

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



TITULO:

Evaluación de la eficacia del péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, como método contraceptivo en *Canis lupus familiaris* machos en el cantón Primavera, municipio de Santa Ana, departamento de Santa Ana, El Salvador.

POR:

BR. AYALA DÍAZ WILLIAN JONATAN

BR. CHAHÌN COLOCHO CARLOS EMILIO

BR. JOVEL CASTANEDA EVER EZEQUIEL

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, AGOSTO DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



TITULO:

Evaluación de la eficacia del péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, como método contraceptivo en *Canis lupus familiaris* machos en el cantón Primavera, municipio de Santa Ana, departamento de Santa Ana, El Salvador.

POR:

BR. AYALA DÍAZ WILLIAN JONATAN

BR. CHAHÌN COLOCHO CARLOS EMILIO

BR. JOVEL CASTANEDA EVER EZEQUIEL

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, AGOSTO DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA



TITULO:

Evaluación de la eficacia del péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, como método contraceptivo en *Canis lupus familiaris* machos en el cantón Primavera, municipio de Santa Ana, departamento de Santa Ana, El Salvador.

POR:

BR. AYALA DÌAZ WILLIAN JONATAN

BR. CHAHÌN COLOCHO CARLOS EMILIO

BR. JOVEL CASTANEDA EVER EZEQUIEL

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, AGOSTO DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL:

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

ING AGR. MSC. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO:

ING. AGR. MSC. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

F: _____
MVZ. MARÌA JOSÈ VARGAS ARTIGA

DOCENTES DIRECTORES:

F: _____
MVZ. ROSY FRANCIS ALVARENGA

F: _____
MVZ. ÓSCAR LUIS MELÉNDEZ CALDERÓN

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN:

F: _____
MVZ. ÓSCAR LUIS MELÉNDEZ CALDERÓN

RESUMEN.

El uso de la hormona liberadora de gonadotropina a través de sus análogos en la inmunocastración reversible de mamíferos brinda grandes posibilidades de éxito en el control de la fertilidad en animales domésticos. En este trabajo se evaluó el efecto biológico, como inmunógeno, de un preparado vacunal péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, sobre estructura y función en los órganos reproductores de perros mestizos. La investigación se desarrolló de Enero de 2014 al mes de Julio de 2014. Se emplearon 20 perros en edades reproductivas y un peso entre 15-35 Kg. La muestra se distribuyó de forma aleatoria en cinco tratamientos de cuatro animales cada uno. El primer tratamiento se dejó como control y el tratamiento dos y cuatro se emplearon dosis de uno y dos mililitros respectivamente en una aplicación, los tratamientos tres y cinco recibieron dosis de uno y dos mililitros con refuerzo a las cuatro semanas respectivamente; aplicadas vía subcutánea en todos los tratamientos. Se realizaron cinco mediciones testiculares y dos mediciones de testosterona pre y post vacunación. El péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico produjo cambios significativos en la estructura y función testicular, evidenciando los mejores efectos en la disminución testicular y sus niveles séricos de testosterona en el tratamiento cinco, debido probablemente a la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-GnRH sobre la GnRH endógena, de igual forma teniendo efecto en la conducta sexual.

DEDICATORIA.

A Dios todo poderoso por darme la vida, sabiduría y fortaleza, por guiarme y poner las personas indicadas en el momento justo en el desarrollo de este trabajo de investigación permitiendo que todo saliera satisfactoriamente.

A mi madre Ana María Díaz, por ser madre y padre a la vez, por ser la formadora de una persona de bien y ser mi apoyo en mi carrera universitaria

A mis hermanas Ana Vilma Guardado y Jessica Ayala, por animarme en lograr mis propósitos a alcanzar.

A mi novia Carolina Araya, por su apoyo incondicional animándome a seguir adelante.

A mis compañeros de tesis Ezequiel Jovel y Emilio Chahín, por brindarme su amistad, compartir conocimientos y permitir el éxito en este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS.

A nuestros asesores: MVZ. Francis Alvarenga y MVZ. Oscar Luis Meléndez, quiero expresar mis más sinceros agradecimientos por su guía, dedicación, amistad y comprensión en la realización satisfactoria de este trabajo de graduación.

A CENSALUD UES (Centro de Investigación y Desarrollo en Salud), Al director Dr. Saúl Díaz, Lic. Stanley y técnicos de laboratorio en colaborar en la realización de la fase de laboratorio

A los propietarios de cada uno de los perros, que confiaron en nuestra investigación, gracias por su apoyo para la ejecución de la fase de campo.

FARLAB S.A de C.V, Al ing. Figueroa por la importación del kit TES-ELISA y colaboración en calibración de equipo lector por medio del Ing. Biomédico Cristian Rogel.

A la alcaldía de Nuevo Cuscatlán, A Nayib Bukele por contribuir en la donación de la vacuna utilizada en la investigación.

AYALA DÍAZ WILLIAN JONATAN

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.

A mi Padre Celestial, mi eterno Rey y el salvador de mi vida Jesucristo, que ha sido fiel, no pudiera haber llegado a este punto si su mano no me hubiera sostenido, cuando estuve a punto de tirar la toalla me lleno de coraje y valentía para seguir adelante en un paso de fe, ahora culminando mi carrera veo atrás y sé que no he caminado, sino que he volado en tus manos, a ti sea la gloria y honra mi Señor por los siglos de los siglos; investigaciones como esta vendrán y se irán pero tus palabras, tus promesas y tu amor están gravadas en mi corazón.

A mis padres, porque a pesar de que ya no estén conmigo es una forma de honrar su memoria y llevar a lo alto el legado que dejaron en mis venas, la gente siempre sabrá que herencia grande estará conmigo, los amo papas.

A mi hermano Gabriel por creer en mí y alentarme y recordarme el propósito grande que ha tenido nuestro Dios al sacarnos delante de donde mucho pensaron que no saldríamos, a ser ese motor por el cual luchar, a ser ese amigo que necesite en los momentos más difícil, y también estar en los momentos más felices, te amo hermano y recordá siempre que, lazo de tres dobleces no se rompe fácil; vos, Dios y yo contra el mundo.

A mi Tía Tita y mi novia Karina por ser esas mujeres especiales y espirituales en mi vida, que me apoyan de rodillas e interceden a mi Padre de los cielos para que guie mi camino como hombre justo y recto a sus pies.

A mi tía Aracely por brindarme un hogar cuando más lo necesite para seguir adelante.

A mi hermano y amigo Josué Pineda porque además de compartir mis locuras, esta investigación nació como fruto de la culminación de un proyecto juntos, por el apoyo incondicional, por reír y llorar a la par mía como el amigo descrito en proverbios 17:17 que es el amigo como un hermano en tiempo de angustia, te quiero amigo.

A mis compañeros y amigos en esta tesis Jonatan Ayala y Ezequiel Jovel, por embarcarnos en una investigación que parecía imposible de realizar, pero que siendo tenaces logramos alcanzar.

A mi asesores de tesis MVZ. Rosy Francis y MVZ. Oscar Luis Meléndez por creer en nuestra investigación y apoyarnos y guiarnos en la realización de esta.

Al Ing. Figueroa propietario y director de Laboratorios Farlab y al Ing. Cristian Rogel por su valiosa colaboración en la calibración y tiraje de las pruebas de Inmunoensayo.

A todo el personal de CENSALUD de la Universidad de El Salvador, a Margarita, Zoila, Lic. Stanley y Carlitos por el apoyo indispensable para la culminación de esta investigación.

A todos y cada uno de los docentes que tuve en mis años de universidad por tolerar mi deseo de aprender, fueron pacientes y muy atentos al responder cada una de mis inquietudes.

A la Alcaldía de Nuevo Cuscatlán, al Alcalde Nayib Bukele que confió en este tema de investigación y nos donó una parte para continuar con la investigación.

A la Alma Mater, mi Universidad querida, que sin apoyo de sus programas de becas y la gente tan linda que atendió mi caso, no pudiera estar en estos momentos redactando mis agradecimientos a todos los demás sin este valioso apoyo, se me proporcionó oportunidades para formarme íntegramente como un profesional que espera servir a la sociedad salvadoreña.

CARLOS EMILIO CHAHÍN COLOCHO

DEDICATORIA.

A mi Dios todo poderoso quien me ha dado el conocimiento, la fuerza y la fe para desarrollar esta investigación que con tanto esfuerzo he realizado, la gloria sea para Él. *Aunque ande en valle de sombra de muerte, no temeré mal alguno, porque tú estarás conmigo... Salmo 23:4.*

A mi madre Gertrudiz Victoriana Castaneda, porque renunció a sus sueños por los de sus hijos, mi lucha no tiene comparación con sus desvelos y angustias de sus venas, esta investigación pertenece a ella, yo solo soy un simple portador.

A mi familia por darme el apoyo de seguir adelante en el camino que elegí.

A Jenny Bonilla por estar contigo en los momentos que su presencia era un alivio a mi mente y corazón.

A mis compañeros de tesis Willian Jonatan y Emilio Chahín, porque logramos vencer la negatividad de las personas al terminar nuestra tesis, la batalla recién empieza amigos. Venceremos.

A los mártires del 30 de Julio de 1975 de nuestra Universidad de El Salvador, porque su sacrificio por las ideas utópicas viven en cada una de nuestras mentes.

AGRADECIMIENTOS.

A nuestros asesores MVZ. Rosy Francis Alvarenga y MVZ. Oscar Luis Meléndez, por confiar en nosotros y orientarnos cada día a ser profesionales diferentes, gracias por su apoyo.

A los propietarios de cada uno de los perros, que confiaron en nuestra investigación, gracias por su apoyo para la ejecución de la fase de campo.

A la Alcaldía de Nuevo Cuscatlán, señor alcalde Nayib Bukele por contribuir en la donación de la vacuna, su apoyo fue indispensable.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD-UES) Al director Dr. Saúl Díaz, Lic. Stanley, Margarita y Zoila por colaborar en la realización de la fase de laboratorio.

Al Ing. Figueroa propietario de FARLAB S.A de C.V, la importación del kit TES-ELISA y colaboración en calibración de equipo lector por medio del Ing. Biomédico Cristian Rogel.

JOVEL CASTANEDA, EVER EZEQUIEL

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁG.
RESUMEN	iv
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Situación de la población canina en el mundo y en El Salvador	3
2.1.1 Impacto de población canina en el mundo	3
2.1.2 Clasificación de perros vagabundos	5
2.1.3 Enfermedades zoonóticas transmitidas por perros	7
2.1.4 Situación de la población canina en El Salvador	9
2.2 Fisiología de la reproducción en el perro	11
2.2.1 El eje hipotálamo-hipofisario	11
2.2.2 Espermatogénesis	14
2.2.3 Hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH)	14
2.2.5 Función de GnRH	15
2.3 Respuestas inmunológicas	15
2.4 Métodos de control de fertilidad en caninos	16
2.4.1 Métodos quirúrgicos	17
2.4.2 Métodos no quirúrgicos	18
2.5 Biotecnologías	21
2.5.1 Vacunas recombinantes	21
2.5.1.1 inmunocastración	21
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	28

5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos específicos	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 Ubicación del experimento en el espacio y en el tiempo	29
6.2 Descripción de las unidades en estudio	29
6.3 Metodologías utilizadas	30
6.3.1 Metodología de campo	31
6.3.1.1 Toma de muestra de sangre con separador de coagulo	31
6.3.1.2 Determinación del tamaño testicular	33
6.3.1.3 Aplicación del péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria	34
6.3.2 Metodología de laboratorio	38
6.3.2.1 Procedimiento de extracción de suero	38
6.3.2.2 Determinación de niveles de testosterona en suero por medio de KIT de Testosterona ELISA	41
6.4 Metodología utilizada para la toma de datos	48
6.5 Metodología estadística	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIONES	69
9. RECOMENDACIONES	70
10. BIBLIOGRAFÍA	71
11. ANEXOS	79

ÍNDICE DE CUADROS.

No	Contenido	Pág.
1	Población canina estimada en El Salvador (perro /habitante)	9
2	Número de personas agredidas por animal transmisor de rabia, años 2008 a 2013, El Salvador.	10
3	Valores de testosterona en caninos	13
4	Resumen de medias de largos testículos derechos	50
5	Resumen de medias de largos testículos izquierdos	51
6	Resumen de medias de anchos testículos derechos	53
7	Resumen de medias de anchos testículos izquierdos	54
8	Contrastes de largos testiculares derechos	56
9	Contrastes de largos testiculares izquierdos	57
10	Contrastes de anchos testiculares derechos	58
11	Contrastes de anchos testiculares izquierdos	59
12	Medias de testosterona en perros	61
13	Contrastes de niveles de testosterona	63
14	Coefficiente de correlación de Pearson	64
15	Patrones etológicos	66

ÍNDICE DE FIGURAS.

No	Contenido	Pág.
1	Fisiología de la reproducción en canino macho.	12
2	Clasificación de métodos en el control de poblaciones de caninos machos.	17
3	Distribución en grupos de las unidades en estudio.	30
4	Medidas de Asepsia	32
5	Toma de muestra sanguínea	33
6	Determinación del tamaño testicular	34
7	Aplicación de la vacuna	36
8	Distribución de los tratamientos en estudio	38
9	Extracción de suero	40
10	Equipo y Materiales de ELISA	43
11	Procedimientos de ELISA	44
12	Procedimientos de ELISA	44
13	Procedimientos de ELISA	45
14	Procedimientos de ELISA	45
15	Procedimientos de ELISA	46
16	Procedimientos de ELISA	47
17	Procedimientos de ELISA	47
18	Medias de largos derechos testiculares	50
19	Medias de largos izquierdos testiculares	51

20	Medias de anchos derechos testiculares	52
21	Medias de anchos izquierdos testiculares	54
22	Contrastes de largos derechos testiculares	55
23	Contrastes de largos izquierdos testiculares	56
24	Contrastes de anchos derechos testiculares	57
25	Contrastes de anchos izquierdos testiculares	58
26	Medias de Testosterona	60
27	Contrastes de niveles de Testosterona	62
28	Patrones Etológicos	65
29	Reacciones post-vacunales de 24 a 72 primera vacunación	66
30	Reacciones post-vacunales de 24 a 72 segunda vacunación	67
31	Comportamientos del peso corporal	68

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo	Contenido	Pág.
A1	Casos de rabia confirmados en humanos y animales, años 2008 a 2013, El Salvador	79
A2	Hojas de control	80
A3	Cuadro resumen de tamaños testiculares	84
A4	Resultado de niveles de testosterona sérica por medio de ELISA	85
A5	Pruebas estadísticas de tamaño testicular en perros prueba Tukey, por el programa SAS	86
A6	Análisis de varianza y prueba de contrastes ortogonales, por el programa SAS	87
A7	Análisis de varianza y prueba de contrastes ortogonales, por el programa SAS.	88
A8	Inserto de vacuna Innosure [®]	89

1. INTRODUCCIÓN.

Los caninos desde tiempo remotos han estado junto al hombre, que los adquirió con fines de caza, rastreo y hoy en día de compañía; sin embargo esta realidad no se aplica a todos los casos, la tenencia irresponsable de una mascota ha propiciado el incremento de canes sin dueños, obligados a deambular por las calles sin un control y cuidado necesarios que garanticen su salud y las de las personas. En El Salvador esta situación no es extraña, actualmente según la unidad de salud ambiental, área de zoonosis del Ministerio de Salud (MINSAL, 2013b) el país cuenta aproximadamente con 1, 156,961 caninos a nivel nacional; cifra alarmante si tomamos en cuenta el territorio salvadoreño. El impacto de la creciente población canina, tiene su importancia en ser el principal transmisor de la enfermedad de la rabia a las personas, contándose con 70 casos confirmados de rabia en caninos, entre el 2008 al 2013 (MINSAL, 2013a). Aunque existen programas de vacunación antirrábica, para prevenir esta enfermedad (Orellana, 2013), los altos índices poblacionales de perros dificultan el sostenimiento de estos programas, debido a la subestimación de la población real de canes y su crecimiento exponencial, cuya vacunación no es posible, incrementando el riesgo de transmisión de enfermedades (Serrano *et al*, 2010).

Las agresiones que sufren las personas por canes domésticos, forman parte de la problemática, solo para el 2013, se contabilizan 12,407 casos de agresiones de perros a personas, generando un impacto psicológico, social, y económico. (MINSAL, 2013a).

La generación de nuevas y novedosas alternativas para el control de las poblaciones caninas, son las que actualmente podrían aportar mejores resultados a la problemática; ejemplo de ello es la inmunocastración, que es una biotecnología que bloquea la secreción de hormonas sexuales en mamíferos, por medio de anticuerpos neutralizante a las gonadotropinas; el objetivo principal a través del uso del péptido sintético, conjugado de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), con toxoide

diftérico en caninos machos, es evaluar la eficacia como método contraceptivo para el control reproductivo de esta especie.

Esta vacuna, propone de forma prospectiva facilitar el control de la reproducción y modificar el comportamiento de los caninos machos, haciéndolos menos agresivos. El efecto de la vacuna esperado en el organismo, específicamente en la fisiología de la reproducción, es la supresión inmunológica temporal de GnRH y la disminución de los niveles plasmáticos de testosterona; siendo ésta la que ejerce un efecto de rebote negativo sobre la hipófisis anterior o sobre el hipotálamo. Controlando de esta manera los procesos reproductivos, así como el comportamiento asociado a la monta, agresión y de marcación de territorio mediante micción (Intervet, 1999:130).

La importancia de una castración inmunológica, como se conoce esta biotecnología, supone tener mejores resultados en el control de sobrepoblaciones caninas, en comparación a una esterilización quirúrgica; por lo tanto tener un mayor beneficio en el control de la población de perros vagabundos (Innpulso, 2011). Sáenz dice que su aplicación podría alcanzar una reducción significativa de la población de los canes callejeros al cabo de tres años (Innpulso, 2011).

La escasa o nula búsqueda de nuevas alternativas para el control de las poblaciones caninas, así como acceso tecnológico para el desarrollo de investigación, son limitantes en el área de control de la reproducción de poblaciones en mamíferos. El desarrollo de la presente investigación, pretende contribuir a formar el conocimiento científico necesario, para la generación de nuevas alternativas, en el control de las poblaciones caninas. La castración inmunológica a través de la utilización del conjugado péptido de GnRH recombinado con un toxoide diftérico, pudiera brindar grandes posibilidades de éxito en el control de la fertilidad y en consecuencia la disminución en estas poblaciones, así como agresiones y exposiciones a enfermedades principalmente zoonóticas. Permitiendo una mejor cobertura de programas de prevención como la rabia, preservando de esta manera la salud de las personas a través de la salud animal.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Situación de la población canina en el mundo y en El Salvador.

El perro ha sido un compañero útil al hombre desde la edad más remota y a la fecha se han creado y mejorado las diversas razas, las cuales han sido adaptadas a las necesidades y gustos del hombre. Esta cercanía ha permitido una diversificación en las tareas que se les ha asignado a los perros. Sin embargo, y a pesar de la aparente relación entre el hombre y las diversas razas de perros, no es raro encontrar cachorros o perros adultos que son abandonados en la vía pública cuando no se tiene la capacidad o facilidades para poder atenderlos. Esto ha provocado que la reproducción de estos perros no domiciliados se encuentre fuera de control. De la misma forma, las enfermedades a las que están expuestas y de las cuales pueden ser portadores o vectores hacia los humanos significando un foco importante de enfermedades que representa un problema de salud pública. (Burchard Señoret, 2005).

2.1.1 Impacto de población canina en el Mundo.

En la actualidad el 90 % de los humanos viven en ciudades, las viviendas en general poseen patios de pequeño tamaño. Esto impulsa a los perros, que son exploradores, a deambular por las calles de la ciudad, puesto que no pueden estar confinados a tan pequeños espacios. Esto ha dado origen a un importante número de perros que deambulan libremente por las vías públicas de las ciudades. Situación que es favorecida por la cultura de sus habitantes que permiten estos “paseos” sin supervisión (Burchard Señoret, 2005).

En Estados Unidos se calcula que nacen anualmente el equivalente al 29 % de la población canina estimada, en Chile y Perú esta tasa es del 21 % (Burchard Señoret, 2005).

Este libre deambular tiene consecuencias indeseables en el ambiente urbano:

- Defecaciones en las vías públicas (calculado = 136 grs/perro/día promedio) lo que provoca malos olores, atracción de moscas, accidentes al resbalar y aspecto sucio de las calles y parques. en Paris, Francia, se estima que los perros producen 25

toneladas diarias de excremento (Burchard Señoret, 2005). Estos datos manifiestan altas probabilidades de transmisión de huevecillos de parásitos como Ascaridos al ser humano a través del material fecal producido por los perros que deambulan sin control en la calle.

- Diseminación de basuras, al romper bolsas y volcar recipientes para alimentarse, lo que ensucia la ciudad, atrae moscas, roedores y genera malos olores (BurchardSeñoret, 2005).

