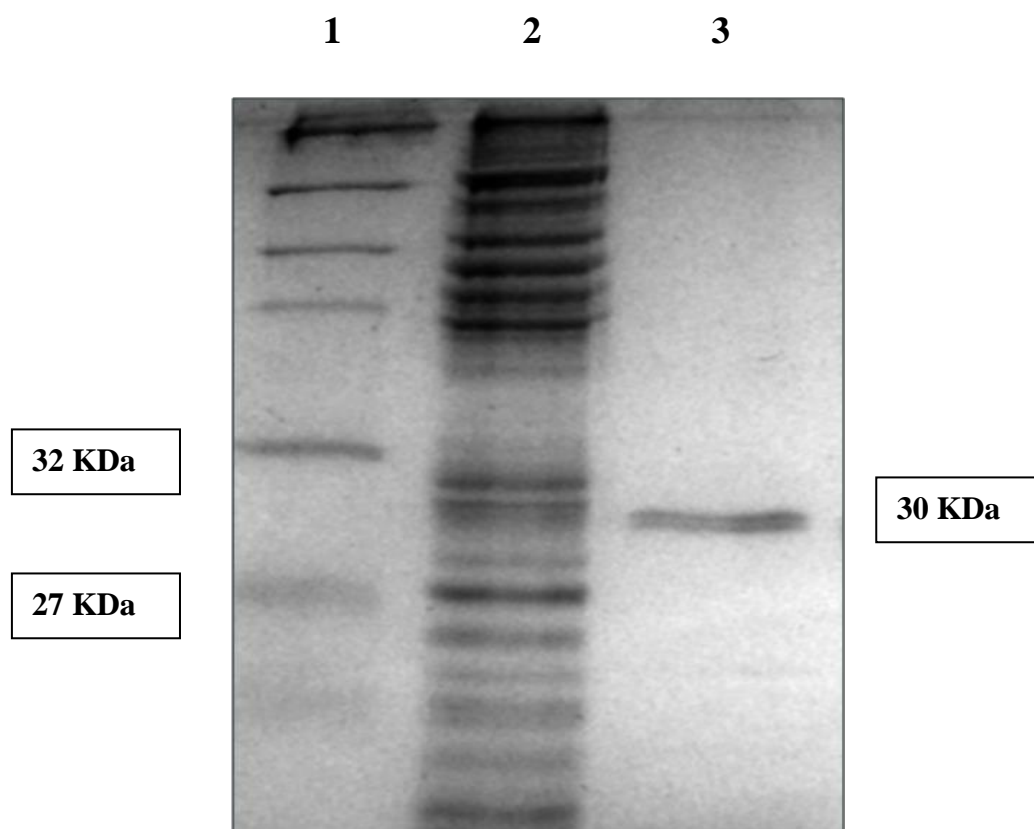


Figura 1. Identificación del péptido recombinante. *Electroforesis SDS-PAGE al 12,5% que muestra la expresión de la proteína recombinante His-GnRX G/Q. Línea 1: marcador de peso molecular, Línea 2: extracto total proteico de lisis bacteriana, Línea 3: proteína recombinante GnRX G/Q purificada mediante cromatografía de afinidad.*

Determinación de los niveles de IgG anti-GnRX G/Q desde el suero de los animales inmunizados

La inmunización con la proteína recombinante GnRX G/Q indujo un alza importante en la producción de inmunoglobulinas IgG a partir del día 60, observándose diferencias estadísticamente significativas con el grupo control (no inmunizados) ($p \leq 0,01$). Al día 455, la densidad óptica en el grupo de animales inmunizados fue 5 veces mayor que el grupo control y se encontraron diferencias significativas ($p = 0,0027$). En el gráfico 1, se observan los niveles de IgG total para animales inmunizados con la proteína GnRX G/Q ($n=7$).

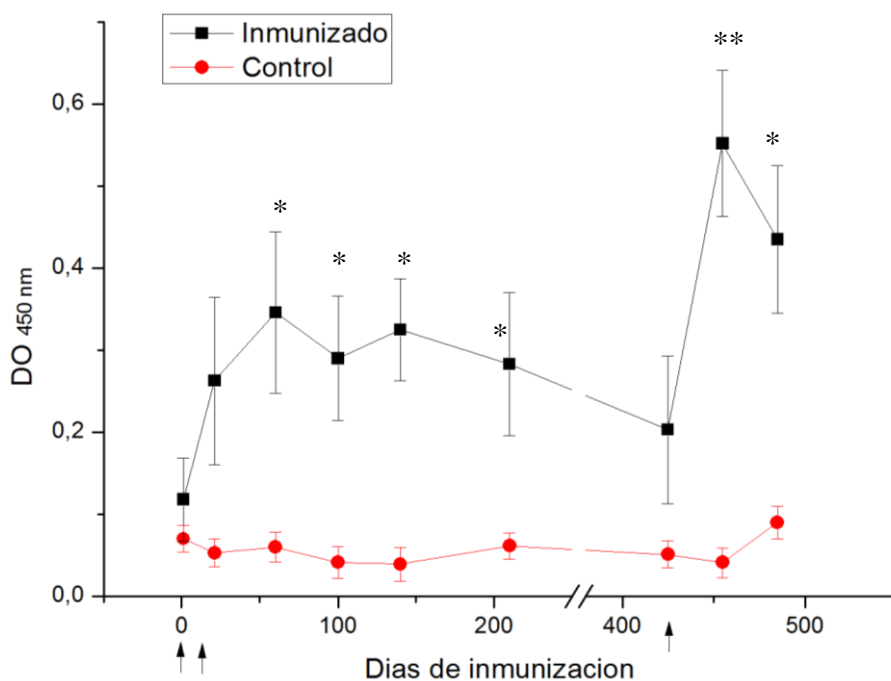


Gráfico 1: Respuesta de IgG contra la proteína GnRX G/Q. Los individuos fueron inmunizados los días 1, 21 y 425 del estudio, con la proteína recombinante GnRX G/Q (■ grupo experimental) (● sin inmunización en el grupo control). Los niveles de inmunoglobulinas fueron analizados mediante ELISA indirecto. Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$, $n = 7$.

Determinación de los niveles de IgG anti-GnRH desde el suero de los animales inmunizados

La inmunización con la proteína recombinante GnRX G/Q fue capaz de inducir un alza en la producción de inmunoglobulinas IgG anti-GnRH a partir del día 21, observándose diferencias estadísticamente significativas a partir del día 60 respecto al grupo control ($p \leq 0,05$). Al día 455 los animales inmunizados presentaron densidades ópticas aproximadamente 5.8 veces mayores que el grupo control, siendo estadísticamente significativo ($p = 0,002$). Los niveles de IgG totales en los animales inmunizados con la proteína recombinante GnRX G/Q ($n=7$) se muestran en el gráfico número 2.