- Agresión a transeúntes, generadas principalmente al ingresar a los territorios que los perros de libre deambular han definido como suyos. Las mordeduras de perro constituyen un importante problema de salud pública, en 1996, en EE.UU., la incidencia estimada de mordeduras de perro fue de 18/1,000 habitantes. La incidencia estimada de mordeduras que requieren atención médica fue de 3/1,000 habitantes. Las investigaciones indican que el 70–76 % de las mordeduras son causadas por machos no castrados. El 43,8 % de las mordeduras ocurren en las cercanías de la vivienda de su dueño, otro 35 % de ellas ocurren en el interior de la vivienda (Burchard Señoret, 2005). Esto de alguna manera implica un mayor riesgo en transmisión de rabia por medio de mordeduras; estos perros no reciben un plan de vacunas adecuado y se vuelven potencialmente transmisores. En el 2004 las causas informadas de no observación de los perros mordedores fueron:

- ✓ Perro callejero (47 %)
- ✓ Domicilio inexistente (17,9 %)
- ✓ Domicilio sin moradores (16,5 %)
- ✓ Domicilio falso (7,3 %)
- ✓ No abren puerta (3,3 %)
- ✓ No se permite observación (3,3 %)
- ✓ Se dió muerte al perro (2,0 %)
- ✓ El perro mordió en otra ciudad (2,0 %)
- ✓ El perro muere atropellado en el período de observación (0,7 %).

El 90 % de las lesiones por mordedura de perro son leves, un 10 % restante son graves y requieren sutura, y del 1 al 5 % de las mordeduras requiere hospitalización (Burchard Señoret, 2005).

- Accidentes de tránsito, ocurridos cuando los perros cruzan las calzadas en forma repentina, algunos de los cuales han tenido resultados fatales para los humanos. En 1996, en Gran Bretaña, el costo directo por accidentes de tránsito producidos por perros callejeros fue de 18 millones de libras esterlinas (Burchard Señoret, 2005).
- Producción de ruidos molestos, los que se presentan generalmente de noche debido a los ladridos o aullidos de los perros (Burchard Señoret, 2005).
- Transmisión de enfermedades, algunas de especial gravedad como la hidatidosis, rabia, toxocariasis (Síndrome de larva migrante visceral) y dermatomicosis (tiña). En Gran Bretaña se examinó 800 muestras de suelo de 10 parques encontrándose huevos de toxocara en el 24,4 % de ellas. Demostrando un papel muy importante en la transmisión de parásitos como el *Toxocara canis* a través de excretas de los parques (Burchard Señoret, 2005).

Es necesario mantener bajo control y vigilancia a los cánidos no domiciliados, entre otras cosas para evitar que deambulen por la vía pública o por el campo, debido al alto potencial de ser fuente de agresiones o infecciones hacia el humano o producirle lesiones, las cuales en ocasiones son de consecuencias graves, así como afecta la economía.

2.1.2 Clasificación de perros vagabundos.

- Perros que aparentemente tienen dueño y les permite deambular libremente por la calle, o perros que tuvieron alguna vez dueño y se perdieron o fueron abandonados por ya no ser deseados (Serrano *et al*, 2010) o de otra manera llamados perros errantes (OIE, 2010). Dentro de las razones para ello están los problemas de comportamiento, agresiones hacia los humanos u otros animales, características físicas del animal que lo hace difícil de manejar, o incluso otras como la salud del propietario o el simple cambio de domicilio. En todos los casos, son perros que

deambulan sin control por las ciudades, reproduciéndose y pudiendo ocasionar accidentes viales; son animales que están o no vacunados contra enfermedades como la rabia (Serrano *et al*, 2010).

- Perros sin dueño específico que no son domiciliados o muy bien llamados perros de la “cuadra”. Estos perros presentan diferentes grados de agresividad y se reproducen sin control y por lo general, no están vacunados contra la rabia (Serrano *et al*, 2010). Todos estos animales tienen diferentes grados de interacción con el humano, pueden o no permitir el manejo y presentan diferentes grados de agresividad.

- Perros ferales (Serrano *et al*, 2010) o asilvestrados (OIE, 2010) que habitan en zonas suburbanas. Generalmente provienen de padres ferales, que no son sociables con el hombre, su reproducción es libre y sin control, no están vacunados contra la rabia, se agrupan en manadas siendo frecuentemente agresivos con perros de otras jaurías (Serrano *et al*, 2010).

Aunque se dice que los perros se reproducen y alimentan sin la intervención del hombre, también es cierto que estos animales se pueden alimentar de basura, o de animales silvestres y domésticos que cazan, de fruta y ocasionalmente de carroña (Serrano *et al*, 2010).

La agresión de perros hacia los humanos es un problema de gran relevancia sobre todo por su impacto desde el punto de vista de salud pública. Se ha visto que las principales causas que generan la agresión son el miedo a personas desconocidas, socialización inadecuada, dolor, aprendizaje, entrenamiento, protección territorial e instintos materno (Serrano *et al*, 2010).

No es poco frecuente que los dueños de perros lleguen a ser atacados por sus mascotas, ya sea durante el juego o tratando de separarlos durante una pelea. Los perros que presentan conductas agresivas hacia los miembros de una familia, así como a personas conocidas, son la principal razón por la que un perro es desechado por su dueño (Serrano *et al*, 2010).

Esto se debe a que los lesionados que requieren atención hospitalaria son quienes reportan la agresión a las autoridades, los demás prefieren atenderse en casa, con el médico familiar; los que fueron atacados por su propio perro, normalmente no desean informarlo. Los niños son las víctimas más frecuentes de agresiones (Serrano *et al*, 2010).

La elaboración de estrategias de control de los perros no domiciliados y ferales requiere del conocimiento de su distribución, sus patrones de comportamiento y de metodologías combinadas para lograr el control con éxito. La población de perros en Norteamérica y Europa está calculada aproximadamente entre el 9 y 14% de la población humana en la zona; en Asia, África y Latinoamérica es del 12.5% (Serrano *et al*, 2010).

La eliminación de perros permite mejorar la expectativa de vida de los sobrevivientes porque tienen mejor acceso a los recursos y hay menos competencia entre ellos. En consecuencia, se mejora la tasa de reproducción lo que trae como resultado que la población recupere rápidamente el número de individuos inicialmente existentes (Burchard Señoret, 2005).

2.1.3 Enfermedades zoonóticas transmitidas por perros.

Las enfermedades zoonóticas son a menudo la causa primaria de la preocupación relacionada con los perros callejeros, particularmente para los gobiernos locales y centrales que tiene una responsabilidad con la salud pública. Una de las más importantes es la rabia, enfermedad fatal y los perros son el transmisor más común para los humanos, el control de la rabia es frecuentemente motivo de fuerza mayor para el manejo de poblaciones caninas. Varios temas deben ser tenidos en cuenta al explorar este factor:

a. No se le debe restar importancia al control zoonótico ante sectores pertinentes, como oficiales de salud pública. Es importante explorar juntos las maneras en las que se pueda lograr eficazmente el control zoonótico, al mismo tiempo que se permanece neutral o incluso positivo hacia el bienestar animal.

b. La zoonosis es una preocupación para el público general y las personas pueden a veces comportarse cruelmente con los perros por miedo a enfermedades zoonóticas como la rabia. El hecho de controlar la zoonosis y proveer evidencia tangible de dicho control (por ejemplo poniendo collares rojos para indicar la reciente vacunación) al público puede ayudar a incrementar la confianza y reducir el comportamiento agresivo hacia estos animales.

c. En algunas situaciones puede ser aconsejable introducir primero controles zoonóticos mejorados para restaurar la confianza pública y entonces continuar con otros elementos de manejo de poblaciones de perros como la esterilización o un mejor cuidado médico; sin embargo, un programa apropiado de manejo de poblaciones que incluya control zoonótico simultáneo es la opción ideal (ARC *et al.* s. f.).

Los perros son el principal reservorio de la enfermedad zoonótica visceral denominada Leishmaniasis (*Leishmaniadonovani*), un importante problema de salud pública en América tropical. El *Toxocaracanis*, un ascárido presente en el intestino delgado de los perros, es el principal causante en el humano del síndrome denominado Larva Migrans Visceral y toxocarosis ocular (Serrano *et al.*, 2010).

El perro es considerado la segunda fuente de infección hacia el humano de la Leptospirosis principalmente por *Leptospira interrogans* serotipos *canicola* e *icterohemorrágica*. Además de éstas se menciona que puede participar en la transmisión de hidatidosis (*Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthus*, *E. vogeli*), sarna zoonótica (*Sarcoptes scabiei* variedad *canis*), brucelosis (*Brucella canis*), dermatofitosis (*Microsporium canis*), entre otras (Serrano *et al.*, 2010).

2.1.4 Situación de la población canina en El Salvador.

En El Salvador, la situación sobre la población canina permite la diseminación de diferentes enfermedades de tipo infectocontagiosas, siendo la más importante por su carácter letal, la rabia. Según la unidad de salud ambiental, área de zoonosis

(MINSAL, 2013b) se reporta actualmente una población total estimada a nivel nacional de 1,156,961 caninos. La población canina total estimada en San Salvador a la fecha es de 305,563 según la relación perro/ habitante de 1:6,7 para el área urbana y de 1:3,3 para el área rural (ver cuadro 1). A nivel nacional se contó con una población de habitantes de 5,744,113 de acuerdo al último censo en el año 2007 elaborado por la Dirección General de Estadísticas y Censos (DIGESTYC, 2013a). Para el 2013 se tiene una proyección de población de habitantes de 1,740,784 para San Salvador, al relacionarlo con la población canina del mismo departamento que cuenta con 305,563 para 2013 (DIGESTYC, 2013b), esta representa un 17.55% en relación a la población humana.

Cuadro 1. Población canina estimada en El Salvador (perro /habitante).

REGIÓN	ÁREA URBANA (perro: habitante)	ÁREA RURAL
Oriental	1:4,6	1:3,1
Paracentral	1:4,7	1:3
Metropolitana	1:6,7	1:3,3
Central	1:6,3	1:4,4
Occidental	1:5,6	1:3,8

Fuente: Dirección General de Estadística y Censos (DYGESTIC). MINSAL, 2013b.

Actualmente en El Salvador al igual que otros países realizan programas enfocados al control de la rabia como principal enfermedad zoonótica en la cual el perro es el 91% (Radostits, *et al.* 2002) responsable de la transmisión hacia las personas. Solo para el departamento de San Salvador se utilizan 305,563 dosis de vacuna antirrábica, a un costo de 0.60 centavos por dosis para el año 2013 (Orellana, 2013). Esto es relevante debido al alto costo que supone al programa nacional de vacunación antirrábica para canes y felinos. Los altos índices poblacionales de perro/habitante dificultan sostenimiento de un programa de esta enfermedad debido a la subestimación de la población real de canes y su crecimiento exponencial, ya que según la OMS es necesario cubrir un 80% (Radostits, *et al.* 2002) de la población canina de un determinado lugar para la prevención de la enfermedad.

Debido a la naturaleza letal del virus de la rabia es importante el control de la enfermedad. Sin embargo en los últimos 5 años se han reportado 70 casos de rabia confirmados en caninos (ver Anexo A1), convirtiéndose este la principal especie de transmisión hacia el humano. A pesar que no se reportan casos en humanos desde el 2009, la importancia de la enfermedad radica en su presencia en animales de relación cotidiana con el humano. La OMS recomienda la remoción (captura) de perros callejeros como una forma de educar a la comunidad sobre la tenencia responsable de estos animales (Burchard Señoret, 2005). Ante tal situación se hace necesaria la implementación de programas y nuevas alternativas para el control de la población canina en El Salvador.

Para el año 2013 se contabilizaron 12,407 casos de agresiones de perros a personas (ver cuadro 2). De los cuales no se conocen que porcentaje han requerido atención médica por lesiones de mordeduras leves, graves y de urgencia, además el costo económico y psicológico de las personas afectadas.

Cuadro 2. Número de personas agredidas por animal transmisor de rabia, años 2008 a 2013, El Salvador.

Años	Personas agredidas
2008	36,884
2009	33,657
2010	29,746
2011	26,606
2012	28,232
2013*	12,407

*Hasta semana epidemiológica 26.

Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (VIGEPES). MINSAL, 2013a.

2.2 Fisiología de la reproducción en el perro.

En los mamíferos el aparato reproductor del macho está regulado por intrincados sistemas de retroalimentación en el que participan el hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis y los testículos.

2.2.1 El eje hipotálamo-hipofisario.

Este complejo proceso inicia cuando el hipotálamo sintetiza y secreta de forma pulsátil el decapeptido gonadoliberina GnRH (Hormona liberadora de gonadotropina), que actúa sobre las células gonadotrópicas de la adenohipófisis. Éstas, estimuladas por la GnRH, sintetizan y secretan dos gonadotropinas: *Folitropina* FSH (Hormona foliculoestimulante) y *Lutropina* LH (Hormona luteinizante). Ambas son unas glucoproteínas heterodímeras formadas por dos péptidos unidos mediante enlaces no covalentes (Cunningham, 2003:425).

La liberación de la FSH, LH o ambas, depende de los patrones pulsátiles de secreción de la GnRH. Pulsos irregulares y de pequeña amplitud resultan en la liberación de FSH mientras que pulsos de alta frecuencia inducen la liberación de LH (Cunningham, 2003:425), variando los niveles durante el día, y en algunas especies se produce de forma estacional (Intervet, 1999:130).

La LH también conocida como hormona estimulante de las células intersticiales (HECI) mantiene la producción de andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) (Ptaszynska, 2007), esta hormona se dirige hacia dentro de los testículos, donde se une a los receptores de membrana de las células de Leydig y estimula en ellos la conversión del colesterol en testosterona (ver figura 1). Mientras que la FSH trabaja en combinación con la testosterona estimulando las células de Sertoli de los túbulos seminíferos (Ptaszynska, 2007), para la espermatogénesis (Hill *et al.* 2006).

Una vez sintetizados los andrógenos se difunden a sangre y a linfa, donde se unen a las proteínas transportadoras de andrógenos, que se producen en las células de Sertoli (Cunningham, 2003:425). Las células de Sertoli producen inhibina que ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior y el hipotálamo inhibiendo la secreción de FSH (Hill *et al.* 2006:516).

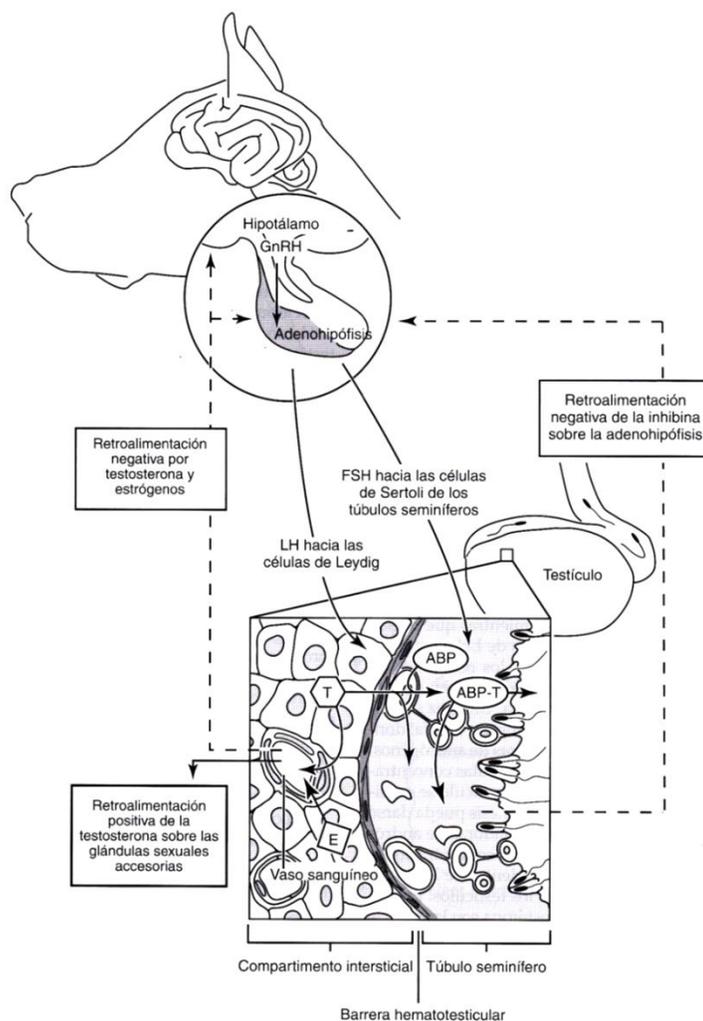


Figura 1. Fisiología de la reproducción en canino macho.

Fuente: Fisiología veterinaria: Fisiología reproductora del macho, (Cunningham, 2003).

Las proteínas transportadoras de andrógenos potencian la acumulación de altas concentraciones de los andrógenos testosterona y dihidrotestosterona, dentro de los túbulos seminíferos y en el intersticio de los testículos. Hill *et al.* (2006) y Ptaszynska (2007) afirman que la testosterona es necesaria para la mitosis y la meiosis de la espermatogénesis, de igual forma para el desarrollo de la conducta sexual y para mantener las características y la función sexuales secundarias en el perro,

incluyendo la libido. En combinación con la FSH, estimula las células de Sertoli para que sustenten y regulen la espermatogénesis (Hill *et al.* 2006:516).

La testosterona, la dihidrotestosterona y los estrógenos, regulan la síntesis y liberación de LH a través de una retróalimentación negativa ejercida a nivel del hipotálamo o del lóbulo anterior de la hipófisis. Debido a que tanto la FSH como la LH son necesarias para la existencia en los testículos de una alta concentración de sustancias responsables de una espermatogénesis normal (Cunningham, 2003:425).

Por tanto, puede verse que los andrógenos no sólo controlan los procesos reproductivos sino el comportamiento asociado: la monta, la agresividad y el marcaje territorial. Partes del córtex cerebral de la región hipotalámica también están implicados en la determinación del comportamiento sexual (Ptaszynska, 2007).

Cuadro 3. Valores de testosterona en caninos.

Clasificación	Testosterona (ng/ml)
Perro normal	0,5 - 10,0 ng/ml
Castrado	<0,2 ng/ml
Criptorquido unilateral	1,0 - 5,0 ng/ml
Criptorquido bilateral	0,1 - 2,0 ng/ml
Tumor de células de sertoli	0,1 - 2,0 ng/ml con alza de estrógenos.

Fuente: Hormonas: Testosterona (DLV Laboratorio veterinario. s. f.), (SUIZAVET. s. f.). Manual de medicina interna de animales pequeños: testosterona (Nelson y Couto, 2000).

2.2.2 Espermatogénesis.

La espermatogénesis comienza inducida por la FSH; Frandson y Whitten, (1984), afirman que es poco necesaria la presencia de testosterona para complementar el proceso, sin embargo Hill *et al.* (2006) manifiestan que es necesaria su combinación para estimular a los túbulos seminíferos. Las gonadotropinas de la hipófisis regulan

directamente la mitosis y meiosis de las células germinativas, e indirectamente de la maduración de las espermatídes (Frandsen y Whitten, 1984).

La espermatogénesis como tal, es un proceso largo y dirigido en el que las células madres diploides de la base de los túbulos seminíferos (espermatogonias) se dividen por mitosis pasando a espermatocitos primarios que se dirigen al centro del túbulo las cuales sufren progresivas divisiones meióticas hasta diferenciarse en espermatídes haploides desarrollando flagelo, luego tras su maduración y paso a través del epidídimo (Frandsen y Whitten, 1984) se liberan como espermatozoides (Cunningham, 2003:423). La cantidad de luz diurna también tiene un fuerte efecto en el funcionamiento testicular y en la temporada reproductiva debido a los efectos que tienen en la hipófisis (Frandsen y Whitten, 1984).

La gonadotropina y la secreción de hormonas esteroideas en el perro son controlados principalmente por mecanismos de retroalimentación que incluyen el hipotálamo, la glándula pituitaria anterior, y las gónadas. La gonadectomía es una técnica quirúrgica que se realiza con frecuencia en la práctica veterinaria como un medio fiable de control de la población, altera el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG) (Donovan, 2013).

2.2.3 Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es un decapeptido (pGlu1-His2- Trp3-Ser4-Tyr5-Gly6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly10-NH₂) sintetizada y almacenada en las neuronas de GnRH situados en la zona basal y preóptica medial del hipotálamo. Ha habido tres isoformas de GnRH reconocidos en los animales; GnRH-I mamíferos, pollo GnRH-II, y la lamprea GnRH-III. Sin embargo, GnRH-I es aceptado como el péptido principal regulador de la fertilidad. La liberación de GnRH es controlada por retroalimentación de hormona esteroidea, así como las hormonas no esteroideas, tales como la melatonina, catecolaminas, y los opiáceos. Bajo estimulación neuronal, GnRH se libera de una manera pulsátil y se mueve a través de las terminales nerviosas en la eminencia media. Estas terminales están en estrecha proximidad a la cama capilar primaria del sistema porta hipofisario, lo que permite la GnRH entrar en

la circulación y acceder a sus receptores en gonadotrofas en la pituitaria anterior. GnRH tiene una alta especificidad a su receptor (GnRHR) en la pituitaria anterior, y la regulación GnRHR depende de la GnRH en sí (Donovan, 2013).

Algunos investigadores empezaron a fraccionar extractos de las hipófisis anteriores y pronto observaron que no había una sino dos hormonas que estimulaban las gónadas presentes en los extractos de la hipófisis anterior. Estas dos hormonas subsecuentes se llamaron conforme a sus efectos biológicos principales. La hormona que causa la ovulación y transformación del folículo ovárico en cuerpo lúteo se llama hormona Luteinizante (LH). Debido a que esta hormona también estimula las células de Leydig o a las células intersticiales del testículo, se le llamo también hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH). La otra hormona hipofisaria que estimula las gónadas se llamó hormona foliculoestimulante (FSH) debido a que esta fracción promueve el desarrollo del folículo graafiano en el ovario (Hafez, 1984).

2.2.4 Función de GnRH.

Como su nombre lo indica, la función de las gonadotropinas es estimular a las gónadas. En el macho los efectos de las gonadotropinas son la secreción de hormona esteroide, la espermatogénesis y la síntesis de la proteína específica ligadora de andrógeno (PLA). La LH actúa sobre las células de Leydig en el testículo y causa la secreción de la testosterona; esta a su vez, desempeña un papel importante en el mantenimiento de la espermatogénesis (Hafez, 1984).

La habilidad de las gonadotropinas para estimular los diferentes procesos tales como esteroidogénesis y gametogénesis indica que existe un sistema único de acción molecular de las gonadotropinas (Hafez, 1984).

2.3 Respuestas inmunológicas.

La característica del sistema inmunitario tiene la capacidad de reconocer y a continuación responder a las sustancias extrañas, en particular a los invasores microbianos. El sistema inmunológico tiene una sorprendente eficacia que no solo tiene la capacidad de reconocer y destruir sino también de recordar a los invasores extraños y de alguna manera al estar expuesto a este por segunda vez, el sistema

inmunológico responde con mayor prontitud y eficacia (Tizard, 1998). En resumen el antígeno debe de cumplir con las siguientes características necesarias para desencadenar una respuesta inmunológica, de las cuales la especificidad del antígeno, capacidad de producir una respuesta inmunitaria además de poseer un peso y tamaño molecular de la proteína que se alto, son vitales para el sistema inmunológico pueda causar una inmunoreacción adecuada y de protección al organismo vivo.

Una de las principales ramas del sistema inmunológico que actúa en contra de los invasores es la respuesta humoral, que es guiada por las proteínas denominadas anticuerpos; esto lo pudo demostrar Pasteur a través de la vacunación; que podría generar inmunidad ante los agentes infecciosos; probó que estas proteínas podrían ser encontradas en el suero sanguíneo (Tizard, 1998).

Tizard (1998) asegura en base a experimentación con toxina tetánica en equinos que la cantidad de anticuerpos que se forman y la protección obtenida de una respuesta inmunitaria primaria son relativamente pequeñas a diferencia que al mismo equino se le administrará una segunda dosis de la toxina, la concentración sérica de estos anticuerpos aumenta con rapidez y llega a valores altos y luego declinaría con lentitud; mejorando de esta manera la respuesta inmune obtenida. Si al mismo animal se le aplica una tercera dosis de antígeno, su respuesta inmunitaria se caracterizará por un periodo latente más corto, y por una respuesta de anticuerpos que alcanza una mayor magnitud. La respuesta secundaria puede provocarse muchos meses, o aun años, después de la primera inyección del antígeno, aunque su magnitud tiende a disminuir con el tiempo (Tizard, 1998).

2.4 Métodos de control de fertilidad en caninos.

Entre los principales métodos para el control de poblaciones de caninos machos en el mundo tenemos dos grandes grupos, los métodos quirúrgicos y no quirúrgicos. (Ver figura 2).

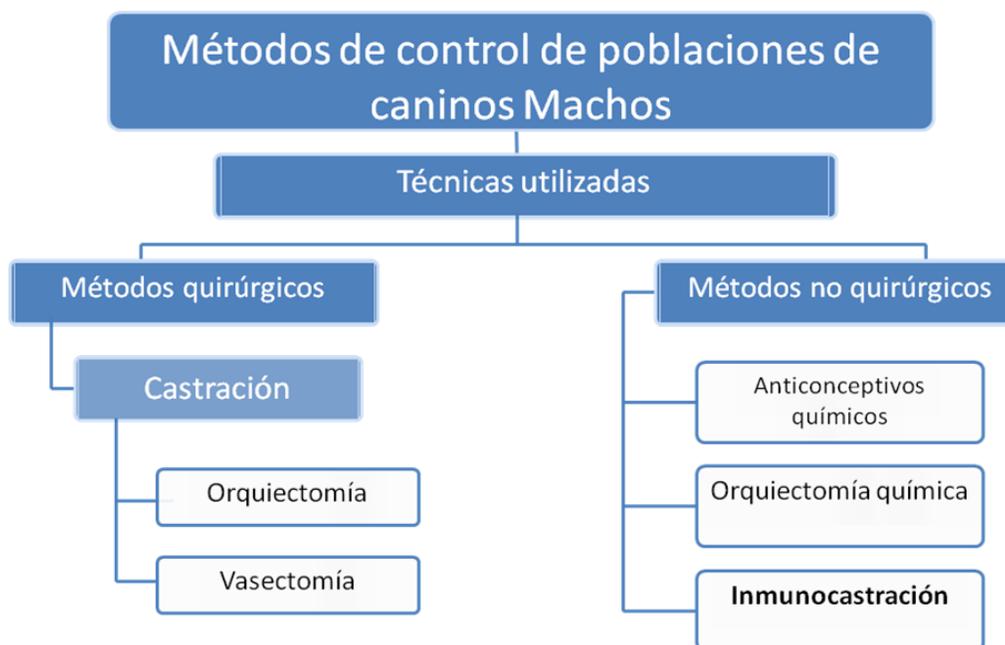


Figura 2. Clasificación de métodos en el control de poblaciones de caninos machos.

Fuente: Adaptado de Métodos para el control de poblaciones caninas. Revista Sapuvet de Salud Pública. Muñoz Rojas, *et al.* 2011.

2.4.1 Métodos quirúrgicos.

▪ Orquiectomía.

Involucra la remoción quirúrgica de los testículos. Es el más seguro de los métodos, ya que elimina la fuente de producción de espermatozoides como también de las hormonas testiculares, las cuales controlan el crecimiento de los órganos que influyen la conducta sexual. Tienen dos formas de acceso: la preescrotal y la perianal. La primera es la más común y presenta menores dificultades; se puede realizar de forma abierta o cerrada, como única diferencia que la túnica vaginal es diseccionada en la forma abierta.

Es el método más frecuentemente utilizado para controlar las poblaciones caninas, pero tiene como desventaja sus costos, en comparación de otros métodos, siendo más difícil su acceso a personas de escasos recursos.

De cualquier manera, se deberían realizar campañas de esterilización canina que busquen reducir dicha población de manera masiva: durante los tres primeros años de la campaña se debería esterilizar al 10 % de la población estimada, pues de otra manera ningún programa tendrá éxito por debajo de dichos índices, debido a la reproducción geométrica de los animales. El crecimiento de la población se habrá detenido o moderado luego del tercer año de esterilizaciones masivas, pudiéndose reducir oportuna y progresivamente la intensidad del programa, aclarándose que para que este funcione debe realizarse de forma gratuita y con fácil acceso a las comunidades menos favorecidas (Muñoz Rojas, *et al.* 2011), sin mencionar los costos económicos, riesgos del procedimiento anestésico y cuidados post-operatorios.

- **Vasectomía.**

Comprende la sección del conducto deferente (canal por donde salen los espermatozoides). Generalmente se realiza en el área escrotal, pero también se puede abordar a través de la región abdominal como una alternativa de la técnica convencional.

Comparada con la orquiectomía, la vasectomía es más simple, aunque también requiere anestesia y de los cuidados posoperatorios correspondientes. Después de la vasectomía los perros continúan con una libido normal, así como con las conductas asociadas a los machos; sin embargo, son incapaces de preñar, aunque dado que con esta técnica no se extirpa una porción del conducto deferente sino que solo se secciona, existe la posibilidad remota de que se produzca recanalización de este, volviendo a ser fértil un macho canino (Muñoz Rojas, *et al.* 2011).

2.4.2 Métodos no quirúrgicos.

- **Métodos anticonceptivos químicos en machos.**

Se han propuesto como una alternativa a los métodos quirúrgicos, evitando así las desventajas de la cirugía como costo y cuidado posoperatorio. Estos métodos involucran la inyección bilateral de sustancias irritantes dentro de las colas de los epidídimos, cuya reacción cicatricial, que se da en el tejido epididimario en el sitio de

inyección, bloquea el pasaje de espermatozoides desde el epidídimo al conducto deferente. Se pueden presentar dolor e irritación, llegando a desarrollar áreas necróticas y úlceras en el escroto cuando la solución cae dentro de la cavidad escrotal comprometiendo el bienestar animal (Muñoz Rojas, *et al.* 2011).

Los estudios han propuesto trabajar en el desarrollo de productos que faciliten la esterilización química, mediante su aplicación directa sobre los órganos reproductivos. Ante la necesidad de un método práctico con beneficio inmediato, una opción es este tipo de esterilización.

▪ **Castración química intraepididima.**

Mediante la aplicación en la cola del epidídimo de diversas sustancias como el gluconato de clorhexidina, el etanol, la formalina y el cadmio, aunque muchos de estos requieren de dosis altas y tienen efectos colaterales severos como en el caso del cadmio. Para estar seguros de la utilización de estos productos debería tenerse presente:

- El efecto de la esterilización deberá perdurar durante la vida reproductiva del Animal.
- El producto no inducirá efectos colaterales indeseables que pongan en riesgo la salud y el bienestar de los perros.
- El producto tendrá un costo accesible con relación a las condiciones socioeconómicas del país.

Se realizó un estudio en México, en el cual se utilizó metilcianoacrilato para aplicación en la cola del epidídimo de los perros; arrojó como resultados la azoospermia en el 86,7% de los perros estudiados, por ende se concluyó que es un método sencillo y fácil para inducir esterilidad en machos (Muñoz Rojas, *et al.* 2011).

En México se ha diseñado un producto llamado Repcon JLDH de Cyta Laboratorios, el cual se aplica directamente sobre la cola del epidídimo de los perros machos, lo que trae como consecuencia la paralización inmediata de los espermatozoides con

los que tiene contacto el compuesto. Se ha observado que los perros que recibieron el producto disminuyeron progresivamente su cuenta de espermatozoides hasta llegar a valores no compatibles con la fertilidad y algunos en corto tiempo fueron azoospermicos (Muñoz Rojas, *et al.* 2011).

- **Orquiectomía química.**

Consiste en aplicar una inyección intratesticular de determinadas soluciones, como gluconato de zinc, que produce necrosis del tejido testicular causando la no producción de células germinales, así como alteración de la producción hormonal sexual. Esta técnica requiere un mayor estudio con respecto a las sustancias utilizadas, las reacciones colaterales y el tiempo de infertilidad (Muñoz Rojas, *et al.* 2011).

- **Agonistas de GnRH.**

Agonistas de la GnRH, como lo son desloreidina o nafarelinaque poseen una vida media baja, por lo que se implantan por vía subcutánea liberándose de forma sostenida logrando un doble efecto. Durante los 2 a 4 primeros días provocan un aumento marcado de la secreción de FSH y LH conocido como el efecto “flareup” que induce una hipertestosteronemia marcada en el macho y la aparición del celo en las hembras. Pasado este tiempo, se produce una desensibilización de los receptores que hace que las exista una verdadera esterilización química a los 15 días en promedio (Mir y Fontaine, 2012). En el perro, los agonistas de la GnRH de acción prolongada pueden utilizarse para indicaciones tales como posponer la pubertad en ambos sexos, el control de la ciclicidad reproductiva, entre otras (Muñoz Rojas, *et al.* 2011).

- **Antagonista competitivo de GnRH.**

Antagonista competitivo de los receptores de GnRH como la acyclina, que bloquea el celo cuando se administra durante los tres primeros días del proestro, para posteriormente volver a entrar en celo 20 días después. Este medicamento aún no se encuentra comercializado (Mir y Fontaine, 2012).

▪ **Análogos de GnRH.**

Los análogos de la GnRH son péptidos sintéticos cuya estructura química se deriva del hipotálamo decapeptido GnRH con determinadas sustituciones de aminoácidos (Muñoz Rojas, *et al.* 2011).

2.5 Biotecnologías.

2. 5.1 Vacunas recombinantes.

Se ha desarrollado un nuevo rango de vacunas que utilizan una tecnología diferente de las vacunas inactivadas o vivas atenuadas. Esta tecnología ha sido denominada, recombinante; y ha sido implementada por la revolución de la ingeniería genética que permite el intercambio de material genético entre organismos diferentes (Richard, 2004).

Las vacunas recombinantes se encuentran entre los productos más nuevos en el mercado emergente de biotecnología y vacunas. El avance tecnológico de estos productos consiste en su capacidad para aislar y realizar el corte y empalme (o recombinar) de genes del tamaño de fragmentos de ADN de un organismo y transferidos u otro organismo por medio de un virus vector o un plásmido de ADN. Ya se ha demostrado que el organismo híbrido resultante del cambio *in vitro* de material genético tiene un tremendo potencial para dar ADN inmunogenético y seguro dentro del huésped animal y, así, representa en verdad el desarrollo de una nueva generación de vacunas veterinarias. Las vacunas recombinantes que se introducen en la actualidad para la práctica de animales de compañía parecen brindar un producto excepcional de seguridad, aunque la eficacia y duración de la inmunidad aún debe establecerse para cada producto (Richard, 2004).

2. 5.1 .1 Inmunocastración.

El principal patrón de liberación de gonadotropinas es pulsátil y está determinado por la secreción de GnRH desde el hipotálamo. La importancia de este sistema de reparto lo demuestra el hecho de que si la GnRH se administrará de forma continua farmacológicamente el sistema puede inactivarse. Una ocupación continua de los receptores de GnRH en las células gonadotropinas por la GnRH administrada,

interrumpiría la señal intracelular para la síntesis y liberación de gonadotropinas en el organismo (Cunningham, 2003:378).

Según Cunningham (2003) se puede ver alterada la liberación pulsátil del GnRH endógeno al aplicar de manera continua una GnRH sintética, si resaltamos este pensamiento y lo relacionamos con los avances de las vacunas recombinantes, se obtienen vacunas de nueva generación que afecten el feedback reproductivo, creando de esta manera inmunidad contra hormonas de la reproducción como es el GnRH en los mamíferos, obteniendo como resultado una supresión de la función normal de la capacidad reproductiva de forma reversible, mientras la curva de anticuerpo de GnRH se mantiene en el organismo por un determinado tiempo.

Lo avances en el área de la fisio-inmunología han permitido crear vacunas con la capacidad de generar anticuerpos contra hormonas endógenas, en este caso en particular el GnRH. Los resultados en avances de diferentes especies muestran el éxito y el efecto directo de las vacunas.

▪ **Inmunocastración en porcinos.**

Los avances en esta área surgieron con la necesidad de controlar la población de cerdos ferales en zonas naturales en el Sur de Estados Unidos (Campbell *et al*, 2010). Además se ha comprobado la aplicabilidad de estas vacunas no solo en el control poblacional, sino su aplicabilidad desde el punto de vista zootécnico; Pfizer retoma esta iniciativa con su producto Improvac® y orienta este tipo de biotecnología para evitar un mal manejo en cuanto a estrés en los porcinos con la castración quirúrgica, para mejorar el rendimiento en canal y eliminar el olor sexual producido en los cerdos machos (EMA, s. f.).

▪ **Inmunocastración en bovinos**

En la especie bovina Pfizer fue pionero generando una vacuna recombinante con especificidad a esta especie denominada Bopriva®, en un estudio realizado en 1,600 toros de engorde, por el área de Salud Animal de Pfizer en conjunto a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se demostró el efecto de la vacuna de análogo de GnRH, establecida en diferentes tratamientos, demostrando claramente

el efecto de la vacuna de GnRH en supresión de niveles de testosterona hasta el día 147 del estudio y disminuyó el peso testicular de los toros expuestos a la vacuna. Características de la carne (terneza) mejoraron en los toros vacunados con la vacuna de GnRH (Amatayakul-Chantler *et. al*, 2012).

▪ **Inmunocastración en camélidos.**

Estudios en la Universidad de Oregon en los Estados Unidos, utilizando Canin Gonadotropin Releasing Factor Immunotherapeutic® en alpacas y llamas, se logró demostrar el efecto significativo de la vacuna en una población de 18 unidades experimentales. Los efectos al igual que en otras especies fueron la disminución del volumen testicular, comportamientos pasivos, disminución de los niveles de testosterona y el aumento de la IgG en relación a los anticuerpo contra el GnRH (Donovan, *et. al*, 2013).

▪ **Inmunocastración en fauna silvestre.**

Estados Unidos a través del Centro Nacional de Investigaciones en Vida Silvestre fue una de las instituciones pioneras en la investigación de este tipo de biotecnologías para crear soluciones alternativas para el control de algunas especies de fauna silvestre que se encuentran fuera de control en su reproducción natural, de modo que dejan de equilibrar el ecosistema y lo impactan de maneras inquietantes. GonaCon® surgió como respuesta a esta problemática; abarcando una diferente gama de especies en donde como representación y orientación principal tiene al venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*); que con solo una aplicación de esta vacuna contraceptiva provee inmunidad contra el GnRH hasta por 5 años. La vacuna es implementada para el control de ardillas, perritos de las padreras, caballos entre otros (NWRC, 2013).

▪ **Inmunocastración en felinos.**

Las investigaciones en esta biotecnología con felinos han tenido resultados importantes en la supresión del comportamiento sexuales de los gatos sometidos en estudios. Un reciente estudio publicado por la revista Argos (2012) menciona que el

uso de agonistas de la GnRH puede suponer la solución al problema de control reproductivo en los gatos. Los niveles de testosterona en el gato son inferiores, permaneciendo basales durante al menos 390 días. El volumen testicular disminuye entre 3 y 4 veces y el comportamiento sexual de macho. Cabe destacar que las espículas penianas, cuya presencia está ligada a la de la testosterona, no desaparecen por completo hasta los 210 días (Mir y Fontaine, 2012). Este mismo resultado se logra a través de la aplicación de vacunas contraceptivas, estudios realizados con el uso de vacunas recombinantes a base del virus del herpesvirus felino tipo 1 (FHV-1), utilizado como vector y causar un efecto inmunógeno apropiado contra el GnRH, lo cual provea efectos deseados (Waite, 2006).

▪ **Inmunocastración en caninos.**

De igual forma en la especie canina se han realizado diferentes estudios, orientado a dar nuevas alternativas en el control reproductivo de la especie; un estudio realizado en 8 perros Beagle (Basulto, *et al* 2003) se empleó una vacuna contraceptiva a base de péptido sintético de GnRHm1 combinado con toxoide tetánico (TT), demostró el aumento del número de espermatozoides patológicos a la determinación por espermograma, además los perros inmunizados con la vacuna al ser extraídos los testículos y en cortes histológicos se evidencio la disminución del diámetro de los túbulos seminíferos en donde se producen los espermatozoides a diferencia de perros no inmunizados (Basulto, *et al* 2003). En otro estudio realizado en la Universidad de Chile manifiestan que vacunas contraceptivas en forma de sebo y parenteral, influyen directamente en los niveles de testosterona plasmática por debajo de 0.1ng/ml de absorbancia hasta el día 75 post-inoculación (Sáenz Iturriaga, 2012).

Además, la liberación cíclica por episodios (alzas periódicas) en animales normales puede causar considerables variaciones en la concentración basal de testosterona. En lugar de medir niveles basales de testosterona para detectar animales criptorquídeos, se ha desarrollado una prueba denominada la prueba de respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o a la gonadotropina coriónica humana (hCG). Estas pruebas son buenos indicadores en la determinación de

testosterona en animales castrados, potros normales y criptorquídeos. La prueba de respuesta a GnRH es poco práctica en el equino debido al mayor costo (por la dosis utilizada). Esta prueba es usada más comúnmente en perros (Matamoros *et al.* 2002).

3. JUSTIFICACIÓN.

El perro es capaz de transmitir al hombre una amplia gama de enfermedades infectocontagiosas y parasitarias, algunas de éstas pueden ser controladas mediante el uso de vacunas pero otras no; por lo que es importante considerarlas. Al no cumplir con las condiciones, compromisos y responsabilidades en la tenencia de las mascotas, en este caso de los canes (*Canis lupus familiaris*), éstos quedan en el abandono, deambulando libremente por la vía pública significando para cualquier comunidad un problema de insalubridad, no sólo porque dispersan basura y contaminan con excretas la vía pública, generando toneladas de excretas en las vías públicas, sino porque son transmisores potenciales de enfermedades zoonóticas, al no contar con un control veterinario. Estos deambulan por las diferentes calles de nuestro país, dando mal aspecto y contaminando el entorno de las diferentes comunidades, donde se desarrollan las diferentes actividades laborales, sin mencionar su efecto negativo en el turismo.