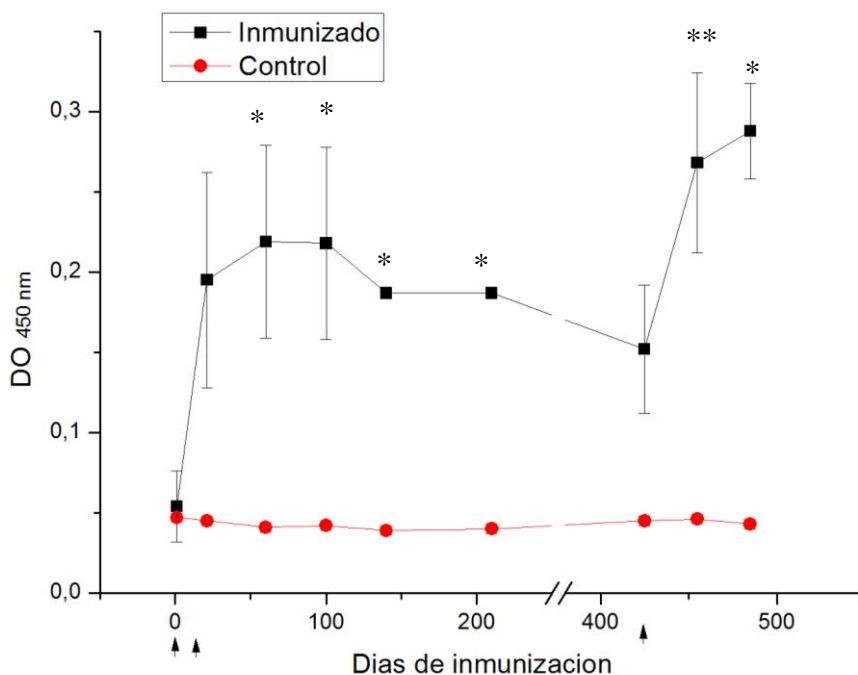


Gráfico 2: Respuesta de inmunoglobulinas IgG anti-hormona GnRH. Los individuos fueron inmunizados en los días 1, 21 y 425 del estudio con la proteína recombinante GnRX G/Q (■ grupo experimental) (● sin inmunización en el grupo control). Los niveles de inmunoglobulinas fueron analizados mediante un ELISA indirecto. Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0,05$ (**) $p \leq 0,01$, $n = 7$.

Medición de la concentración sérica de testosterona

Se obtuvieron las concentraciones séricas de testosterona de los individuos inmunizados y de los animales control. Existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de testosterona en los días 60 (n=7) y 455, correspondiente al día 30 del segundo año (n=4), entre los animales inmunizados con el péptido recombinante GnRX G/Q y los animales enteros, mientras que los valores en relación a los animales castrados no presentaban diferencias significativas.

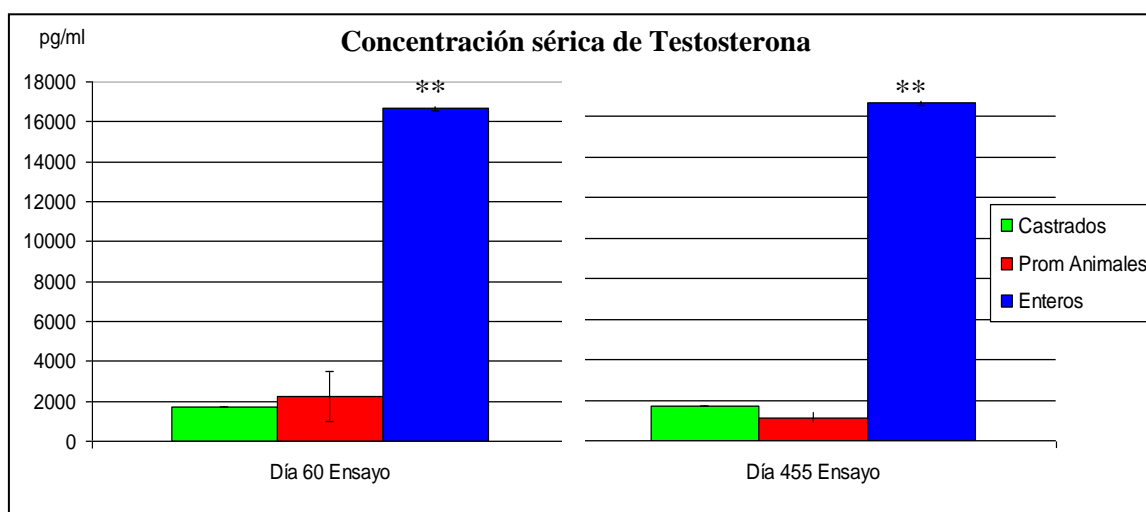
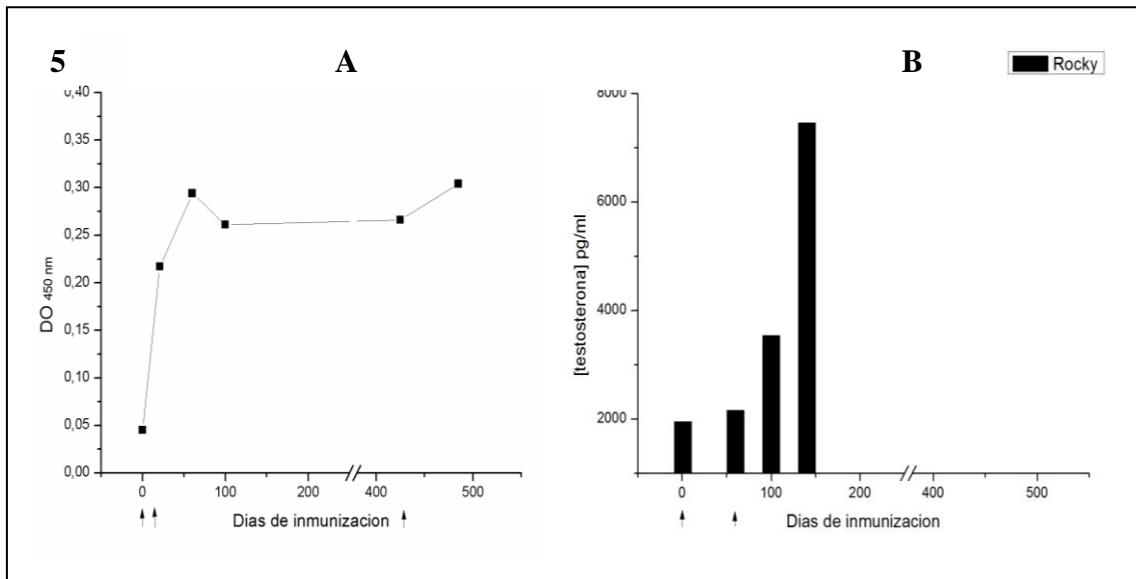
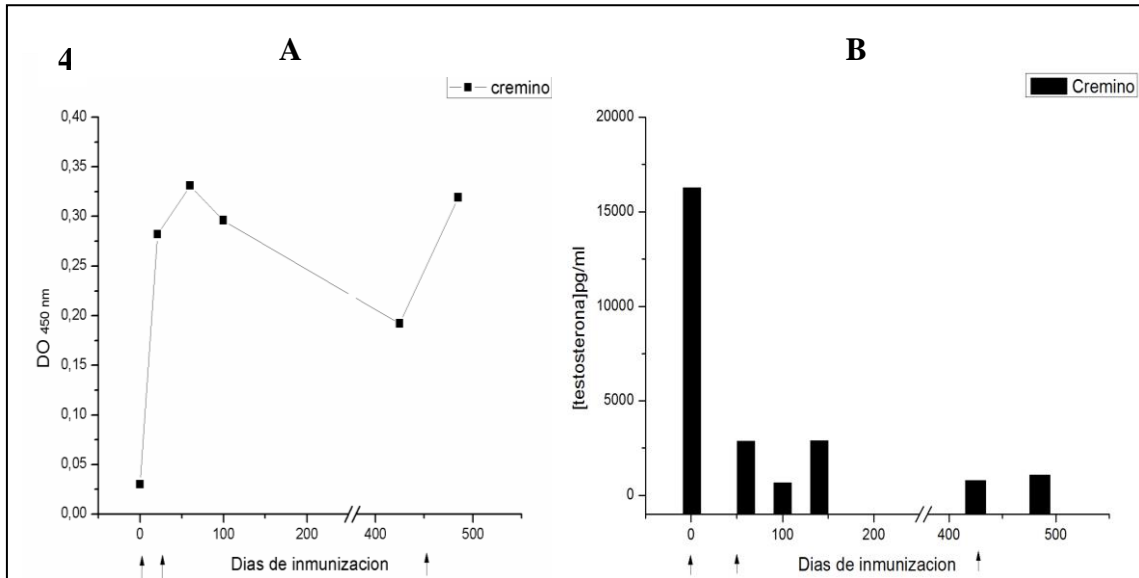


Gráfico 3: Medición de la concentración sérica de testosterona. *Concentración sérica de testosterona en el grupo de animales inmunizados con la proteína recombinante GnRX G/Q y en animales control, castrados quirúrgicamente y enteros, al día 60 (gráfico de la izquierda) y 455 (gráfico de la derecha) del estudio. Las concentraciones hormonales se analizaron mediante un ELISA indirecto. Los datos están expresados en pg/ml. Los asteriscos indican diferencias significativas (**) $p \leq 0,01$.*

Niveles de IgG y concentración sérica de testosterona de diferentes individuos

En los gráficos 4 al 7 se observan las respuestas de 4 individuos inmunizados, en los niveles de IgG anti GnRH (A) producto de la vacunación con la proteína recombinante GnRX G/Q y sus efectos en la concentración sérica de testosterona (B). (n=4).



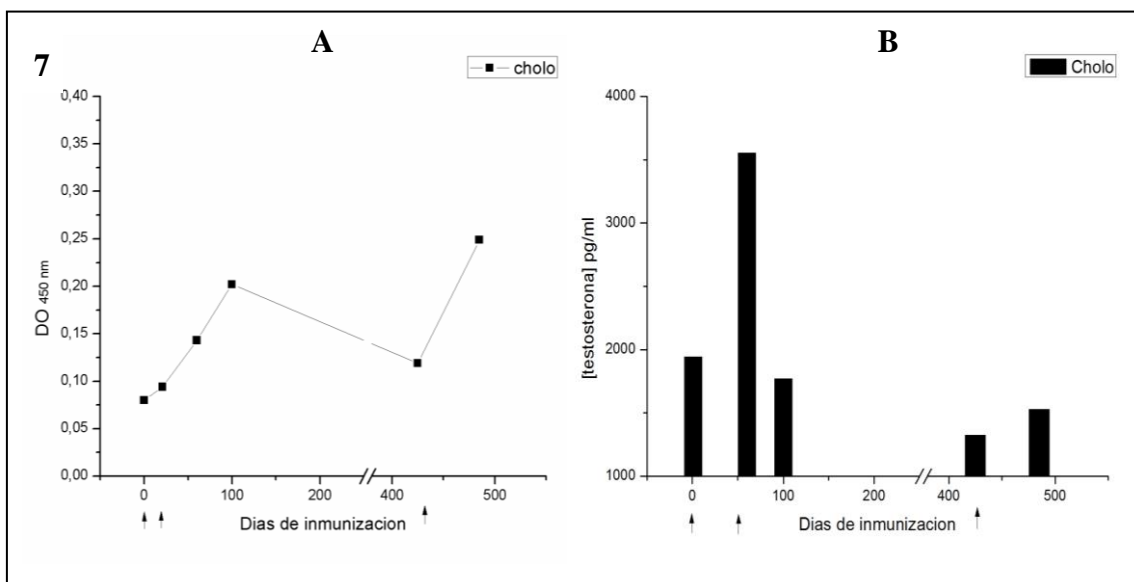
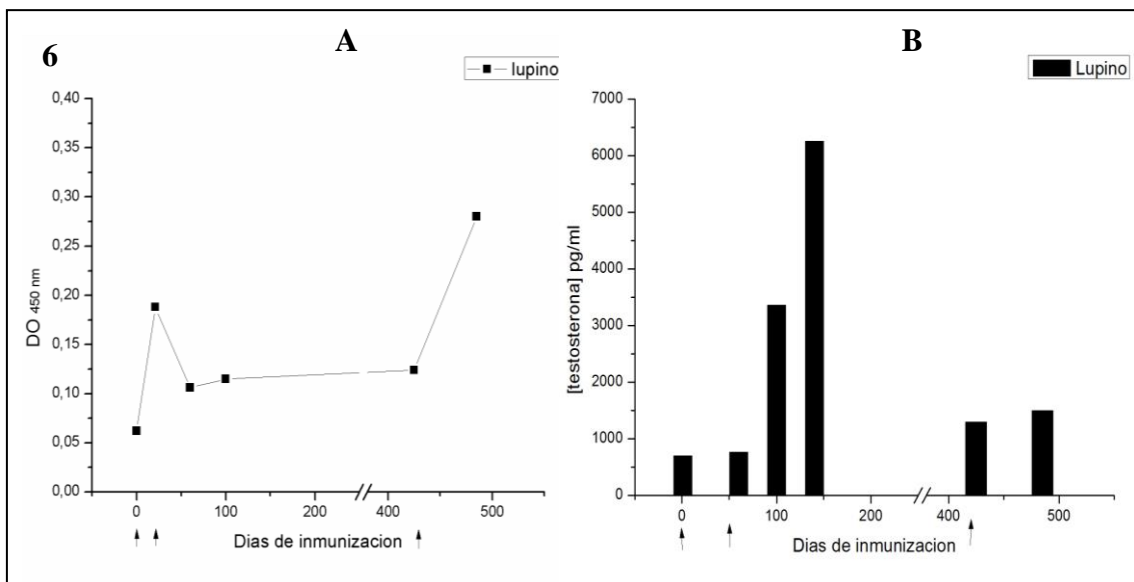


Gráfico 4-7: Niveles de IgG y concentración sérica de testosterona. Se observan los valores de inmunoglobulinas anti GnRH y la concentración de testosterona sérica en diferentes animales inmunizados contra el péptido recombinante GnRX G/Q (valores individuales, n= 4). Los valores de densidad óptica están expresados como promedio y los valores de concentración de testosterona están expresados en pg/ml.

Evaluación conductual

Agresividad

Para evaluar los efectos de la inmunización en el tiempo sobre la conducta agresiva, se generó un índice de agresividad a partir de los datos obtenidos por la encuesta realizada a los cuidadores y por las observaciones tomadas en campo, registradas en la tabla de comportamiento. Se realizó una graduación basada en la intensidad y frecuencia de presentación de las conductas agresivas, siendo el 1, un individuo no agresivo, y el 5, un individuo muy agresivo, que pelea más de una vez por semana. La descripción y caracterización se presenta en el siguiente cuadro:

Graduación:			Grado
pelea + 1 vez por semana	=	Muy agresivo	5
Pelea máx. 1 vez por semana, gruñe, persigue o ladra constantemente	=	Agresivo	4
Pelea máx. 1 vez/mes gruñe o ladra a perros externos	=	Mediana agresividad	3
Gruñe o ladra a veces	=	Poco agresivo	2
No responde a estímulos	=	No agresivo	1

Usando este índice, fue posible observar las diferencias individuales entre los animales inmunizados. Sólo 2 individuos presentaban conductas agresivas y una alta graduación antes de comenzar el estudio. En ellos se visualizaron cambios en la conducta a través del tiempo. El resto de los individuos no presentó cambios que pudiesen relacionarse con la inmunización. En el gráfico número 9, se observa la variabilidad individual entre los perros inmunizados (n=5).