En referencia a las enfermedades infecciosas, transmisibles de animales vertebrados al ser humano bajo condiciones naturales (zoonosis), los agentes infecciosos involucrados incluyen: bacterias, virus, parásitos, hongos, etc. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización Panamericana de la Salud (OPS), reconocen a 174 enfermedades zoonóticas de importancia, de las cuales el perro es capaz de transmitir 53 de estas (Salcedo, 2000).

El problema de la sobrepoblación canina, tiene un efecto directo en la salud humana, según estadísticas del Ministerio de Salud (MINSAL), la población canina del país en el año 2,000 rondaba alrededor de 723 mil 604 perros. Se calcula que de esa cifra, unos 108 mil son animales que viven en las vías públicas, sin que tengan un control veterinario. San Salvador es el departamento que más animales registró para esa

fecha, con unos 157 mil perros. De esa cifra, más de 23 mil son perros callejeros (Salcedo, 2000).

La causa de la sobrepoblación de mascotas es simple, los perros se reproducen a una tasa muy alta cuando su reproducción no es controlada. Generalmente una hembra canina que alcanza la madurez sexual bajo óptimas condiciones, puede criar satisfactoriamente entre 4 y 6 cachorros por año. En 6 años una perra y sus crías, tienen la capacidad a través de su descendencia, de producir 67,000 nuevos cachorros (CEFUTREMA, s. f.).

La sobrepoblación canina es preocupante, y tiene muchas consecuencias, tanto desde el punto de vista de la salud pública, como desde el punto de vista humanitario. Numerosos son los problemas que generan los perros abandonados y sin hogar en las vías públicas, ejemplo de ello son los casos de agresión a hacia los humanos. En El Salvador en el 2013 se reportaron 12,407 personas agredidas hasta la semana epidemiológica 25 (MINSAL, 2013a); lo que significa un costo en tratamientos médicos de las lesiones, impacto psicológico y en las implicaciones laborales (Buchard Señoret, 2005). El conocimiento de la medicina veterinaria, así como sus recursos y pericias, son esenciales para la salud y bienestar de los humanos y son un componente esencial de la salud pública.

La inmunocastración o castración inmunológica, es un método de vacunación destinado a bloquear la secreción de hormonas sexuales en mamíferos, lo que permite controlar la fertilidad, la agresividad y la producción de hormonas sexuales, al igual que lo hace la castración quirúrgica; con algunas ventajas adicionales, entre las que se puede mencionar que es un método reversible.

Esta investigación propone una nueva alternativa en el control de esta población, a través de la castración inmunológica, el empleo del conjugado péptido de GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) recombinado con un toxoide diftérico, brinda grandes posibilidades de éxito en el control de la fertilidad y disminución en poblaciones de canes, evitando que deambulen por la vía pública y disminuyendo la población canina callejera, así como agresiones y exposiciones a enfermedades

principalmente zoonóticas. De la misma forma, la investigación pretende generar el conocimiento científico necesario, para enfocar futuras investigaciones en métodos alternativos de control de poblaciones, como lo es la inmunocastración, y orientar esfuerzos al uso de estas tecnologías en el largo plazo, en la población canina del país.

La inmunocastración, como método contraceptivo en caninos, ofrece grandes ventajas, permite eliminar la fuente de hormonas sexuales y gametos, permitiendo controlar la reproducción y las características agresivas asociadas a la actividad reproductiva. Esta vacuna bloquea el efecto de la GnRH, a través de la estimulación de una respuesta inmune con producción de anticuerpos neutralizantes contra ésta.

El porqué del uso de la inmunocastración como alternativa para el control de la población canina, se basa en ser un método no invasivo y reversible, obteniendo mejores resultados cuando se destina para el control de sobrepoblaciones en áreas específicas; en comparación con los métodos quirúrgicos tradicionales que requieren de un cuidado post operatorio y mayores recursos económicos.

Actualmente en el mercado salvadoreño, se encuentra a disposición como vacuna inmunocastradora el producto Innosure[®] (péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria), destinada para el control del olor sexual y función reproductiva de cerdos machos. Debido a ser la única opción en biotecnología para producir una supresión inmunológica temporal del GnRH endógeno; la investigación plantea la aplicación de esta vacuna en caninos machos. El desarrollo de la presente investigación, permitirá el uso de nuevos mecanismos de control de poblaciones caninas, siendo un paso muy importante desde el punto de vista de salud pública, en la transmisión de enfermedades zoonóticas transmitidas por caninos.

4. HIPÓTESIS.

Si al aplicar el conjugado del péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, en *Canis lupus familiaris* machos, provoca la supresión inmunológica temporal de GnRH, y disminución de los niveles plasmáticos de testosterona necesarios para función reproductiva.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Evaluar la eficacia del péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, como método contraceptivo en *Canis lupus familiaris* machos, en el cantón Primavera, municipio de Santa Ana, departamento de Santa Ana.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar el efecto del péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, en la estructura testicular de caninos.
- Determinar el efecto del péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, en relación a los niveles de testosterona sérica en caninos machos.
- Relacionar los niveles de testosterona sérica en caninos machos, vacunados con el péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico con la estructura testicular.
- Evaluar la respuesta etológica, en machos vacunados con el péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Ubicación del experimento en el espacio y en el tiempo.

La investigación se llevó a cabo en el cantón Primavera, municipio de Santa Ana, departamento de Santa Ana. En comunidades identificadas con *Canis lupus familiaris* (perro doméstico) machos enteros, que conformaron nuestras unidades experimentales. Cada unidad fue monitoreada dentro de su ambiente doméstico, durante la fase de campo, manteniendo las mejores condiciones para el desarrollo de la investigación durante seis meses.

6.2 Descripción de las unidades en estudio

Las unidades de estudio fueron 20 *Canis lupus familiaris* machos enteros mestizos, en edades reproductivas y un peso entre 15 a 35 kg con buena salud. Todas las unidades en estudio fueron examinadas clínicamente para poder ser aptas para pertenecer a la muestra poblacional, se realizó una anamnesis de cada unidad, abarcando todos los puntos de importancia.

En el estudio se evaluó el efecto biológico, como inmunógeno, de un preparado vacunal sintético denominado GnRH-DT (péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria) sobre los órganos reproductores de perros mestizos adultos y la relación con los niveles de testosterona plasmática de los canes machos en estudio. La muestra se distribuyó de forma aleatoria formando cinco grupos de cuatro animales cada uno (ver figura 3).



Figura 3: Distribución en grupos de las unidades en estudio.

Para la fase de campo, se trabajó con la distribución de cinco bloques con cuatro animales cada uno; para luego aplicar el péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria por vía subcutánea en la extremidad posterior izquierda. Para ello se realizó de la siguiente manera: un primer grupo se dejó como control, el segundo grupo recibió una dosis de un mililitro en una sola aplicación, el tercer grupo recibió dos aplicación de un mililitro con intervalo de cuatro semanas, el cuarto grupo recibió una dosis de dos mililitros en una sola aplicación, el quinto y último grupo recibió dos aplicación de dos mililitros con intervalo de cuatro semanas del preparado vacunal por vía subcutánea.

6.3 Metodologías utilizadas.

Selección de unidades experimentales, esta se realizó por medio de un examen físico clínico, con el objetivo de formar los diferentes tratamientos a evaluar. De la misma manera se realizaron dos mediciones de los niveles séricos de testosterona por medio de ELISA de cada unidad con intervalos de 15 días previos a la vacunación; y dos mediciones a partir del día 75 post vacunación con un intervalo de 15 días para su última medición a los 90 días.

Identificación de las unidades en estudio, se colocó a cada unidad experimental un collar del color del tratamiento respectivo, siendo para el T1 Control (blanco), T2 (azul), T3 (verde), T4 (amarillo) y T5 (morado). Igualmente se usó un número de

registro correlativo a cada unidad, para facilitar la toma de datos en el registro individual, evitando confusiones entre los mismos.

Uniformidad de las unidades experimentales, se realizó para permitir una mejor homogeneidad entre cada unidad, se aplicaron desparasitaciones y vitaminas a cada unidad en estudio, así como una mejora en su nutrición para una condición corporal adecuada.

6.3.1 Metodología de campo.

En esta fase se realizaron cuatro tomas de muestras sanguíneas en tubos para serología de cada una de las unidades en estudio, las primeras dos muestras de sangre se realizaron previo al iniciar los tratamientos del conjugado vacunal con un intervalo de 15 días, y las dos tomas posteriores 75 días después de aplicada la vacuna con un mismo intervalo de 15 días, finalizando a los 90 post vacunación. Esta muestra se utilizó para la determinación de la concentración de la testosterona en suero por medio de la técnica de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA). De igual forma se realizaron cinco mediciones testiculares a lo largo de la investigación. Durante el experimento se realizó una evaluación etológica a cada unidad con los siguientes parámetros: agresividad, libido y salidas de casa.

6.3.1.1 Toma de muestra de sangre:

Materiales:

- Jeringas de 5 ml. de capacidad
- Agujas estériles de 21 x 1 pulgadas
- Algodón impregnado con alcohol al 70 %
- Tubos recolectores para serología
- Guantes de látex
- Rasuradora
- Hieleras
- Depósito para descarte
- Gradilla para tubos

- Bozales y correas
- Papelería en general
- Marcador permanente

Método toma de muestra de sangre:

- Se sujetó al canino utilizando una correa y colocación de un bozal, para facilitar su manejo.
- Se identificó del mejor sitio de punción venosa, en este caso fue la vena cefálica o vena safena.
- Se rasuró un área de unos dos centímetros cuadrados sobre el vaso sanguíneo y se desinfectó del área con algodón impregnado de alcohol al 70 %.



Figura 04: Medidas de Asepsia.(A) Rasurado del área a muestrear.(B) Desinfección de la zona de muestreo.

- Se realizó hemostasis por encima del sitio a puncionar.
- Se procedió a puncionar el vaso sanguíneo con una aguja estéril calibre 21 x 1 pulgada, introduciendo la aguja con el bisel de la misma apuntando hacia arriba, en un ángulo de 45 grados aproximadamente, sobre la vena que se encontraba resaltada por la presión de la hemostasis.

- Una vez atravesada la piel, el tejido subcutáneo y la pared del vaso sanguíneo, se realizó ligera aspiración del embolo, para verificar que efectivamente se introdujo la guja al vaso sanguíneo.
- Se aspiró del embolo de la jeringa para coleccionar la muestra de sangre. Una vez coleccionada la cantidad suficiente de muestra, se retiró la aguja haciendo presión con una torunda de algodón sobre el sitio de punción.



Figura 5: Toma de muestra sanguínea. (A)Introducción de la guja al vaso sanguíneo.(B) Recolección de sangre.

- Inmediatamente se depositaron cinco mililitros de sangre en los tubos para serología para su posterior uso en el laboratorio. El transporte se realizó en hieleras a una temperatura de 4°C, protegiéndola de los rayos solares y golpes, trasladándolas lo más pronto posibles tras su extracción.

6.3.1.2 Determinación del tamaño testicular:

Materiales: Calibrador o pie de rey y hoja de control.

Método: Para la obtención de cada medida, se auxilió de un calibrador o pie de rey, con lo que medimos el ancho del testículo justo en la línea imaginaria que corta el testículo en su plano trasversal; la medición del largo del testículo se realizó con el pie de rey desde la cabeza del epidídimo hasta la base del mismo.

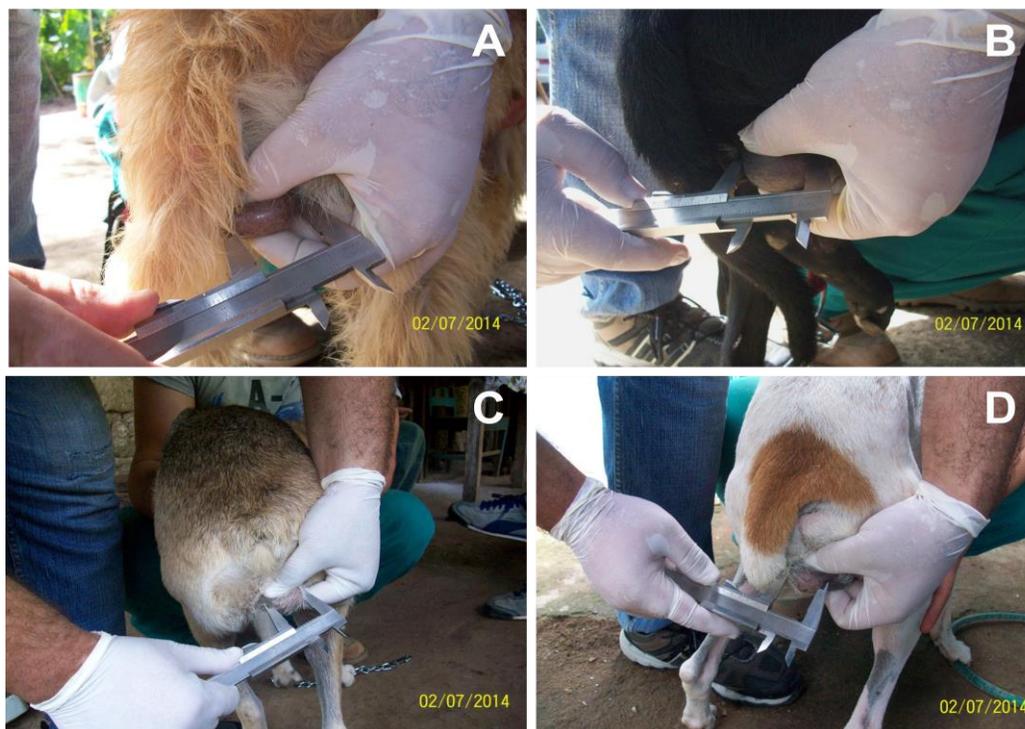


Figura 6: Determinación del tamaño testicular. (A) (B) (C) (D) Medición de largos y anchos de testículos.

6.3.1.3 Aplicación del péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria.

Materiales:

- Frasco de 100 ml de Innosure[®] (péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria)
- Jeringas de 3 ml. de capacidad
- Agujas estériles de 21 x 1 pulgadas
- Algodón impregnado con alcohol al 70 %
- Guantes de látex
- Rasuradora eléctrica
- Hielera
- Depósito para descarte
- Bozales y correas

- Papelería en general

Unidades experimentales:

- *Canis lupus familiaris* machos enteros

Método: Previo a la aplicación del péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria, se rasuró un área de 10 x 10 cm y se limpió con alcohol al 70 % sobre la extremidad posterior izquierda para todos los tratamientos donde se aplicó el producto por vía subcutánea, con el fin de observar alguna posible reacción inflamatoria en el sitio de punción, y a los tratamientos que les correspondió un refuerzo, se aplicó en el lado opuesto a la primera aplicación.



Figura 7: Aplicación de la vacuna. (A) Rasurado del área a vacunar. (B) Zona previamente desinfectada. (C) Cargando dosis vacunal (D, E y F) Aplicación vía subcutánea de la vacuna.

- Se inició con el **Tratamiento 1 (T1), color blanco**, que sirvió como control en el estudio, sin la aplicación péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria en estudio.
- Para el **Tratamiento 2 (T2), color azul**, se identificaron a los cuatro respectivos canidos que los conforman, se cargó en la jeringa un mililitro del péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria, luego

se realizó un leve masaje en el sitio de aplicación y se registró en la hoja de control.

- Para el **Tratamiento 3 (T3), color verde**, se cargó en la jeringa un mililitro del péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria. Los cuatro canidos del T3 recibieron un refuerzo a una misma dosis (un mililitro) cuatro semanas después de la primera aplicación, ambos sucesos se registraron en la hoja de control.
- Para el **Tratamiento 4 (T4), color amarillo**, se identificaron a los cuatro respectivos canidos que los conforman, se cargó en la jeringa dos mililitros del péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria en una sola dosis, luego se realizó un leve masaje en el sitio de aplicación y se registró en la hoja de control.
- Para el **Tratamiento 5 (T5), color morado**, se cargó en la jeringa dos mililitros del péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria. Los cuatro caninos del T5 recibieron un refuerzo a una misma dosis (dos mililitros) cuatro semanas después de la primera aplicación, ambos sucesos se registraron en la hoja de control.

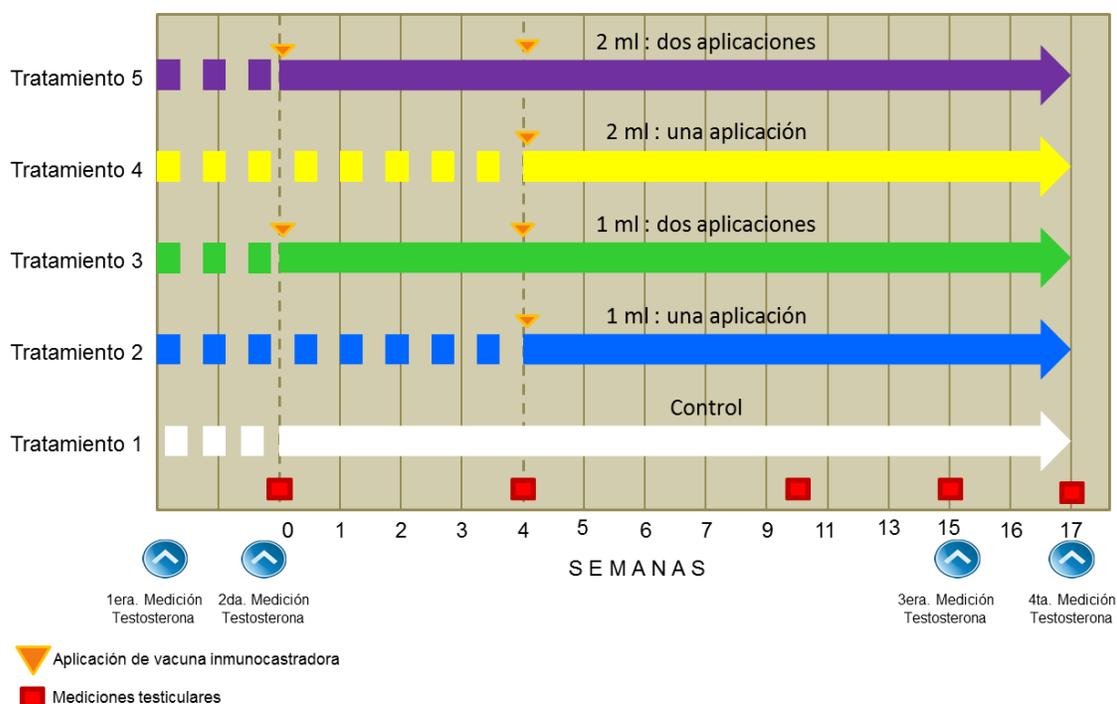


Figura 8: Distribución en grupos de los tratamientos en estudio.

En el caso del Tratamiento 3 (T3) y Tratamiento 5 (T5), iniciaron el día que correspondió aplicar la segunda dosis de refuerzo de los tratamientos T2 y T4, con el objetivo que todos los tratamientos cumplieran los 75 días respectivos para las dos últimas mediciones de testosterona por ELISA, con un intervalo de 15 días finalizando a los 90 post vacunación (ver figura 8).

6.3.2 Metodología de laboratorio.

En esta fase se procesó cada una de las muestras obtenidas en la fase de campo, para complementar el estudio sobre las unidades experimentales. Procedimientos descritos a continuación:

6.3.2.1 Procedimiento de extracción de suero

Materiales: Guantes de látex, muestra de sangre en tubos para serología, gradilla, centrifuga, tubos eppendorf, pipeta Pasteur, pipetas automáticas de 50 a 200 μ l, puntas estériles de 300 μ l, marcador, congelación a -20 $^{\circ}$ C, descarte y papel toalla.

Método: Se calibraron los tubos en la centrifuga, sometiéndolos por 10 minuto a 1500 rpm para precipitarlos componentes celulares, al finalizar la fracción superior o sobrenadante tras la centrifugación de aspecto claro y transparente o de un color amarillento corresponde al suero sanguíneo. Luego se extrajo el suero con ayuda de la pipetas automáticas con puntas estériles de 300µl y se transfirió a los tubos eppendorf para ser almacenados y conservados a una temperatura de -20°C (Basulto, *et al.* 2003:21).

Para un mejor control de las muestras sanguíneas, se rotuló cada tubo para serología con los datos de cada unidad en estudio, antes de la extracción de la muestra.