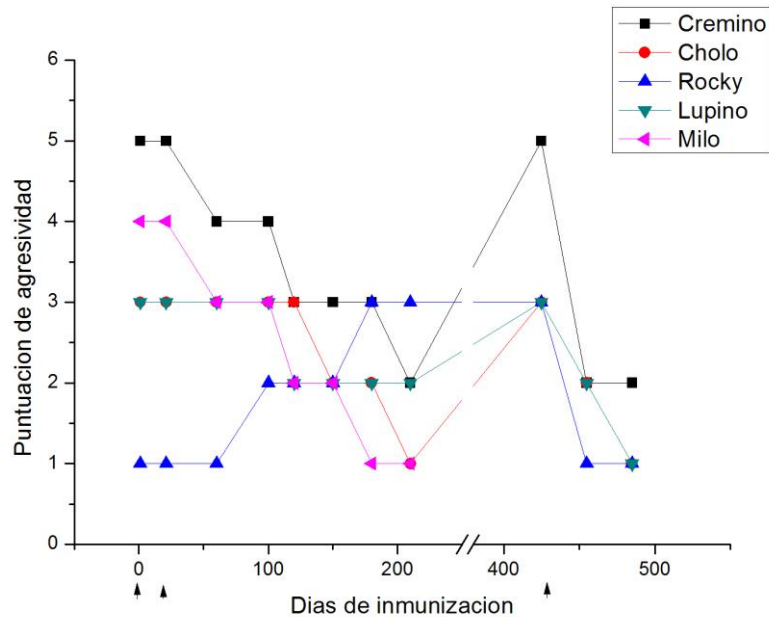
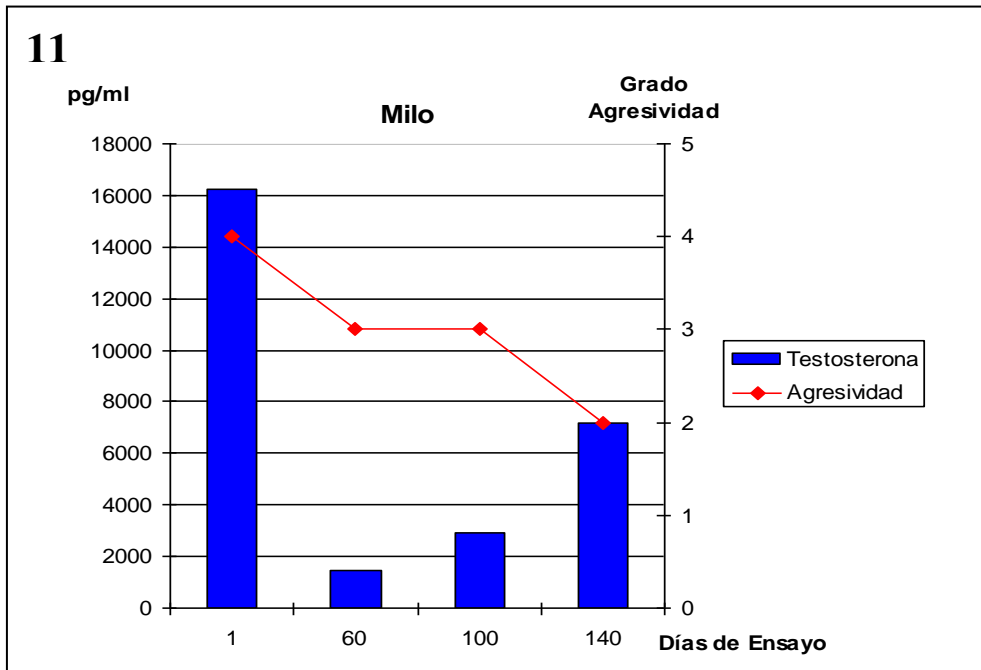
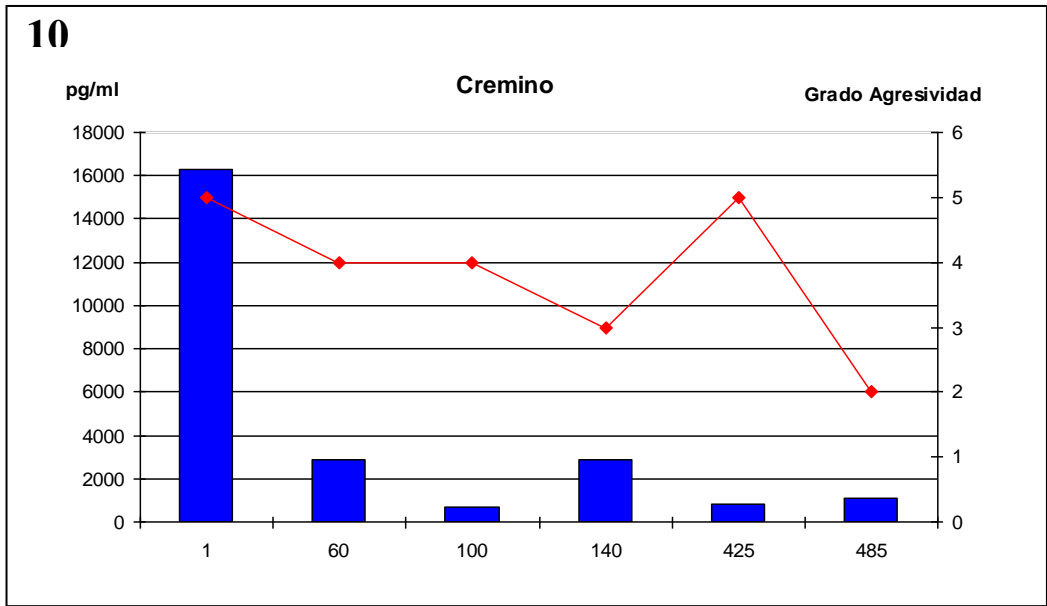


Gráfico n° 9: Evaluación del nivel de agresividad. *Índice de Agresividad en los animales inmunizados contra el péptido recombinante GnRX G/Q en el tiempo. Las flechas indican los días de vacunación. n =5.*

Con los datos obtenidos a través de los ensayos de ELISA y de los registros conductuales de agresividad, se graficaron las concentraciones séricas de testosterona y la graduación según el índice de agresividad generado, para los dos individuos que presentaban cambios tanto en la concentración de la hormona sexual, como en respuesta conductual. Se observa una curva descendente de agresividad que comienza luego de la segunda inmunización y que vuelve a presentar rasgos de animales enteros al comienzo del segundo año.



Gráficos 10 y 11: Niveles séricos de testosterona y agresividad. *Gráfico que visualiza la relación entre los niveles hormonales y el grado de agresividad en el tiempo, en los dos individuos inmunizados contra el péptido recombinante GnRX G/Q, que presentaron respuesta desde el comienzo del ensayo.*

Marcaje de orina

Durante la evaluación de marcaje territorial, no se observaron diferencias significativas en el número de micciones realizadas por los diferentes individuos, tanto antes como después de las inmunizaciones con el péptido recombinante GnRX G/Q. Fue posible observar gran variabilidad individual en la respuesta, desde el inicio del ensayo y lo largo del estudio. Cabe mencionar, que los dos individuos que mostraron respuesta frente a las evaluaciones conductuales, presentaron el mayor número de micciones en relación al resto del grupo.