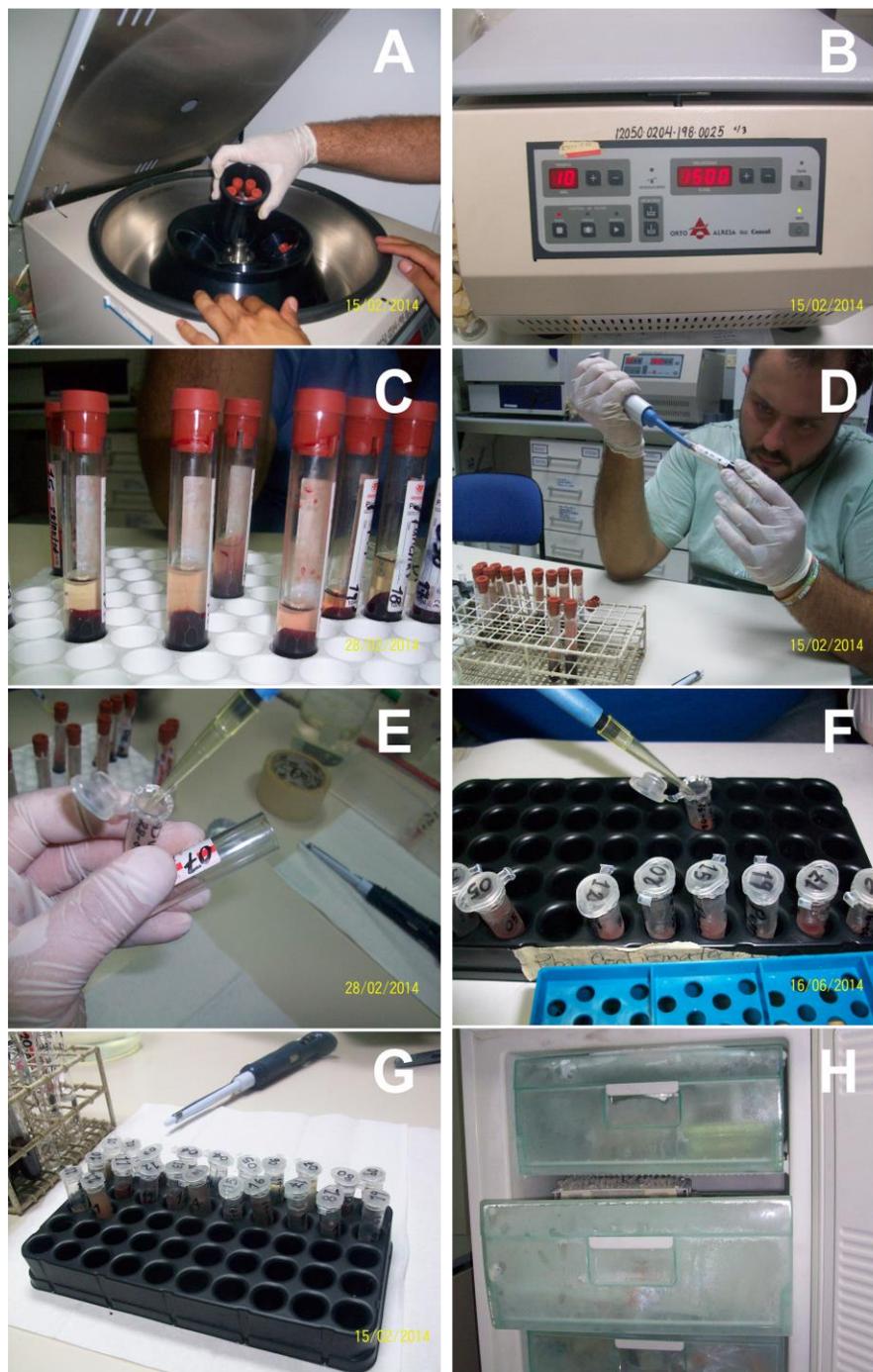


Figura 9: Extracción de suero. (A) Calibrado de las muestras. (B) Centrifugado de las muestras. (C) Muestras centrifugadas. (D) Extracción del suero. (E, F y G) Transferencia a los tubos eppendorf. (H) Conservación a -20°C .

6. 3. 2. 2 Determinación de niveles de testosterona en suero por medio de KIT de Testosterona ELISA

Materiales:

- Pipetas de precisión: 10 µl, 50 µl, 100 µl, y 1,0 ml
- Puntas desechables para pipetas.
- Agua destilada o desionizada.
- Mezclador Vortex o equivalente.
- Papel absorbente o toalla de papel
- Papel milimetrado lineal.
- Lector de microplaca.
- **Muestras se suero** sanguíneo de *Canis lupus familiaris* machos enteros

Reactivos:

- Pocillos de microtitulación recubierto con anticuerpo de cabra Anti Conejo IgG, 96 pozos
- Estándares de Referencia para Testosterona: 0, 0,1, 0,5, 2,0, 6,0 y 18,0 ng / ml. Líquidos, 0,5 ml cada uno, listos para usar.
- Reactivo de conejo Anti-Testosterona (color rosa), 7 ml
- Reactivo conjugado de Testosterona-HRP (color azul), 12 ml
- Control Testosterona 1, Líquido, 0,5 ml, listo para su uso.
- Control de Testosterona 2, Líquido, 0,5 ml, listo para su uso.
- Reactivo TMB (One-Step) 11 ml.
- Solución de Parada (stop) (1N HCl), 11 ml (Diagnostic Automation, 2009).

La testosterona es el andrógeno más importante secretada a la sangre. En perros machos la testosterona es secretada principalmente por las células de Leydig de los testículos; esta es responsable del desarrollo de las características sexuales masculinas secundarias y sus medidas son útiles en la evaluación de los estados de hipogonadismo. Los kits de EIA de testosterona están diseñados para la medición de la testosterona total en suero (Diagnostic Automation, 2009).

Principio de la Prueba. El test EIA para testosterona se basa en el principio de unión competitiva entre la testosterona en la muestra del estudio y el conjugado HRP de testosterona para una cantidad constante de anti-testosterona de conejo. En la incubación, los pocillos cubiertos con anticuerpos de cabra anti conejo IgG son incubados con 10 µl de estándares de testosterona, los controles, las muestras de animales, 100 µl de reactivo conjugado HRP de testosterona y 50 µl de reactivo de conejo anti testosterona de conejo a 37 ° C durante 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad específica de testosterona HRP marcada compite con la testosterona endógena presente en el estándar, muestra, o en el suero de control de calidad, para fijarse en un número de sitios de unión del anticuerpo específico de testosterona (Diagnostic Automation, 2009).

Por lo tanto, la cantidad de conjugado de peroxidasa de testosterona inmunológicamente unida en el pocillo disminuye progresivamente a medida que la concentración de testosterona en las muestras aumenta (Diagnostic Automation, 2009).

El conjugado de peroxidasa de testosterona sin unirse es removido y luego se lavan los pocillos. A continuación, se añade una solución de reactivo TMB, y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos, lo que resulta en el desarrollo del color azul. El desarrollo del color es detenido al agregar 1 N HCl, y se mide la absorbancia espectrofotométricamente a 450 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la cantidad de enzima presente y está inversamente relacionada a la cantidad de testosterona no marcada en la muestra. Una curva de calibración es obtenida mediante el trazado de la concentración de los estándares frente a la absorbancia. La concentración de testosterona de las muestras y controles que corre concurrentemente con los estándares, pueden calcularse a partir de la curva de calibración (Diagnostic Automation, 2009).

Procedimiento de la prueba

Colecta y preparación de la muestra

1. No es necesario un tratamiento especial previo a la muestra.
2. Las muestras de suero pueden conservarse a 2-8 ° C hasta por 24 horas, y deben congelarse a -10 ° C o menos por períodos más largos. No utilizar muestras hemolizadas o muy lipémicas (Diagnostic Automation, 2009). Tenga en cuenta: Las muestras que contienen azida de sodio no se deben utilizar en el análisis.

Preparación de los reactivos

1. Todos los reactivos fueron expuestos a temperatura ambiente (18-25 ° C) antes de su uso.
2. Las muestras con concentraciones de testosterona esperados de más de 18 ng / ml se pueden cuantificar mediante dilución con diluyente disponible (Diagnostic Automation, 2009).

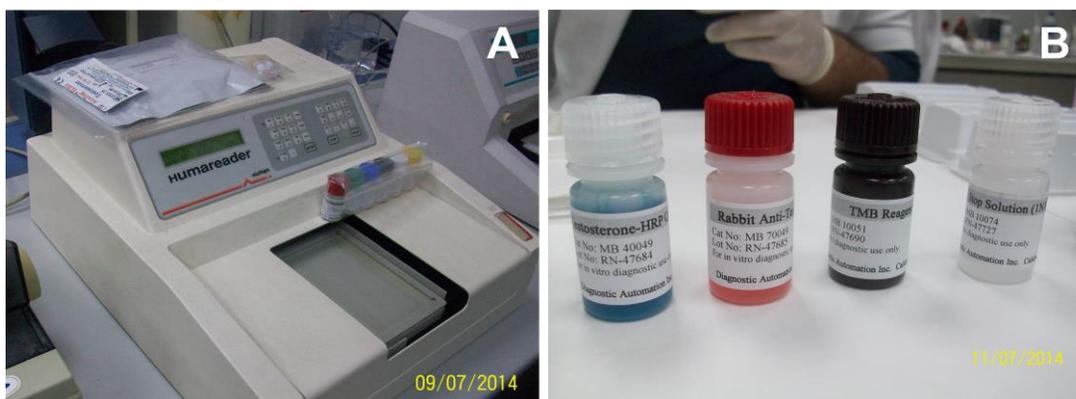


Figura 10: Equipo y materiales de ELISA. (A) Lector automático de ELISA.(B) Reactivos de ELISA.

Procedimiento del ensayo

1. Se aseguró el número deseado de pocillos cubiertos en el soporte
2. Se agregó 10 µl de estándares, muestras de cada unidad en estudio y controles en los pocillos utilizados.

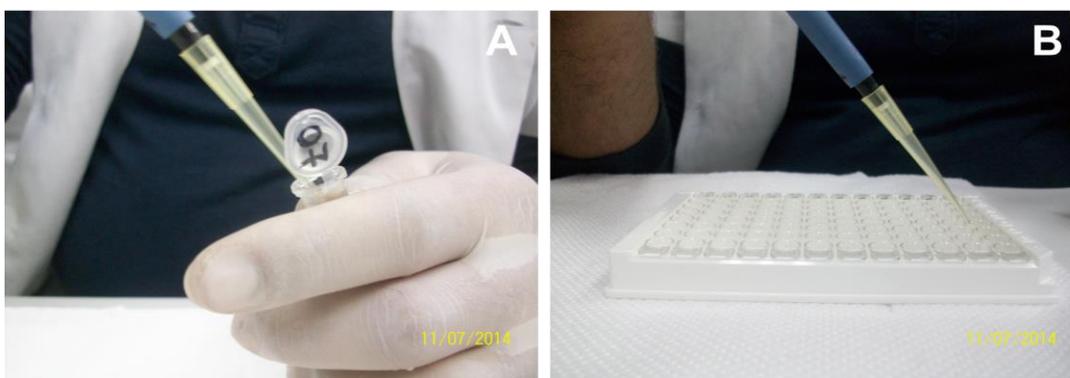


Figura 11: Procedimiento de ELISA. (A) Cargando 10 µl de cada muestra. (B) Aplicación muestra en los pocillos de la placa de ELISA.

3. Se agregó 100 µl de Testosterona-HRP conjugado reactivo en cada pocillo.

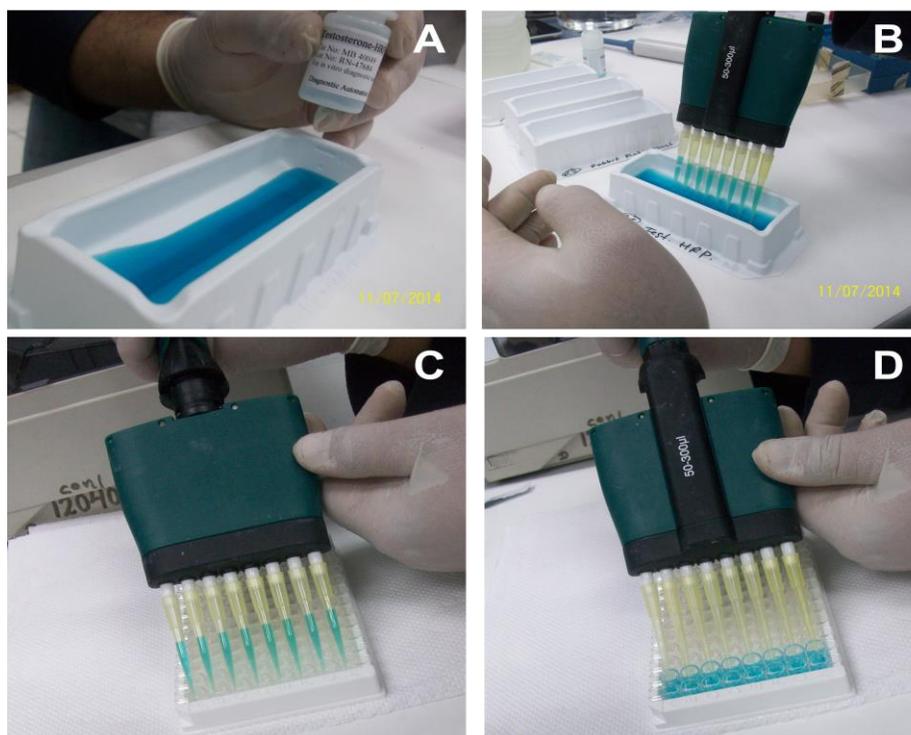


Figura 12: Procedimiento de ELISA. (A)(B) Cargado del reactivo Testosterona-HRP conjugado. (C) (D) Aplicación de 100 µl del reactivo a cada pocillo con las muestras.

4. Se agregó 50 μ l de reactivo de conejo anti testosterona a cada pocillo.

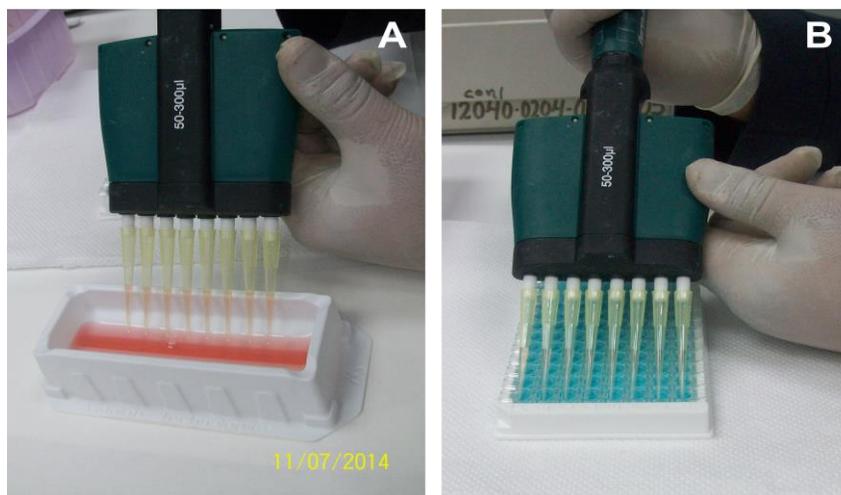


Figura 13: Procedimiento de ELISA. (A) Cargado del reactivo conejo anti testosterona.(B) Aplicación de 50 μ l del reactivo a cada pocillo.

5. Se mezcló a fondo durante 30 segundos utilizando la mezcladora automática. Es muy importante mezclar completamente.

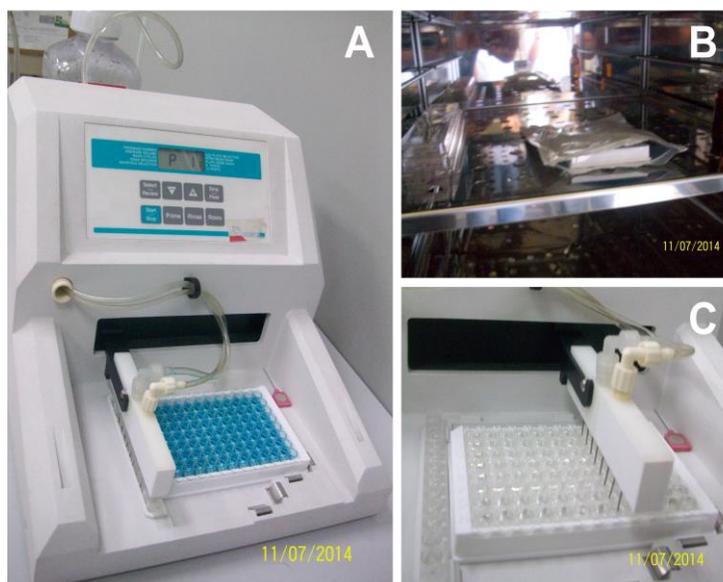


Figura 14: Procedimiento de ELISA. (A) Mezcla automática de la placa. (B) Incubación a 37 °C. (C) Enjuague automático.

6. Se incubó a 37 ° C durante 90 minutos.
7. Se enjuagó y vaciamos los pocillos 5 veces con agua destilada, utilizando la lavadora automática.
8. Se agregó 100 µl de reactivo TMB en cada pocillo. Mezclamos suavemente durante 10 segundos utilizando la mezcladora automática.

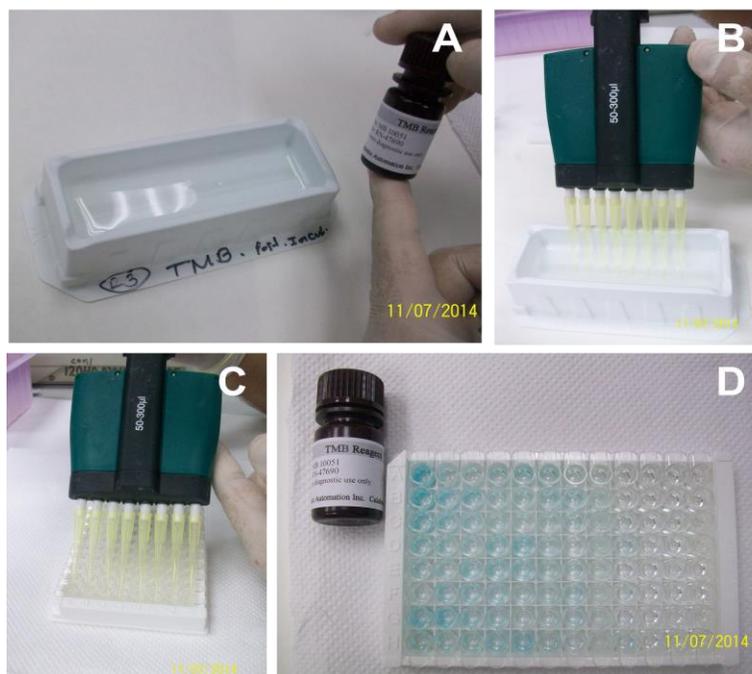


Figura 15: Procedimiento de ELISA. (A)(B) Cargado del reactivo TMB. (C) Aplicación de 100 µl del reactivo a cada pocillo. (D) Placa finalizada con reactivo TMB.

9. Se incubó a temperatura ambiente (18-25 ° C) durante 20 minutos.
10. Se agregó 100 µl de solución de parada (stop) (1N HCl), a cada pocillo para detener la reacción.

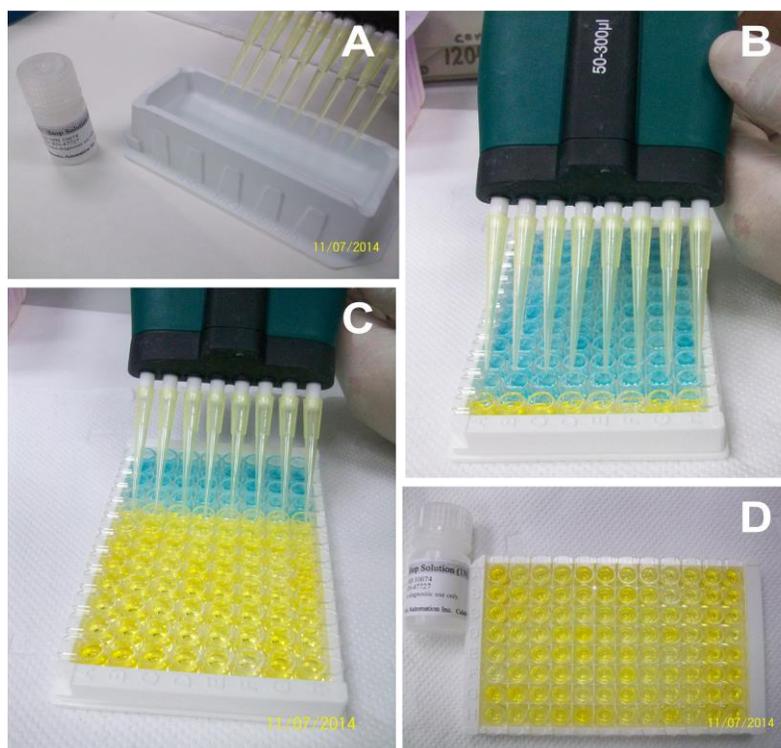


Figura 16: Procedimiento de ELISA. (A) Cargado solución de parada (stop) (1N HCl). (B)(C) Aplicación de 100 µl de la solución a cada pocillo. (D) Placa finalizada con viraje de color al amarillo.

11. Se mezcló con cuidado 30 segundos. Verificamos que los cambios de color de azul a amarillo se completaran.
12. Se leyó la absorbancia a 450 nm con un lector de microtitulación, dentro de 15 minutos (Diagnostic Automation, 2009).



Figura 17: Procedimiento de ELISA. (A) Lectura de absorbancia en el lector de ELISA.

6.4 Metodología utilizada para la toma de datos.

Cada variable fue documentada en registros individuales a lo largo de la fase de campo, abarcando anamnesis, patrones conductuales, peso, reacciones post-vacunales, mediciones testiculares y niveles de testosterona séricos, comparándolas con los datos iniciales registrados de cada unidad en estudio. Para determinar la eficacia del péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide diftérico sobre las funciones reproductivas en los caninos.

6.5 Metodología estadística

Para la realización estadística de la investigación, se realizó una comparación pre y post tratamiento, en la cual se confrontaron los datos iniciales con los resultados finales de cada tratamiento en estudio. Se trabajó bajo un diseño estadístico de bloques completamente al azar (Lara Ascencio, 2013); trabajando con 20 unidades experimentales (*Canis lupus familiares* machos enteros), debido a la disposición de recurso en estudio; con ello se formaron cinco bloques de cuatro perros machos enteros cada uno. En cada bloque se aplicó un tratamiento respectivo con el péptido sintético análogo del GnRH conjugado con toxoide de difteria, además de un tratamiento que sirvió como control del experimento. El estudio se trabajó con un nivel de significancia del 5 %.

T1= Tratamiento control (sin aplicación de vacuna)

T2= un mililitro de vacuna en una aplicación

T3= un mililitro de vacuna en dos aplicaciones

T4= dos mililitros de vacuna en una aplicación

T5= dos mililitros de vacuna en dos aplicaciones

Para la prueba estadística se utilizó análisis de la covarianza (ANCOVA), prueba Tukey (HSD) realizando una correlación entre las variables cuantitativas y cualitativas a medir, Modelo Lineal Generalizado (GLM), contrastes ortogonales y Coeficiente de Correlación de Pearson bajo el programa estadístico de SAS (Lara Ascencio, 2013).

Variables a medir

Variables cuantitativas:

- 1) Niveles de testosterona sérica, de los perros machos de cada tratamiento, antes y después de aplicado el conjugado vacunal.
- 2) Cambios en la estructura de los testículos de los caninos machos en estudio.

Variables cualitativas:

- ✓ Respuesta etológica (agresividad, libido y fugas de casa) en machos vacunados con el conjugado.
- ✓ Reacciones post-vacunales.
- ✓ Peso corporal.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS DE TAMAÑO TESTICULAR EN PERROS.

Largos derechos testiculares.

Según el análisis de varianza para la variable de largos derechos testiculares, se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas, por lo que se procedió a determinar las posibles tendencias.

Las tendencias de las medias en los tratamientos analizadas bajo la prueba Tukey (Figura 18), comparan, las medidas de los largos de testículos derechos, en sus cinco tiempos de medición a lo largo del experimento; siendo la tercera fecha en el T5, donde se muestran los menores tamaños de los largos de los testículos derechos, con una media de 2.53 cm; seguido del T3, con una media de 2.65 cm, siendo esta fecha, la que presentó los menores promedios de medición. A partir de la cuarta y quinta medición, se observó en los tratamientos con aplicación de vacuna, un ligero incremento de los tamaños testiculares, pero manteniéndose por debajo del tamaño inicial.

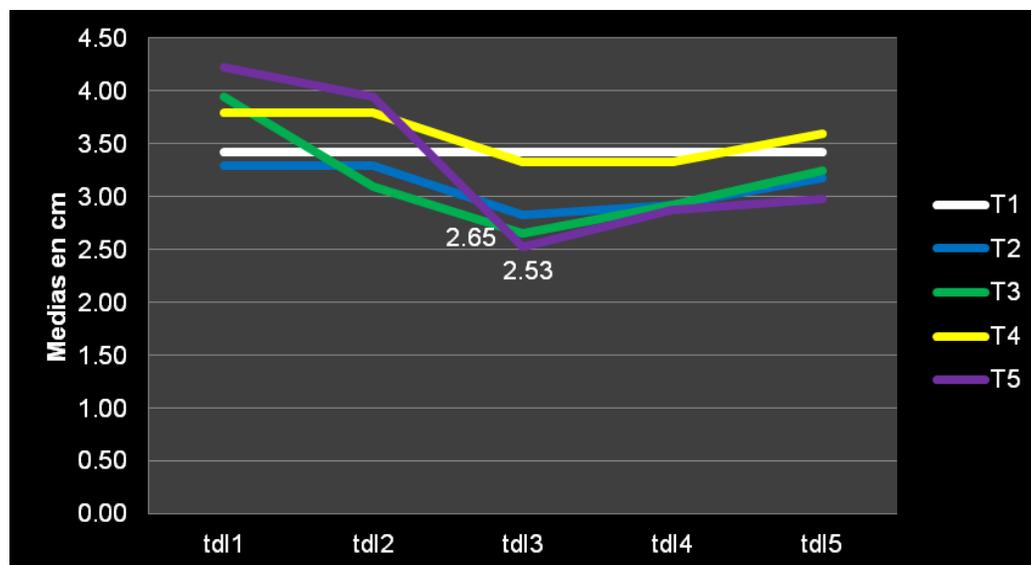


Figura 18. Medias de largos derechos testiculares

Medias de Largos testículos derechos					
Tratamientos / fechas de medición	tdl1	tdl2	tdl3	tdl4	tdl5
T1	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43
T2	3.30	3.30	2.83	2.93	3.18
T3	3.95	3.10	2.65	2.93	3.25
T4	3.80	3.80	3.33	3.33	3.60
T5	4.23	3.95	2.53	2.88	2.98

Cuadro 4. Resumen medias de largos testículos derechos

Largos izquierdos testiculares.

Según el análisis de varianza, para la variable de largos izquierdos testiculares, se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas, por lo que se procedió a determinar las posibles tendencias.

Las tendencias de las medias en los tratamientos analizadas bajo la prueba Tukey (Figura 19), comparan las medidas de los largos de testículos izquierdos, en sus cinco tiempos de medición a lo largo del experimento; siendo la tercera fecha en el T5, donde se muestran los menores tamaños de los largos de los testículos

izquierdos, con una media de 2.50 cm; seguido del T3, con una media de 2.80 cm, siendo esta fecha, la que presentó los menores promedios de medición. A partir de la cuarta y quinta medición, se observó en los tratamientos con aplicación de vacuna, un ligero incremento de los tamaños testiculares, pero manteniéndose por debajo del tamaño inicial.

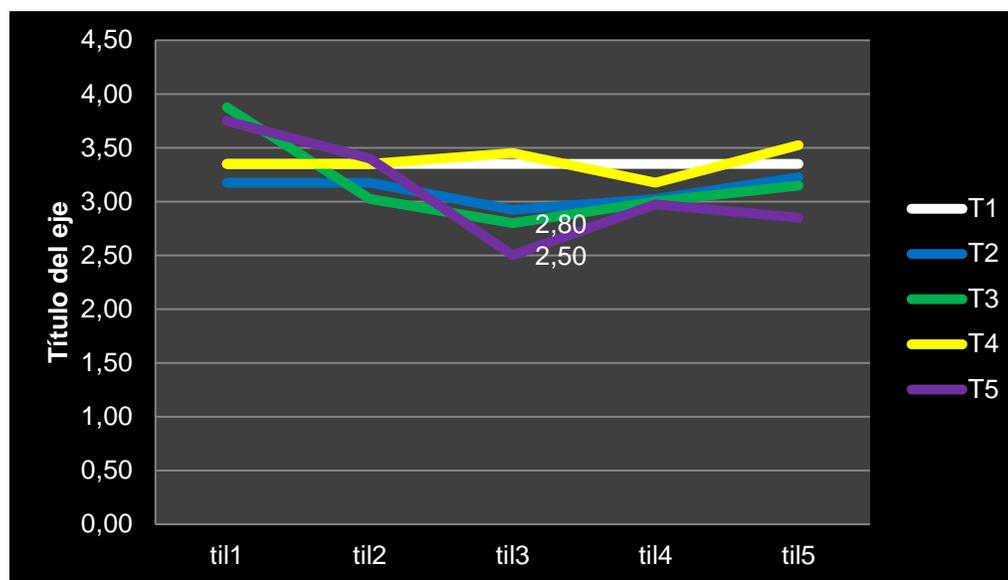


Figura 19. Medias de largos izquierdos testiculares.

Medias de Largos testículos izquierdos					
Tratamientos / fechas de medición	til1	til2	til3	til4	til5
T1	3.35	3.35	3.35	3.35	3.35
T2	3.18	3.18	2.93	3.03	3.23
T3	3.88	3.03	2.80	3.00	3.15
T4	3.35	3.35	3.45	3.18	3.53
T5	3.75	3.40	2.50	2.98	2.85

Cuadro 5: Resumen medias de largos testículos izquierdos.

Anchos derechos testiculares.

Según el análisis de varianza, para la variable de anchos derechos testiculares; se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas, por lo que se procedió a determinar las posibles tendencias.

Las tendencias de las medias en los tratamientos, analizadas bajo la prueba Tukey (Figura 20), comparan las medidas de los anchos de testículos derechos, en sus cinco tiempos de medición a lo largo del experimento; siendo la tercera fecha en el T3, donde se muestran los menores tamaños de los anchos de los testículos derechos, con una media de 1.08 cm; seguido del T2, con una media de 1.28 cm, siendo esta la fecha la que presentó los menores promedios de medición. A partir de la cuarta y quinta medición se observó en los tratamientos con aplicación de vacuna, un ligero incremento de los tamaños testiculares; pero manteniéndose por debajo del tamaño inicial, a diferencia del T5, que obtuvo los menores valores, a partir de estas dos últimas mediciones.

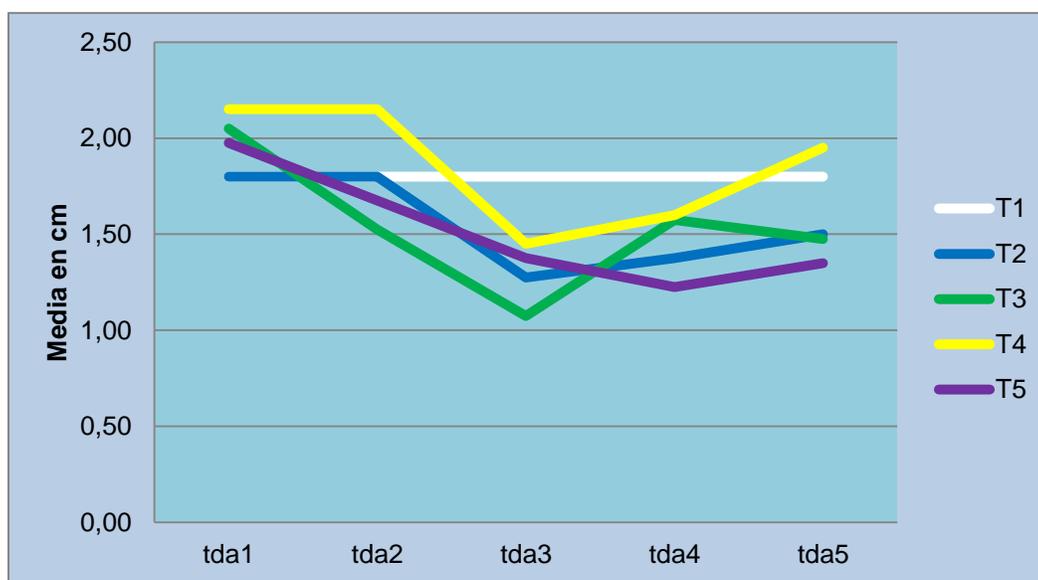


Figura 20. Medias de anchos derechos testiculares.

Medias de Anchos testículos derechos					
Tratamientos / fechas de medición	tda1	tda2	tda3	tda4	tda5
T1	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
T2	1.80	1.80	1.28	1.38	1.50
T3	2.05	1.53	1.08	1.58	1.48
T4	2.15	2.15	1.45	1.60	1.95
T5	1.98	1.68	1.38	1.23	1.35

Cuadro 6: Resumen medias anchos testículos derechos.

Anchos izquierdos testiculares

Según el análisis de varianza, para la variable de anchos izquierdos testiculares, se determinó que existieron diferencias estadísticas significativas de 0.04, en la tercera medición testicular; por lo que se procedió a determinar las posibles tendencias.

En las tendencias de las medias de los tratamientos observados, según la prueba de Tukey y la variable de anchos testiculares izquierdos (Figura 21), se observó que el tratamiento T3, en su tercera fecha de medición, obtuvo los menores tamaños con una media de 0.95 cm, seguido del T2 con una media de 1.25cm, siendo los menores promedios de medición en esta fecha, respecto a las demás mediciones; a partir de la cuarta medición observamos un ligero incremento de los tamaños, excepto el T5 disminuyendo en tamaño; en la quinta fecha hay una variación, el T4 se mantiene y el T2 disminuye, sin embargo todos los tratamientos se mantienen por debajo del tamaño inicial.

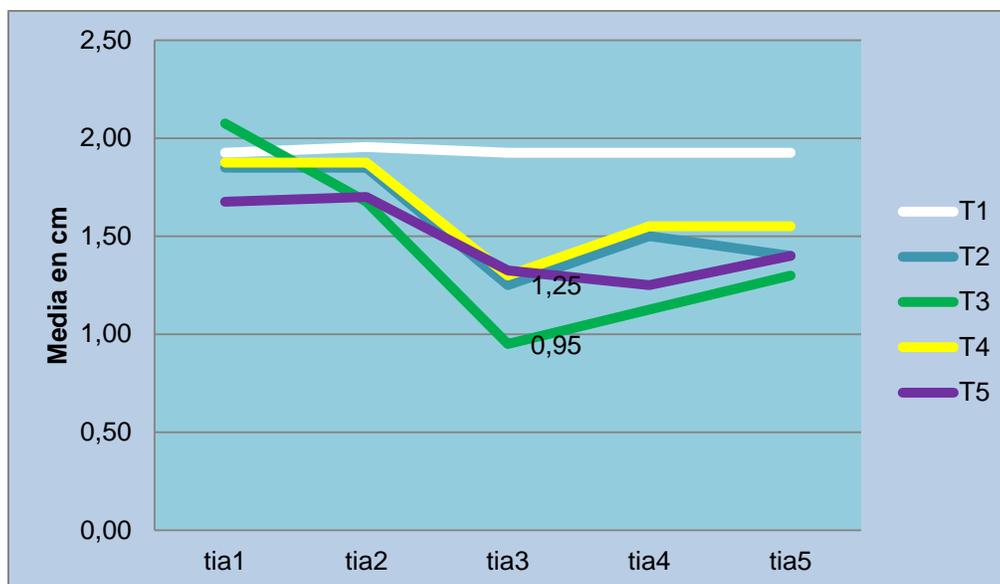


Figura 21. Medias de anchos izquierdos testiculares.

Medias de Anchos testículos izquierdos					
Tratamientos / fechas de medición	tia1	tia2	tia3	tia4	tia5
T1	1.93	1.96	1.93	1.93	1.93
T2	1.85	1.85	1.25	1.50	1.40
T3	2.08	1.68	0.95	1.13	1.30
T4	1.88	1.88	1.30	1.55	1.55
T5	1.68	1.70	1.33	1.25	1.40

Cuadro7: Resumen medias anchos testículos izquierdos.

ANÁLISIS DE TAMAÑOS TESTICULARES

Para los tamaños testiculares analizados, bajo las medias de Tukey, se observó que los tratamientos T3 y T5, presentaron mayor disminución testicular a partir de la tercera medición testicular; esto coincide en que son los dos tratamientos con refuerzo de sus respectivas dosis; los efectos inmunológicos de formación de anticuerpos ante un antígeno, mejoran al estar expuestos a una segunda dosis, por lo que al haber reforzado los tratamientos en el experimento, se obtuvo una mejor neutralización del GnRH endógeno, incidiendo en niveles más bajos de testosterona sérica, obtenidos luego de la aplicación de la vacuna, aunado a una disminución

testicular a partir de la tercera fecha, ésto coincide con lo descrito por Basulto *et al*, (2003), donde afirma que existe un efecto de un preparado vacunal sintético de GnRHm1-TT, sobre la estructura y función testicular.

ANÁLISIS DE VARIANZA Y PRUEBA DE CONTRASTES ORTOGONALES.

Contraste de largos testículos derechos.

Según el análisis de varianza para la variable de largos derechos testiculares, se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas, en sus cinco tiempos de medición testicular, por lo que se procedió a determinar los siguientes contrastes entre los tratamientos.

Estadísticamente, ningún tratamiento produjo un efecto significativo en relación a los tamaños de los largos de los testículos derechos en sus cinco mediciones, usando un nivel de significancia del 5 %. Sin embargo los contrastes TESTIGO vs DOSIS y 2ml vs 2 x 2ml, son los que mayor disminución de los tamaños, de los testículos derecho presentaron en la tercera medición testicular.

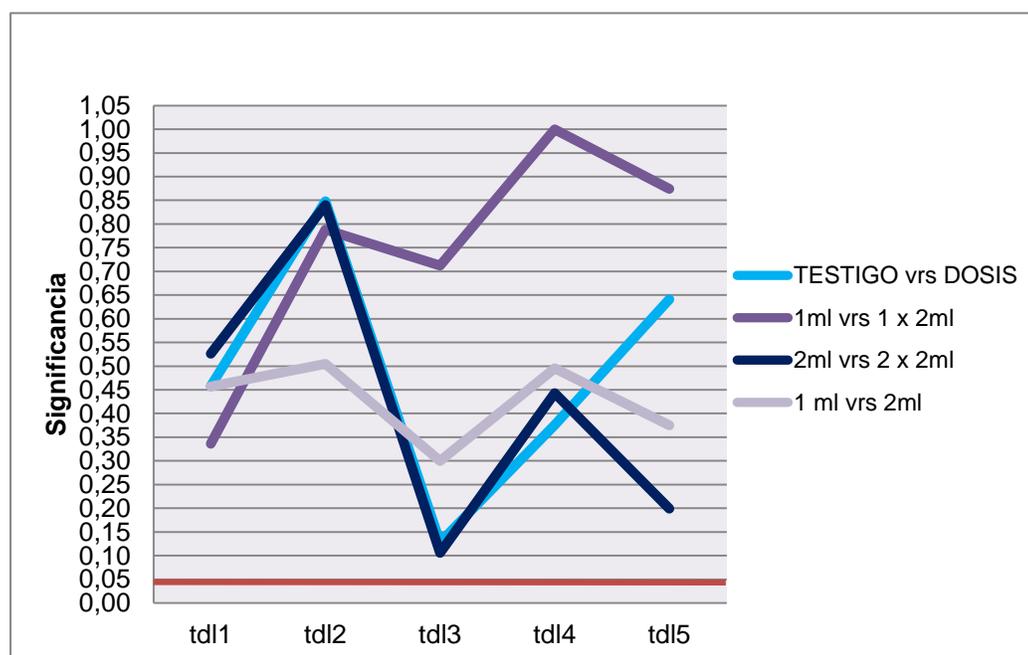


Figura 22. Contrastes de largos derechos testiculares.

Contraste de Largos Testículos derechos					
Contrastes/ fechas de medición	tdl1	tdl2	tdl3	tdl4	tdl5
TESTIGO vs DOSIS	0.46	0.85	0.13	0.38	0.64
1ml vs 1 x 2ml	0.34	0.79	0.71	1.00	0.87
2ml vs 2 x 2ml	0.53	0.84	0.11	0.44	0.20
1 ml vs 2ml	0.46	0.51	0.30	0.50	0.38

Cuadro 8: Contraste de largos testículos derechos.

Contraste de largos testículos izquierdos.

Según el análisis de varianza, para la variable de largos izquierdos testiculares, se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas, en sus cinco tiempos de medición testicular, por lo que se procedió a determinar los siguientes contrastes entre los tratamientos.

Estadísticamente bajo la prueba de contrastes ortogonales (Cuadro 09), tenemos que en la tercera fecha de medición, el contraste 2ml vs 2 x 2ml obtiene una significancia estadística del 0.02, es decir al comparar el efecto de la aplicación de la vacuna análogo de GnRH, hay una marcada disminución en el tamaño de los largos testiculares izquierdos en la fecha tres. Con un nivel de significancia del 5 %.