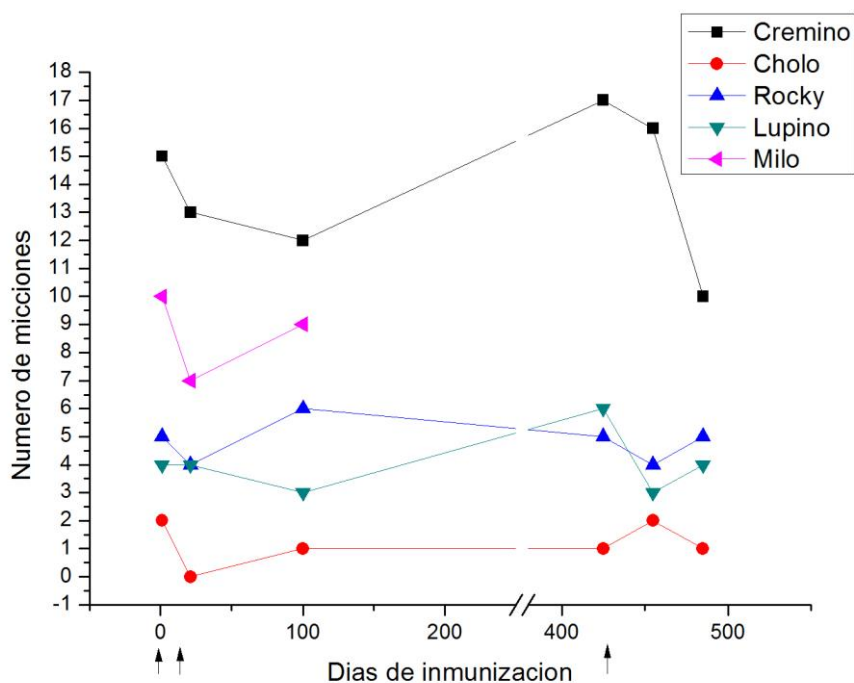


Gráfico 12: Medición del marcaje territorial. Registro del número de micciones realizadas por los animales inmunizados contra el péptido recombinante GnRX G/Q a lo largo del estudio. Las flechas indican los días de inmunización.

Líbido: Enfrentamiento a orina de hembra en celo

Las observaciones se registraron a partir de las filmaciones realizadas al enfrentar al perro inmunizado a la gasa con orina de hembra en estro. Se realizó una graduación conductual en la cual se le asignó una puntuación de 0 a 5, siendo 0 la ausencia total de respuesta y 5 a la presencia de todas las conductas esperadas de un perro macho adulto entero (olfateo, intranquilidad, lamido, micciones y erección).

Fue posible visualizar las diferencias individuales, con animales que presentaron gran interés al comienzo del primer y segundo año de estudio, mientras que otros no mostraron interés, semejándose a la respuesta de los perros castrados durante todo el periodo. En los animales inmunizados que sí presentaron cambios en el tiempo, hubo una disminución del interés que se corresponde con las fechas de vacunación.

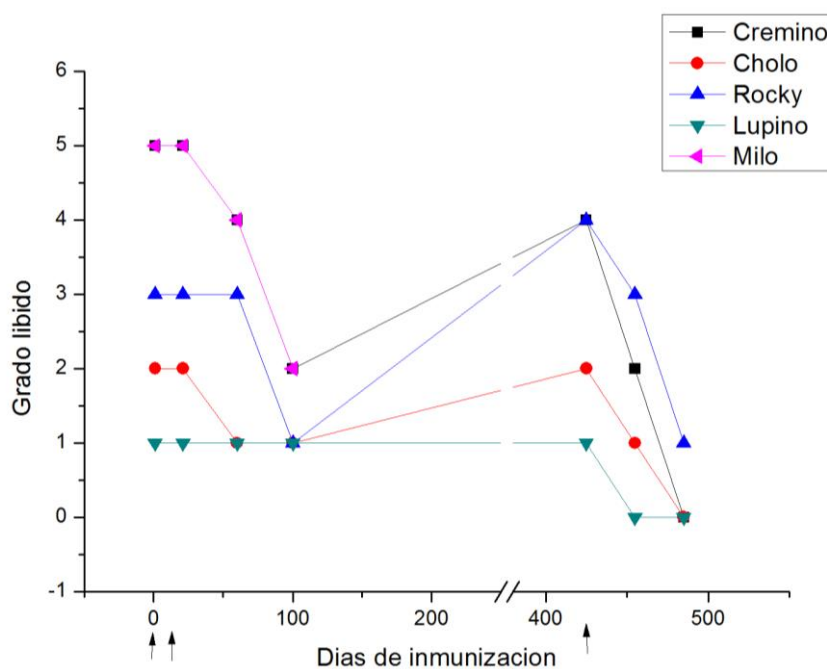


Gráfico n° 13: Estimación de Líbido. Graduación de la libido y presentación de conductas sexuales de los diferentes individuos inmunizados con la proteína recombinante GnRX G/Q en el tiempo ($n = 5$). Las flechas indican los días de inmunización.

Estudio histológico

En algunos perros inmunizados fue posible encontrar el epitelio seminífero vacuolado y desorganizado, lumen amplio y estrellado, con restos celulares en el interior. Además de escasas espermatogonias y espermatozoides, como se puede observar en las figuras 2, 3 y 4. Los cortes de epidídimo del grupo de caninos inmunizados, presentaron una menor cantidad de espermatozoides como se observa en la figura 5.

Las figuras 6 y 7 corresponden a cortes histológicos de testículo y epidídimo respectivamente, de caninos no inmunizados (control). Éstos presentan una adecuada organización y tamaño de líneas celulares, presencia de espermatogonias y un alto número de espermatozoides en el lumen del epidídimo.

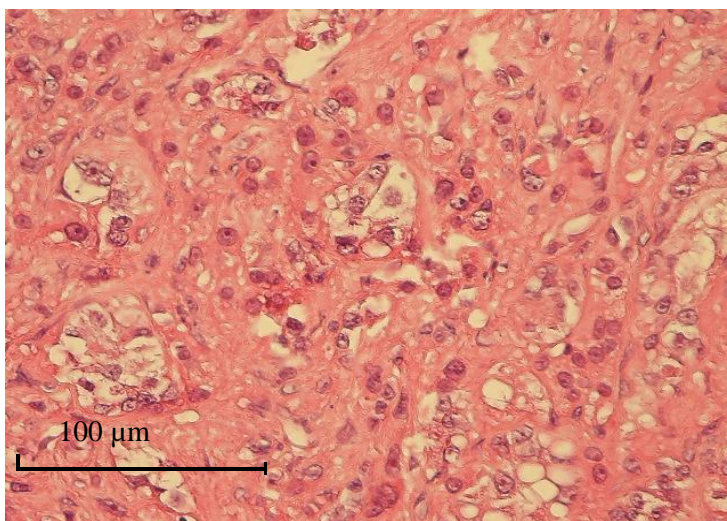
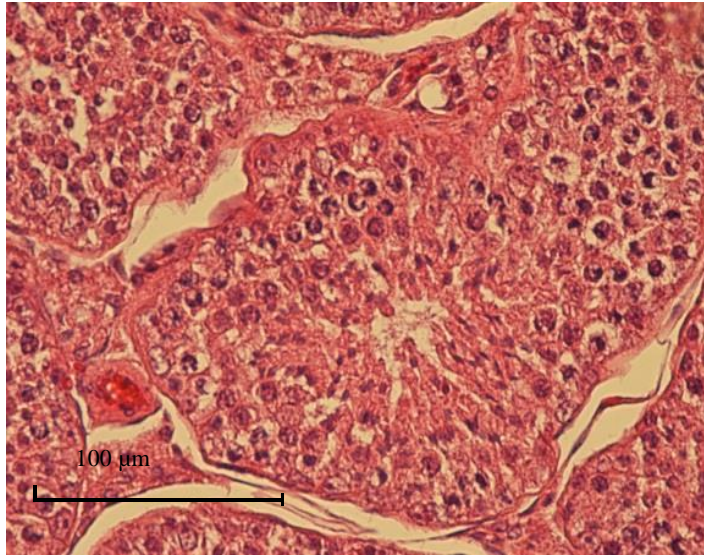
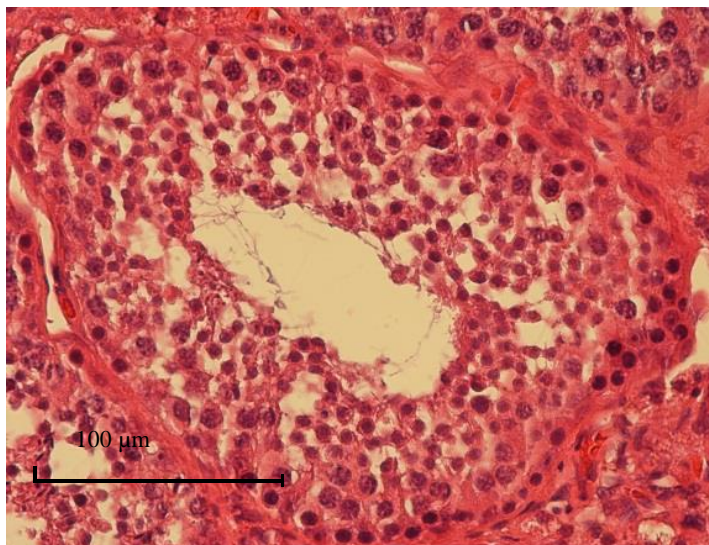


Figura 2. Corte de testículo de perro inmunizado. Se observa el epitelio vacuolado y desorganizado. Tinción H/E. 40X.



*Figura 3. Corte de testículo de perro inmunizado.
Se observa lumen amplio y restos celulares.
Tinción H/E. 40X.*



*Figura 4. Corte de testículo de perro inmunizado.
Se observan escasas capas celulares y presencia de
espermatozoides y espermatogonias
Tinción H/E. 40X.*

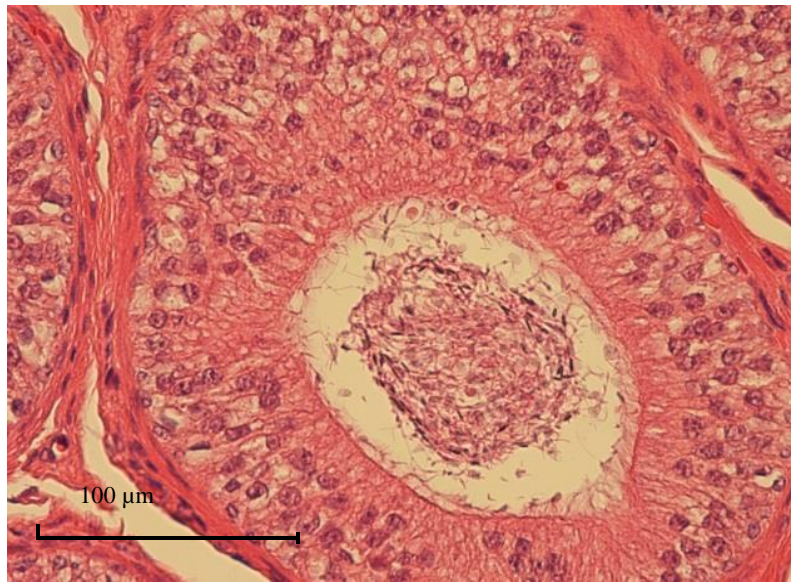


Figura 5. Corte de epidídimo de perro inmunizado. Se observa una escasa cantidad de espermatozoides y gran cantidad de residuos celulares. Tinción H/E. 40X.

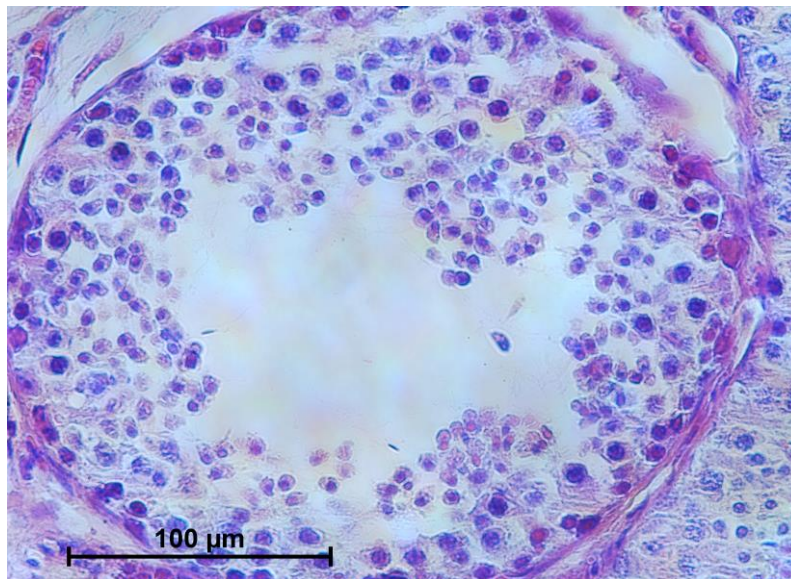
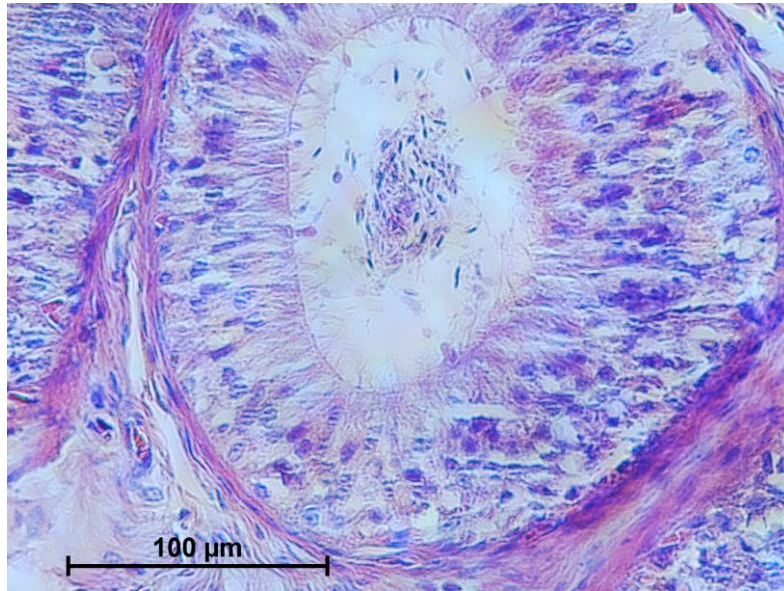


Figura 6. Corte de testículo de perro control. Se observan varias capas celulares, organizadas y con gran cantidad de espermatogonias. También es posible observar espermatozoides en el lumen. Tinción H/E. 40X.



*Figura 7. Corte de epidídimo de perro control.
Se observa gran cantidad de espermatozoides
Tinción H/E. 40X.*

DISCUSIÓN

En la investigación realizada a lo largo de esta memoria de título se evaluaron los efectos en el alza de inmunoglobulinas, cambios hormonales, testiculares y respuestas conductuales en un grupo de caninos inmunizados con una vacuna anti GnRH.

La proteína recombinante GnRX G/Q fue capaz de inducir una respuesta inmune contra la hormona endógena GnRH, lo que queda en evidencia con las alzas de títulos anti GnRH. En la investigación realizada por Basulto *et al.* (2003), donde se inmunizaron perros Beagle con un péptido sintético (GnRHm1-TT), se sostiene que al inmunizar con dicho péptido, se produce una seroconversión de anticuerpos anti GnRH desde la tercera semana de estudio. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo obtenido por Basulto, ya que se encontró al día 60 del estudio una importante presencia de inmunoglobulinas anti GnRH en los animales inmunizados con el péptido recombinante GnRXG/Q.

Una de las desventajas observadas en la inmunocastración es la alta variabilidad individual. Zeng *et al.* (2002), observaron en cerdos que un 25% de los animales inmunizados presentaban una débil respuesta a la inmunización, llamados *non-responders*, con bajos niveles de inmunoglobulinas y niveles séricos de testosterona, hormona luteinizante (LH) y tamaños testiculares similares a los animales control. En este estudio pudimos observar tal variabilidad en las concentraciones séricas de testosterona y en las conductas asociadas a ella como el marcaje urinario, el nivel de agresividad y la demostración de conducta sexual frente a la orina de hembras en celo. En un estudio realizado por Walker *et al.* (2007) se observaron respuestas similares al inocular un péptido recombinante GnRH acoplada con antígeno del virus Distemper (CDV) en perros de diferentes razas.