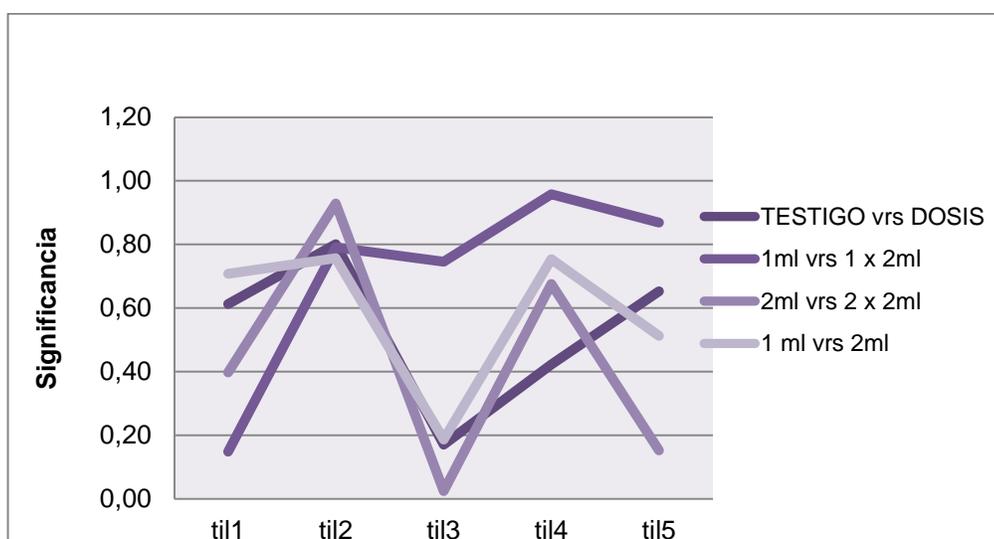


Figura 23. Contrastes de largos izquierdos testiculares.

Contraste de Largos Testículos izquierdos					
Contrastes/ fechas de medición	til1	til2	til3	til4	til5
TESTIGO vs DOSIS	0.61	0.80	0.17	0.42	0.65
1ml vs 1 x 2ml	0.15	0.79	0.75	0.96	0.87
2ml vs 2 x 2ml	0.40	0.93	0.02	0.68	0.15
1 ml vs 2ml	0.71	0.76	0.19	0.75	0.51

Cuadro 9: Contraste de largos testículos izquierdos.

Contraste de anchos testículos derechos

Según el análisis de varianza, para la variable de anchos derechos testiculares, se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas, en sus cinco tiempos de medición testicular, por lo que se procedió a determinar los siguientes contrastes entre los tratamientos.

Estadísticamente bajo la prueba de contrastes ortogonales (Cuadro 10), al comparar el efecto de la aplicación de la vacuna análogo de GnRH, tenemos que en la tercera fecha de medición el contraste: TESTIGO vs DOSIS, tiene una significancia estadística del 0.04, produciendo los mejores efectos en la reducción de los tamaños de los anchos de testículos derechos en la fecha tres. Con un nivel de significancia del 5 %.

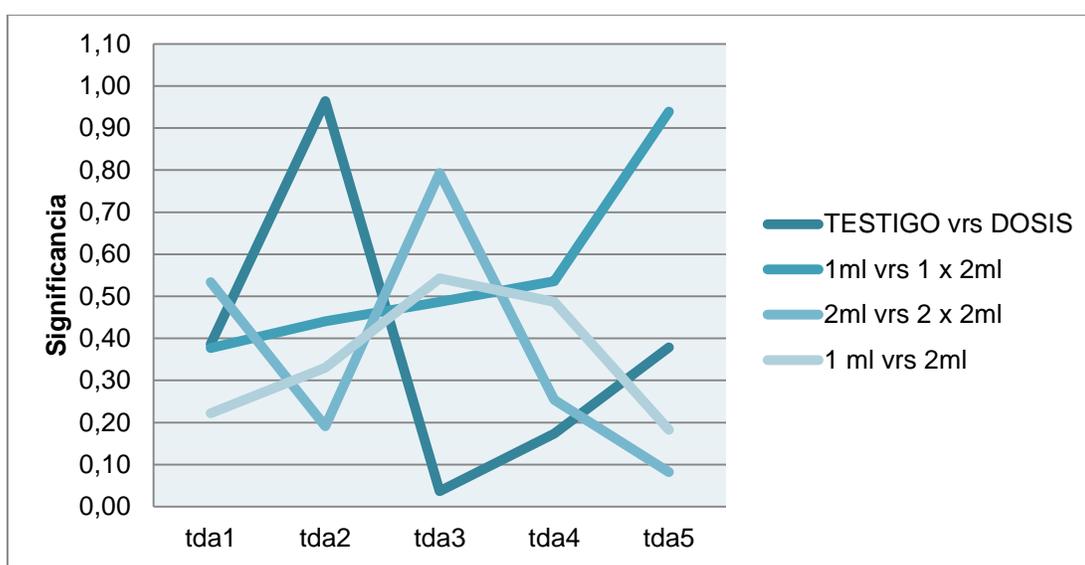


Figura 24. Contrastes de anchos derechos testiculares.

Contraste de anchos Testículos derechos					
Contrastes/ fechas de medición	tda1	tda2	tda3	tda4	tda5
TESTIGO vs DOSIS	0.39	0.96	0.04	0.17	0.38
1ml vs 1 x 2ml	0.38	0.44	0.49	0.54	0.94
2ml vs 2 x 2ml	0.53	0.19	0.79	0.25	0.08
1 ml vs 2ml	0.22	0.33	0.54	0.49	0.18

Cuadro 10: Contraste de anchos testículos derechos.

Contraste de anchos testículos izquierdos.

Según el análisis de varianza, para la variable de anchos izquierdos testiculares, se determinó que existieron diferencias estadísticas significativas de 0.04, en la tercera medición testicular; por lo que se procedió a determinar los siguientes contrastes entre los tratamientos.

Estadísticamente bajo la prueba de contrastes ortogonales (Cuadro 11), tenemos que la tercera, cuarta y quinta fecha de medición el contraste: TESTIGO vs DOSIS, tiene una significancia estadística del 0.01, 0.02 y 0.05 respectivamente; es decir al comparar el efecto de la aplicación de la vacuna análogo de GnRH, existió disminución significativa del tamaño de los anchos testiculares izquierdos, en la fechas tres, cuatro y cinco de medición. Con un nivel de significancia del 5 %.

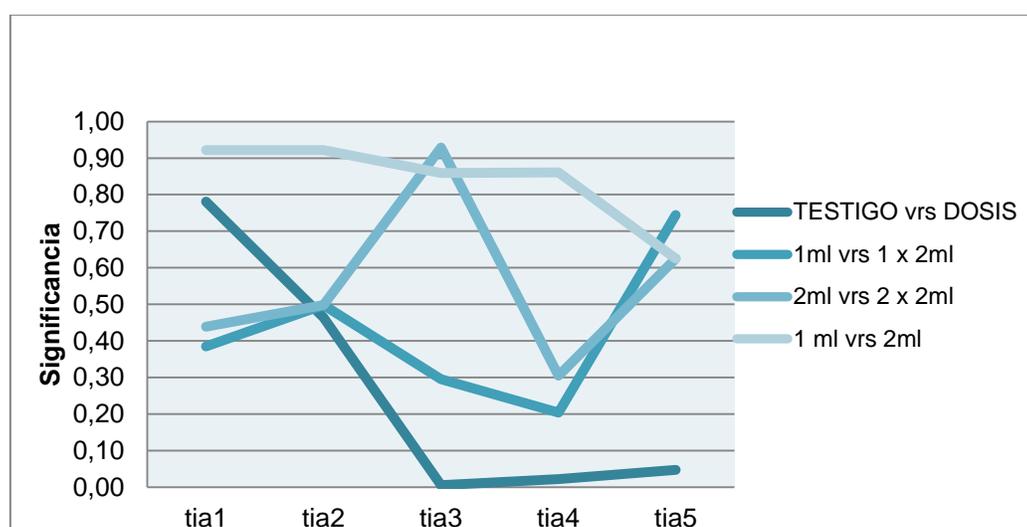


Figura 25. Contrastes de anchos izquierdos testiculares.

Contraste de anchos Testículos izquierdos					
Contrastes/ fechas de medición	tia1	tia2	tia3	tia4	tia5
TESTIGO vs DOSIS	0.78	0.46	0.01	0.02	0.05
1ml vs 1 x 2ml	0.39	0.50	0.30	0.20	0.74
2ml vs 2 x 2ml	0.44	0.50	0.93	0.31	0.63
1 ml vs 2ml	0.92	0.92	0.86	0.86	0.63

Cuadro 11: Contraste de anchos testículos izquierdos.

ANÁLISIS DE CONTRASTES DE TAMAÑOS TESTICULARES.

Según los contrastes obtenidos, entre los tratamientos del estudio en diferentes fechas, estas pruebas estadísticas determinaron la efectividad de los tratamientos en la variable tamaños. Los resultados obtenidos mostraron una alta significancia en anchos y largos testiculares, a partir de la tercera de medición en éstos; esto se puede interpretar, que los menores tamaños testiculares, se alcanzaron luego de la segunda inmunización de la vacuna, estimulando en una mejor inmunoreacción, que produjo una mayor cantidad de anticuerpos anti-GnRH, esto lo describe Tizard 1998, cuando explica que una segunda administración de una toxina o antígeno, generará una mayor concentración sérica de anticuerpos, que subirá con rapidez y se mantendrá por más tiempo; de acuerdo con esto, los anticuerpos formados bloquean la GnRH endógena y su efecto en las otras hormonas de la reproducción y órganos blancos, en este caso los testículos; causando un afección temporal del tejido testicular. Según Hafez (1984), al verse afectada la hormona luteinizante (LH), por la reacción inmunológica anti-GnRH, no puede causar el efecto natural en las células de Leydig, y afectando la secreción de testosterona la cual tiene efecto protagónico en la espermatogénesis. En el 2003 Basulto, *et al*, describen como el efecto de una vacuna contraceptiva, afecto las estructuras testiculares; disminuyendo el diámetro de los túbulos seminíferos en donde se producen los espermatozoides y las demás estructuras testiculares, viéndose disminuido el volumen del tejido testicular. Con esto se concluyó que los resultados obtenidos, según contrastes ortogonales, a partir de un 0.02 obtenido con alta probabilidad estadística, la vacuna generó un efecto altamente significativo en los tamaños testiculares (largos y anchos), a partir

de la tercera fecha de muestreo y se mantuvo altamente significativa, hasta las últimas dos fechas de muestreo en la variable de anchos testiculares.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS DE TESTOSTERONA SÉRICA EN PERROS

Según el análisis de varianza para la variable de niveles de testosterona, se determinó que existieron diferencias estadísticas significativas de 0.02, únicamente en la segunda medición de testosterona, por lo que se procedió a determinar las posibles tendencias.

Estadísticamente se observó bajo la prueba Tukey (figura 26), que las medias de los niveles de testosterona sérica de los tratamientos, en cuatro mediciones a lo largo del experimento, que el tratamiento T5, es el que a partir de la fecha dos, obtiene los mejores efectos en la disminución del nivel de testosterona, por debajo del rango normal, disminuyendo hasta la última medición.

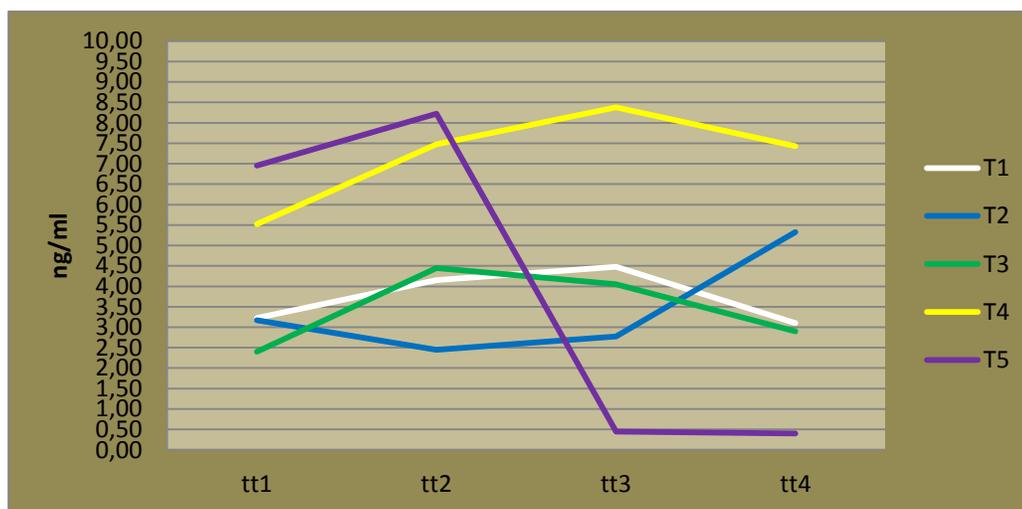


Figura 26. Medias de testosterona.

Medias testosterona en perros				
Tratamientos/ fechas de medición	tt1	tt2	tt3	tt4
T1	3.23	4.15	4.48	3.10
T2	3.18	2.45	2.78	5.33
T3	2.40	4.45	4.05	2.90
T4	5.53	7.48	8.38	7.43
T5	6.95	8.23	0.45	0.40

Cuadro 12: Medias testosterona en perros.

ANÁLISIS DE MEDIAS DE TESTOSTERONA

Se observó, que los tratamientos donde se afectó la función endocrina hipotálamo-hipofisiaria, se disminuyeron los niveles de testosterona, tras la vacunación, generando anticuerpos que neutralizan la función del GnRH endógeno, que sintetiza y secreta en el hipotálamo de forma pulsátil, y que al actuar sobre las células gonadotrópicas de la adenohipófisis, éstas sintetizan y secretan la FSH y LH coincidente con lo que manifiesta Cunningham 2003. Siendo la LH, la encargada de mantener la producción de testosterona (Ptaszynska, 2007); la cual se dirige hacia dentro de los testículos, donde se une a los receptores de membrana de las células de Leydig y estimulando en ellos la conversión del colesterol en testosterona (Hill *et al.* 2006). Al aplicar una dosis y su refuerzo del conjugado sintético de GnRH, siendo más efectivo el tratamiento T5, el cual obtuvo los menores niveles de testosterona, al recibir una dosis de dos ml, más su refuerzo, alcanzando valores altos de anticuerpos anti-GnRH; ya que con la segunda dosis de antígeno o toxina, la respuesta inmune mejora confirmando lo citado por Tizard, 1998. Para las dos primeras mediciones de testosterona, previas a la vacunación, existen diferencias de sus medias entre los tratamientos, las cuales según Santana Cruz, (2011:27), pudieron estar influenciados por la edad del animal y la influencia de las horas de luz.

PRUEBA CONTRASTES ORTOGONALES.

Contraste de niveles de testosterona.

Según el análisis de varianza, para la variable de niveles de testosterona, se determinó que existieron diferencias estadísticas significativas, de 0.02, únicamente en la segunda medición de testosterona, por lo que se procedió a determinar las posibles tendencias.

Estadísticamente, bajo la prueba de contrastes ortogonales (Figura 27), se comparó que entre los tratamientos de 1 ml y el tratamiento de 2 ml, existió una diferencia significativa del 0.01, en la segunda fecha de medición. A partir de la tercera medición y cuarta medición de testosterona el contraste de 2 ml vs 2 x 2 ml, presentó una significancia estadística del 0.01 y 0.03 respectivamente, produciendo los mejores efectos de reducción de los niveles de testosterona, el tratamiento de 2 x 2 ml.

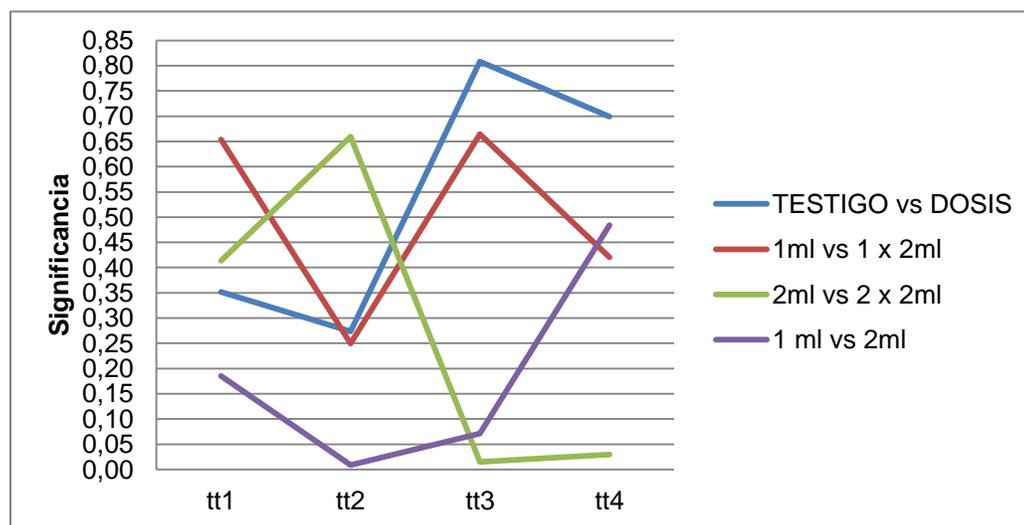


Figura 27. Contraste de niveles de testosterona.

Contrastes de los tratamientos testosterona con las fechas de medición				
Contrastes/ fecha de medición	tt1	tt2	tt3	tt4
TESTIGO vs DOSIS	0.35	0.27	0.81	0.70
1ml vs 1 x 2ml	0.65	0.25	0.66	0.42
2ml vs 2 x 2ml	0.41	0.66	0.01	0.03
1 ml vs 2ml	0.19	0.01	0.07	0.48

Cuadro 13: Contrastes de niveles de testosterona.

ANÁLISIS DE CONTRASTE DE NIVELES DE TESTOSTERONA.

Según la estadística de contrastes ortogonales, entre los niveles séricos de testosterona de cada tratamiento; se obtuvieron resultados con alta significancia, de 0.01 y 0.03 en los 75 días hasta los 90 días post-vacunación respectivamente, entre los tratamientos de 2 ml vs el tratamiento de 2 x 2 ml. Esto se debe al efecto positivo de formación de anti-GnRH, provocado por la vacunación; estos anticuerpos neutralizaron el efecto del GnRH endógeno; de esta manera el GnRH, no llegó a estimular la liberación de las hormonas luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH), que están íntimamente ligada en la secreción de testosterona sérica. Según Hafez (1984), la acción de la LH sobre las células de Leydig, estimula la secreción de testosterona que a su vez Santana Cruz, (2011), describe como esta actúa de manera conjunta con la FSH, sobre las células de Sertoli, donde se da la diferenciación de las células germinales en los túbulos seminíferos; dicho esto se presume que al ser neutralizado el GnRH endógeno, por los anticuerpos y afectar los niveles de testosterona de los perros inmunizados, este descenso de la concentración sérica de testosterona, se asocia con una disminución de la calidad del semen (reducción del volumen del eyaculado, motilidad y viabilidad espermática); lo que demuestra nuevamente, como es necesario que los niveles de esta hormona, se mantengan elevados para la espermatogénesis (Santana Cruz, 2011:29). Al ser el tratamiento 2 x 2 ml, el que posee mayor dosis con refuerzo del preparado vacunal, produce una mayor inmunoreacción, y como resultado una mayor curva de anticuerpos, incidiendo en el desempeño de este tratamiento, que se ve favorecido

según las tablas de medias de las pruebas Tukey, con los menores niveles séricos de testosterona registrados en el experimento.

COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA CON LAS MEDICIONES TESTICULARES

Coeficiente de Correlación de Pearson										
fechas toma de testosterona / fechas toma de tamaño de testículos		tdl3	tda3	til3	tia3		tdl5	tda5	til5	tia5
tt 1	C. correlación	- 0,24845	0,0620 3	- 0,07688	0,0712		- 0,08793	0,15266	- 0,12222	0,0678 2
	Significancia	0,2909	0,795	0,7473	0,7655		0,7124	0,5205	0,6077	0,7763
tt 2	C. correlación	- 0,04722	0,0042 1	- 0,09324	- 0,07018		- 0,14447	- 0,04899	- 0,09289	0,0099 8
	significancia	0,8433	0,9859	0,6958	0,7688		0,5434	0,8375	0,6969	0,9667
vacunación con innosure®										
tt 3	C. correlación	0,58643	0,5558 4	0,75342	0,4721		0,5209	0,66257	0,60261	0,5820 5
	Significancia	0,0066	0,0109	0,0001	0,0356		0,0185	0,0015	0,0049	0,0071
tt 4	C. correlación	0,15982	0,2267 8	0,41847	0,12294		0,31286	0,55025	0,38436	0,3433 6
	Significancia	0,5009	0,3363	0,0663	0,6056		0,1792	0,0119	0,0943	0,1383

Cuadro 14: Coeficiente de Correlación de Pearson.