En relación a la variabilidad individual, como Magiafoglou *et al.* (2003) lo indican, falta evidencia para confirmar una relación directa entre los niveles de anticuerpos generados y la capacidad real de fertilidad de los individuos. En este ensayo se logró visualizar efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, sin embargo no fue posible corroborar la capacidad de fertilización de los individuos inmunizados.

Otra desventaja a considerar en el uso de la inmunocastración, principalmente para el control poblacional, radica en que generalmente se requieren múltiples vacunaciones para mantener el nivel suficiente de anticuerpos que bloqueen efectivamente al eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Einarsson (2006) describe efectos logrados en cerdos luego de dos vacunaciones con cuatro semanas de separación entre cada una. En este ensayo se obtuvieron resultados similares, con un alza luego de la segunda vacunación a la tercera semana y una respuesta aún más rápida e intensa en la tercera vacunación, realizada el día 425 del estudio.

La fluctuación de la concentración de testosterona en el suero de los perros adultos intactos se describe en un rango entre 0,4 y 6,0 ng/ml en un período de 24 hrs. (DePalatis, Moore y Falvo, 1978). En este trabajo, la concentración de testosterona sérica llegó a valores considerados esterilizantes, pero con una alta variabilidad entre los individuos del estudio. Es incierto el efecto de la vacunación en la esteroidogénesis en aquellos individuos en los cuales desde el día 1 presentaban concentraciones bajas de testosterona. Sin embargo, en al menos dos de ellos, el cambio en el tiempo fue evidente disminuyendo a niveles considerados esterilizantes al día 100 del ensayo. Así, en las mediciones de hormonas reproductivas, los resultados del ELISA revelaron marcadas fluctuaciones en la concentración de la testosterona sérica en los perros inmunizados.

El método seleccionado para la detección hormonal, el inmunoensayo enzimático competitivo (testosterona EIA Kit Cayman Chemical Co.) tiene rangos de confianza cercanos al 90% con variabilidad intra e inter ensayos dadas por las curvas estándar. Se sugiere para próximos estudios, utilizar una metodología diferente, con alternativas de mayor sensibilidad, especificidad e incluso de menor costo. Adicionalmente, una de las desventajas descritas del uso del EIA radica en la interferencia de la actividad enzimática producida por componentes del suero (Nakamura, Kasahara y Rechnitz, 1992). Por lo que se debería complementar los resultados de mediciones de inmunoglobulinas y conductuales con un método apropiado para la determinación de la concentración sérica de testosterona, para una mejor visualización de los efectos esterilizantes.

La vacunación exitosa contra una molécula endógena requiere un nivel suficiente de anticuerpos neutralizantes durante todo el período de tratamiento para obtener el efecto deseado. La inmunoneutralización de la GnRH afecta los niveles de testosterona al reducir los niveles de LH. Si esta neutralización es incompleta, no se logran reducir los niveles de LH y por lo tanto, no se inhibirá completamente la producción y secreción de testosterona por las células de Leydig (Hannesdóttir *et al.*, 2004).

Sin embargo, Clarke *et al.* (1998), observaron que era posible mantener efectos anticonceptivos pese a la ausencia de anticuerpos circulantes, pero esto sólo era posible en individuos inmunizados prepúberes y muy jóvenes, posiblemente por un bajo o nulo desarrollo de sus características y capacidades reproductivas luego de la pubertad. En su estudio, además visualizaron un alto grado de variabilidad individual, con individuos inmunizados que sí volvían a presentar características reproductivas y con diferentes tiempos a los cuales éstas se presentaban (2 a 4 años). En este estudio fue posible visualizar cambios en algunos de los individuos, sin embargo, al ser todos adultos, no se observaron cambios permanentes en el tiempo. Queda como desafío para próximos ensayos analizar cambios en las respuestas tanto en intensidad y duración, según el momento en el cual los animales son inmunizados.

Como describen Miller, Rhyan y Killian (2003), trabajando con vacunas anticonceptivas anti-GnRH (GonaConTM), han visto mejores resultados en hembras que en machos tanto en cerdos como en ciervos. Es probable que esto esté asociado a los patrones de secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, cíclica en las hembras y continua en los machos. Es probable que la frecuencia de vacunación necesaria en el caso de las hembras sea cada 6 meses para inhibir los ciclos estrales. Sin embargo, la demanda constante del macho, produciría una mayor demanda de anticuerpos anti-GnRH para mantener sus efectos en el tiempo, por lo que deberían revisarse estas posibles diferencias en caninos, para poder estandarizar dosificaciones adecuadas para cada sexo.

Las observaciones conductuales revelaron cambios en las conductas sexuales, principalmente en la respuesta a las hembras en celo y en la agresividad, en individuos que previo al estudio era posible distinguir la presencia de estos comportamientos. Los animales

que presentaron estos cambios conductuales, fueron los que inicialmente presentaron altas concentraciones séricas de testosterona y en los que a medida que el ensayo transcurría, la curva de inmunoglobulinas aumentaba y su concentración de testosterona y comportamientos decrecía. La alta variabilidad en las respuestas podría explicarse además por el sistema de vida similar al callejero, donde el vagabundeo es una actividad frecuente (De Miguel, 2005) y donde el marcaje de orina puede haber estado sesgado, al menos en parte, al asumir que era un terreno desconocido para ellos.

Basulto *et al.* (2003) observaron en sus perros inmunizados, cambios en la estructura testicular, describiendo un aumento del tejido intersticial al estar disminuidos los diámetros de los túbulos seminíferos a causa de procesos degenerativos, que avanzaron desde el centro hacia la periferia de los túbulos, presentándose de forma incipiente y en algunos casos, de forma generalizada donde no es posible encontrar espermátidas ni espermatozoides. Ferro *et al.* (2004) por otra parte, evaluaron cambios testiculares en diferentes especies inmunizadas con un péptido recombinante de características similares a la nuestra, y observaron que el ratón generaba mayor porcentaje de lesiones y alteraciones en testículo comparado con el perro.

En el 2009, Sáenz *et al.* encontraron que, ratas macho inmunizados con el péptido recombinante GnRX G/Q fueron capaces de disminuir los procesos de esteroidogénesis y espermatogénesis, al probar los efectos inmunogénicos de diferentes adyuvantes. Dicho resultado coincide con lo obtenido en este estudio, donde se encontró una menor actividad testicular en relación a los animales control.

El péptido GnRX G/Q en la dosis y esquema empleados indujo cambios estructurales y funcionales en los testículos, epidídimos y en algunos aspectos del comportamiento sexual, debido probablemente a la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti GnRH endógena. Los resultados obtenidos permiten sugerir la posibilidad de ensayar otros esquemas y dosificaciones, aplicación de adyuvantes para lograr una inhibición efectiva, una visualización y sistematización adecuada de los datos sobre la capacidad reproductiva tanto en perros machos, como en hembras y en otras especies de mamíferos.

CONCLUSIONES

- En todos los animales inmunizados con la proteína recombinante GnRX G/Q hubo un aumento en la producción de IgG anti GnRX G/Q.
- Existe inmunogenicidad cruzada entre la hormona nativa GnRH y la proteína recombinante GnRX G/Q en perros.
- En perros adultos, machos, mestizos inmunizados es posible observar una gran variabilidad individual en las respuestas de esteroidogénesis y conductuales.
- La inmunización con la proteína recombinante GnRX G/Q es capaz de disminuir la actividad en el tejido testicular y epididimario.

BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, P. 1997. Demografía canina y felina en el Gran Santiago. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 81h.

ADASME M. 2004. Agresividad canina y las acciones del médico veterinario en su prevención. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 77h.

BASULTO R., MILANES C., ROJAS A., FUENTES F., IZQUIERDO N., BERTOT J., HERNANDEZ H., SANCHEZ D., CALZADA L., JUNCO J. 2003. Efectos de la inmunización contra GnRh sobre la estructura y función testicular en perros adultos. Biotecnología Aplicada. (20): 20-24

BOWEN R. 2008. Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. Animal Reproduction Science. (105): 139-143.

BUSTAMANTE S. 2008. Demografía en las poblaciones de perros y gatos de la comuna de Santiago. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 77 h.

BUTCHER R. 2000. La implementación de programas de control de animales vagos, los efectos de las diferencias económicas y culturales. MEVEPA (14):40-46.

CHRISTIANSEN I. 1989. Reproducción en el perro y en el gato. Inter-Vet. Inglaterra. 345p.

CLARKE L., BROWN B., TRAN V., SCOTT C., FRY R., MILLAR R., RAO A. 1998. Neonatal Immunization against Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Results in Diminished GnRH Secretion in Adulthood. Endocrinology 139(4): 2007-2014.

CUI S. 2003. Sexual development and the effects of active immunization against GnRH in Chinese Tanyang ram lams. Animal Reproduction Science. (77): 129-139.

DEPALATIS L., MOORE J., FALVO RE. 1978. Plasma concentrations of testosterona and LH in the male dog. Journal of Reprod & Fertility. (52): 201-207.

DE MIGUEL J. 2005. Cómo interpretar el lenguaje de los perros. Ateles, Madrid. 110p.

DELVES P. 2004. Review: How far from a hormone-based contraceptive vacicne?. Journal of reproductive Immunology. (62): 69-78.

ECHEVERRÍA M. 2004. Estimación de la población de perros vagabundos y de vecindario en la ciudad de Santiago, Región Metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 85h.

EINARSSON S. 2006. Vaccination against GnRH: pros and cons. Acta veterinaria Escandinávica (48) 1-10.

ESPÍNOLA F. 2004. Estimación de la población canina callejera y supervisada en las calles de la ciudad de Santiago, Región Metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 53 h.

FERRO V., KHAN M., McADAM D., COLSTON A., AUGHEY E., MULLEN A., WATERSTON M., HARVEY M. 2004. Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) – a histological comparison in male animals. Veterinary Immunology and immunopathology. (101) 73-86.

FRANK D. 2007. Interdog aggression: when to intervene?. In: WSAVA World Congress. Sydney. 19 - 23 Agosto.

GUPTA S., SRIVASTAVA N., CHOULDBURY S., RATH A., SIVAPURAPU N., GAHLAY G., BATRA D. 2004. Update on zona pellucida glycoproteins based contraceptive vaccine. Journal of Reproductive Immunology. (62): 79-89.

HANNESDÓTTIR S., HAN X., LUND T., SINGH M., VAN DER ZEE R., ROITT I., DELVES P. 2004. Changes in the reproductive system of male mice immunized with a GnRH-analogue conjugated to mycobacterial hsp70. Reproduction. (128): 365-371.

HERBERT C.A., TRIGG T.E. 2005. Application of GnRH in the control and management of fertility in female animals. Animal Reproduction Science. (88): 141-153.

HOFFMANN B., ENGEL E. 2004. Downregulation, an effective alternative method to surgical castration in the male dog; indications and results. In: WSAVA/ FECAVA/ HVMS World Congress. Rhodes. 6 - 9 Octubre..

KUTZLER M., WOOD A. 2006. Non-surgical methods of contraception and sterilization. Theriogenology. (66): 514-525.

MAGIAFOGLOU A., SCHIFFER M., HOFFMANN A., MCKECHNIE S. 2003. Immunocontraception for population control: Will resistance evolve?. Immunology and Cell Biology (81): 152–159.

MALDONADO C. 2007. Descripción de algunos aspectos básicos de inmunización. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. 3 (5): 1-12.

MILLER L, RHYAN J., KILLIAN G. 2003. Evaluation of GnRH contraceptive vaccine using domestic swine as a model for feral hogs. In: Proceedings of the 10 th Wildlife Damage Management Conference. Nebraska. 120-127.

MILLER L., RHYAN J., KILLIAN G. 2004. GonaCon, a Versatile GnRH Contraceptive for a Large Variety of Pest Animal Problems. In: 22nd Vertebrate Pest Conference. Lincoln. 269-273.

NAKAMURA Y., KASAHARA R., RECHNITZ GA. 1992. Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990s. American Society for Microbiology. Washington DC. 411 p.

NAZ K., GUPTA S., GUPTA J., VYAS H., TALWAR G. 2005. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. Human Reproduction. 20 (12): 3271-3283.

OVERALL K. 1997. Clinical Behavioral Medicine for Small Animals. Mosby. Inglaterra. 542 p.

REYES M. 1997. Métodos anticonceptivos en caninos. TecnoVet. 3 (1). (en línea). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Consultado 7 agosto 2010. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507.html>.

ROBBINS S., JELINSKI M., STOTISH R. 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): 107-119.

ROJAS A. 2005. Demografía en las poblaciones de perros y gatos en la comuna de Lo Prado. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 77h.

ROOT M. 2005. Reproductive behavior en small animals. Theriogenology. (64): 734-746.

SÁENZ L., NEIRA-CARRILLO A., PAREDES R., CORTÉS M., BUCAREY S., ARIAS L. 2009. Chitosan formulations improve the immunogenicity of a GnRH-I peptide-based vaccine. International Journal of Pharmaceutics. (369): 64-71.

SRIVASTAVA N., SANTHANAM R., SHEELA P., MUKUND S., THAKRAL S., MALIK B., GUPTA S. 2002. Evaluation of the immunocontraceptive potential of Escherichia coli-expressed recombinant dog ZP2 and ZP3 in a homologous animal model. Reproduction. (123): 847-857.

TALWAR G. 1999. Vaccines and passive immunological approaches for the control of fertility and hormone-dependent cancers. Immunological Reviews. (171): 173-192.

TARLATZIS B., KOLIBIANAKIS E. 2007. GnRH agonist vs antagonists. Clinical Obstetrics and Gynaecology. 21(1): 57-65.

TURKSTRA J., MELOEN R. 2006. Active immunisation against gonadotroping releasing hormone, an effective tool to block the fertility axis in mammals. (en línea).

Memoria Tesis Doctoral. Utrecht University. Holanda. Consultado 20 julio 2010. Disponible en <http://www.vetscite.org/publish/articles/000062/print.html>.

TURNER A., KIRKPAYTICK J. 2002. Effects of immunocontraception on population, longevity and body condition in wild mares (*Equus caballus*). Reproduction Supplement. (60). 187-195.

WALKER J., GOSH S., PAGNON J., COLANTONI C., NEWBOLD A., ZENG W., JACKSON D. 2007. Totally synthetic peptide-based immunocontraceptive vaccines show activity in dogs of different breeds. Vaccine. (25): 7111-7119.

WANDELER A. I., BUDDE A., CAPT S., KAPPELER A, MATTER H. 1988. Dog ecology and dog rabies control. Reviews of Infectuous Diseases. 10 (4): 684-688.

ZENG X., TURKSTRA J., TSIGOS A., MELOEN R., LIU X., CHEN F., SCHAAPER W., OONK H., GUO D., VAN DEN WIEL D. 2002. Effects of active immunization against GnRH on serum LH, inhibin A, sexual development and growth rate in Chinese female pigs. Theriogenology. 58(7): 1315-1326.