Según el análisis estadístico por el Coeficiente de Correlación de Pearson (Cuadro 14), se compararon los niveles de testosterona, con el tamaño de los testículos largos y anchos, en el cual existió una correlación altamente significativa tras la vacunación; asumiéndose que al existir menor cantidad de testosterona, existirá menor tamaño testicular, es decir, que existió un grado de asociación positiva; como lo menciona Hafez (1984) y Santana Cruz(2011), que la interrelación de la testosterona con el tamaño testicular, son directamente proporcionales entre uno y otro; el tamaño testicular y los niveles de testosterona, son afectados al aplicar el análogo de GnRH, para la tercera fecha de medición de testosterona, siendo consistente en lo que mencionó Tizard (1998), cuando dice que una segunda aplicación de antígeno o toxina, elevará la curva de anticuerpos obtenida y con una

mayor rapidez; como sucedió en el experimento, ya que la tercera fecha de medición de testosterona, fue luego de la segunda aplicación de la vacuna, obteniendo menores niveles de testosterona. Se ven afectados ambos testículos en la tercera y quinta fecha de medición testicular. En la cuarta fecha de medición de testosterona, únicamente existió correlación altamente significativa, en el ancho del testículo derecho de la quinta medición testicular, con respecto a nivel de testosterona.

PATRONES ETOLÓGICOS

Para estas variables, se observó una disminución en el patrón etológico de la libido, de la medición inicial, comparado al libido final en los tratamientos expuestos a la vacuna; a excepción del tratamiento dos, que mantuvo el mismo parámetro conductual. La agresividad mostro una disminución en los tratamientos con aplicación de la vacuna, siendo más evidente en el tratamiento cinco, con una disminución de 50 %, a excepción del tratamiento cuatro, que mantuvo los mismos niveles de agresividad. Las fugas de casa, disminuyeron en todos los tratamientos expuestos a la vacuna (Figura 28); siendo más evidente en un 50 % en los T3 y T4; según Mir y Fontaine (2012) y Ptaszynska (2007), estos patrones conductuales, están influenciados por secreción de GnRH, la cual al verse alterada en su secreción, modifica la conducta de los perros inmunizados.

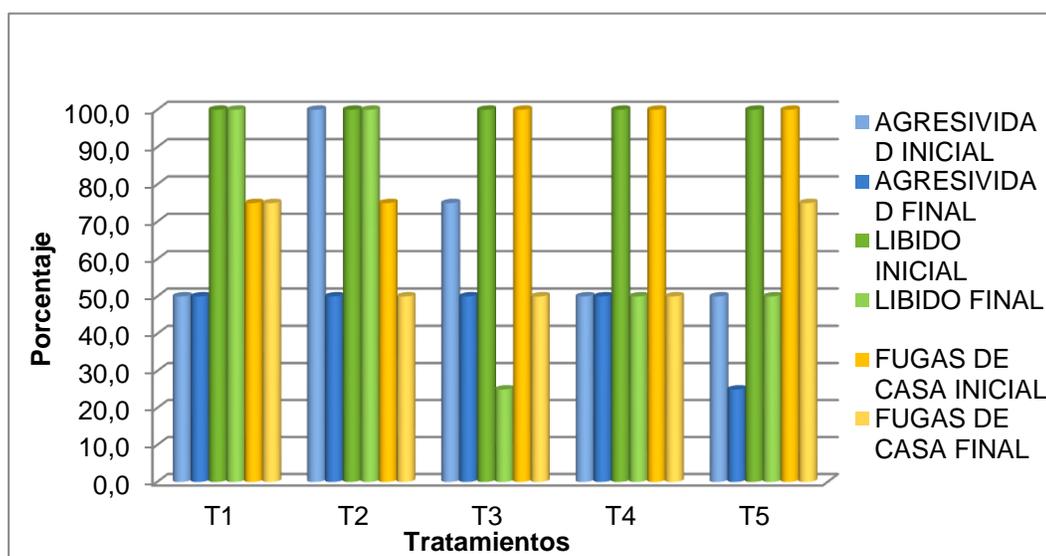


Figura 28. Patrones etológicos.

TRATAMIENTOS	AGRESIVIDAD INICIAL	AGRESIVIDAD FINAL	LIBIDO INICIAL	LIBIDO FINAL	SALIDAS DE CASA INICIAL	SALIDAS DE CASA FINAL
T1	50.0	50.0	100.0	100.0	75.0	75.0
T2	100.0	50.0	100.0	100.0	75.0	50.0
T3	75.0	50.0	100.0	25.0	100.0	50.0
T4	50.0	50.0	100.0	50.0	100.0	50.0
T5	50.0	25.0	100.0	50.0	100.0	75.0

Cuadro15: Patrones Etológicos.

REACCIONES POST-VACUNALES DE LA VACUNA.

PRIMERA VACUNACIÓN.

Las reacciones post vacunación evidenciadas después de la primera vacunación (Figura 29), mostraron un 100 % y 50 % de casos de inflamación local y dolor, respectivamente para el tratamiento T3 y T5, a las 24 horas de aplicación, que corresponden a los animales inmunizados con refuerzo. Para la evaluación a las 72 horas, ambos tratamientos mostraron una reducción total de ambas reacciones.

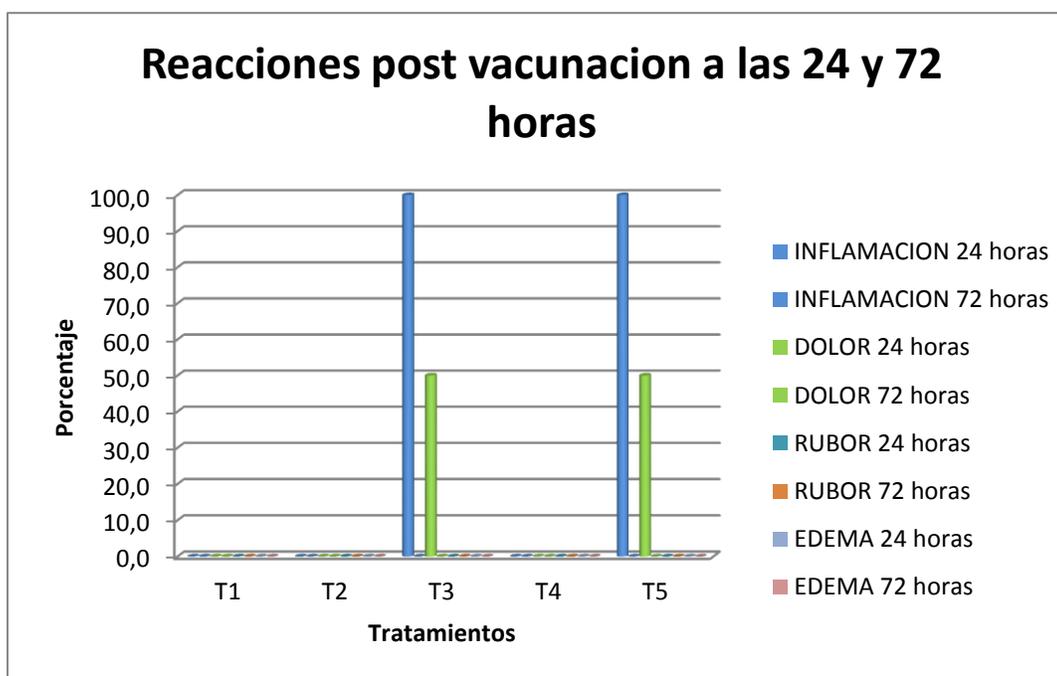


Figura 29. Reacciones post-vacunales de 24 a 72 hrs primera vacunación.

SEGUNDA VACUNACIÓN

Las reacciones post vacunación evidenciadas después de la segunda aplicación (Figura 30), para los animales inmunizados de los diferentes tratamientos, a partir de las 24 horas post vacunación, únicamente los tratamiento T3 y T5, presentaron inflamación en el sitio de punción, siendo más evidente en el T5 con un 50 %, relacionado con la dosis de conjugado GnRH inoculado. La presencia de dolor local únicamente se presentó en el T2, T3 y T5 en las primeras 24 horas, desapareciendo a las 72 horas en el T2 y T5, manteniendo el mismo porcentaje para el T3. Para los casos de edema, únicamente se presentó en el T5 a las 24 horas con un 25 %, el cual tuvo una reducción total a las 72 horas. En este caso (Pfizer, s. f.) describe que el producto puede causar dolor hasta los 42 días post inoculación. Para este estudio, el efecto reactogénico únicamente persistió hasta las 72 horas post vacunación.

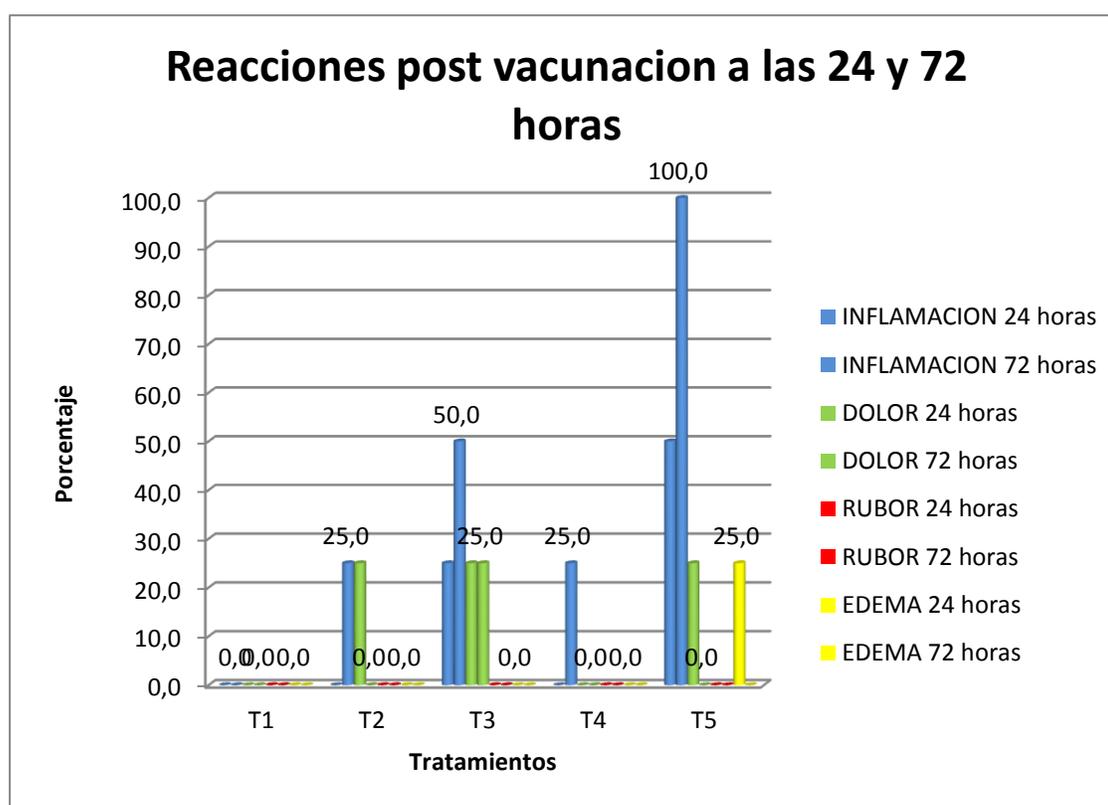


Figura 30. Reacciones post-vacunales de 24 a 72 hrs segunda vacunación.

PESO DE CADA UNIDAD EXPERIMENTAL.

Para la variable peso corporal, todos los tratamientos mostraron una tendencia al incremento del peso, con respecto a la primera medicion antes de la aplicación de la vacuna (Figura 31). Esto se interpreto ,que al existir una disminucion en metabolismo basal, generado por la reducci3n hormonal (testosterona y estr3genos), sugiere un aumento de peso de las unidades experimentales, que seg3n Valera (s. f.), es debido a que la energ3a que consume el individuo por estar vivo, se reduce en torno a un 30 %

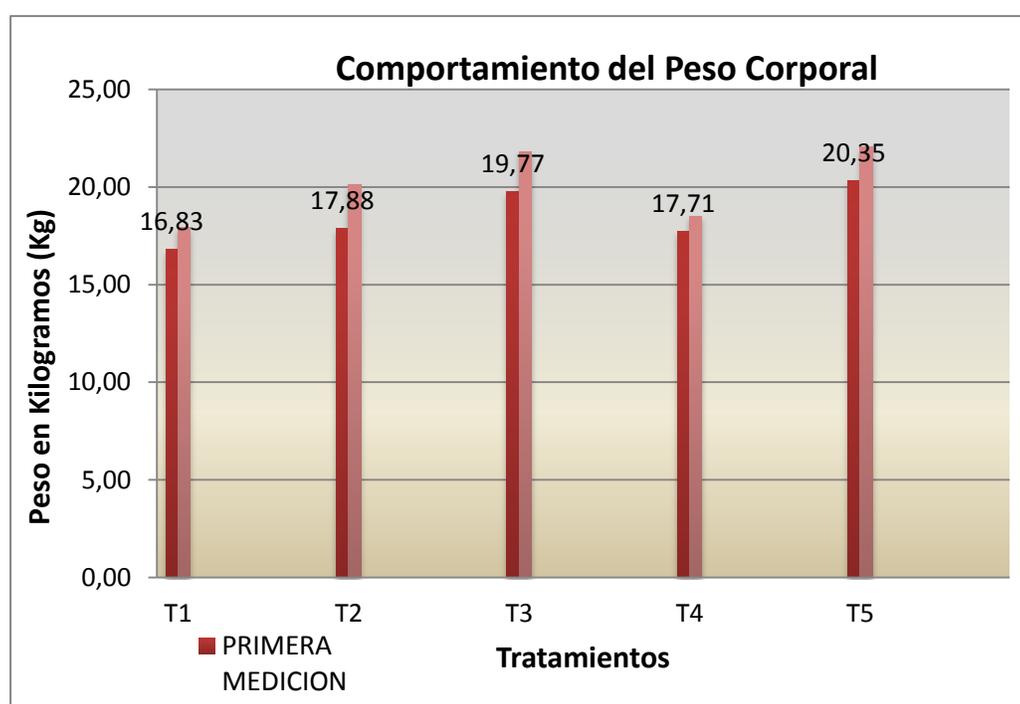


Figura 31. Comportamiento del peso corporal.

8. CONCLUSIONES.

- A partir de la semana 10 post-vacunación, se evidenció una disminución testicular en las dimensiones de largo y ancho, en los tratamientos con refuerzo.
- La relación del efecto inmunógeno provocado por la vacuna, produjo anticuerpos anti GnRH, bloqueando la función de la GnRH endógena.
- Al aplicar la dosis de dos mililitros con refuerzo a las cuatro semanas, causó efectos significativos en la reducción de los niveles séricos de testosterona, influyendo en la función reproductiva. Observando los menores resultados, a partir de las semanas 15 y 16 de la fase de campo del experimento.
- En nuestro país esta vacuna puede ser una alternativa viable, como método de control de poblaciones caninas.
- Al comparar los niveles de testosterona con los tamaños testiculares, existe una relación altamente significativa tras la vacunación, determinando que a menores niveles de testosterona, existirá un menor tamaño testicular en los animales inmunizados, debido a la dependencia de la testosterona en la función y estructura testicular.
- En los animales inmunizados, se observó una reducción en los parámetros etológicos de agresividad, libido y fugas de casa, influenciadas por la reducción de los niveles séricos de testosterona, al verse afectada la GnRH endógena por una respuesta inmunológica, siendo la testosterona la responsable del comportamiento sexual.

9. RECOMENDACIONES

- En futuras investigaciones, realizar mediciones y repeticiones con intervalos de tiempo más cortos, en la evaluación de los niveles séricos de testosterona, a lo largo de una investigación.
- Evaluar el comportamiento de la curva de anticuerpos anti GnRH, que produce esta vacuna con dosis de dos mililitros con refuerzo a lo largo del tiempo; para determinar la duración del efecto de la castración inmunológica.
- Realizar una evaluación espermática, para medir los efectos de vacuna a base de péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico, sobre la espermatogénesis de la especie en estudio.
- Contemplar un estudio histológico del tejido testicular en investigaciones de esta naturaleza, para observar cambios estructurales a nivel microscópico.
- Desarrollar una investigación en caninos hembras, usando esta vacuna, evaluando el comportamiento sexual y niveles hormonales de la LH, FSH y/o GnRH.
- A las autoridades encargadas de la Salud Pública que realicen esfuerzos para el desarrollo de investigaciones en este tipo de biotecnologías para control poblacional, como métodos de carácter ético y humanitario en especies de interés en Salud Pública.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) **Amatayakul-Chantler, S; Jackson, JA; Stegner, J; King, V; Rubio, LMS; Howard, R; Lopez, E; Walker, J. 2012.** Immunocastration of Bos indicus x Brown Swiss bulls in feedlot with gonadotropin-releasing hormone vaccine Bopriva provides improved performance and meat quality (en línea). Journal of animal science. Consultado 25 abr. 2013. Disponible en: <http://www.journalofanimalscience.org/content/90/11/3718>

- 2) **ARC (The Alliance for Rabies Control, UK); Humane Society International (US); IFAW (International Fund for Animal Welfare, US); RSPCA (Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals International, UK); World Small Animal Veterinary Association (CA); WSPA (The World Society for the Protection of Animals, UK). s. f.** Guía para el manejo humanitario de poblaciones caninas coalición internacional para el manejo de animales de compañía (en línea). s. n. t. Consultado 19 may. 2013. Disponible en: http://www.icam-coalition.org/downloads/Guia_Para_El_Manejo_Humanitario_de_Poblaciones_Caninas_Spanish.pdf

- 3) **Basulto, R; Milanés, C; Rojas, A; Fuentes, F; Izquierdo, N; Bertot, JA; Hernández, H; Sanchez, D; Calzada, L; Junco, J. 2003.** Efectos de la inmunización contra GnRH sobre la estructura y función testicular en perros adultos (en línea). Camagüey, CU. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. v. 20. Consultado 12 may. 2013. Disponible en: <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/BA/2003/20/1/BA002001020-024.pdf>

- 4) **Burchard Señoret, L. 2005.** Control canino (diapositiva). Calama, CL. 435 diapositivas.

- 5) **Campbell, TA; Garcia, MR; Miller, LA; Ramirez, MA; Long, DB; Marchand, JB; Fergal Hill, MB. 2010.** Immuncontraception in male feral swine treated with a recombinant gonadotropin-releasing hormone vaccine (en línea). Journal of Swine Health and Production. Consultado 17 abr. 2013. Disponible en:
http://www.aphis.usda.gov/wildlife_damage/nwrc/publications/10pubs/campbell104.pdf
- 6) **CEFUTREMA (Control Ético de la Fauna Urbana y Tenencia Responsable de Mascotas, MX). s. f.**La sobrepoblación de mascotas caninas. S. n. t. Consultado 24 jul. 2013. Disponible en:
<http://www.cefutrema.org.mx/archivos/Tallersobrepoblacion.pdf>
- 7) **Cunningham, JG. 2003.** Fisiología veterinaria: Fisiología reproductora del macho. 3 ed. Madrid, ES. ELSEVIER. 374-379, 421-427 p
- 8) **Diagnostic Automation. 2009.** Testosterone: Enzyme immunoassay for the quantitative determination of testosterone concentration in human serum. s. n. t. Consultado 03 jun. 2013. Disponible en:
http://www.diagnosticaautomation.com/PDF/ELISA/Steroid/Testosterone_2095Z%20_10-10-2009_.pdf
- 9) **DIGESTYC (Dirección General de Estadística y Censos, SV). 2013a.** VI Censo de población y V de vivienda 2007 (en línea). Ministerio de Economía. San Salvador, SV. Consultado 16 ago. 2013. Disponible en:
<http://www.censos.gob.sv/util/datos/Resultados%20VI%20Censo%20de%20Poblaci%C3%B3n%20V%20de%20Vivienda%202007.pdf>
- 10) **DIGESTYC (Dirección General de Estadística y Censos, SV). 2013b.** Pirámides poblacionales del 2013 (en línea).S. n. t. Consultado 18 ago. 2013. Disponible en:
http://www.salud.gob.sv/archivos/piramides2013/p_san_salvador2013.pdf

- 11) **DLV Laboratorio veterinario. s. f.** Hormona: Testosterona. *s. n. t.* Consultado 22 may. 2013. Disponible en: http://www.dvlaboratorioveterinario.com/fileadmin/user_upload/tecnicas_protocolos/hormonas.pdf
- 12) **Donovan, CE. 2013.** Applications of GnRH Immunization in Domestic Dogs. Tesis Master of Science. Oregon, US. Oregon State University. 1-3 p.
- 13) **Donovan, CE; Grossman, JL; Patton, KM; Lamb, S; Bobe, G; Kutzler, MA. 2013.** Effects of a Commercial Canine Gonadotropin Releasing Hormone Vaccination on Intact Male Llamas and Alpacas (en línea). Journal of Vaccines. Hindawi Publishing Corporation. Oregon. US. Consultado 7 may. 2013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/181834>
- 14) **EMA (Agencia Europea de Medicamentos). s. f.** FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO (en línea). *s. n. t.* Consultado 12 may. 2013. Disponible en <http://www.ema.europa.eu/>.
- 15) **Frandsen, RD; y Whitten, EH. 1984.** Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Trad. VA, Armer. 3 ed. Mexico. Interamericana. 421-422 p.
- 16) **Guía operativa eventos transmisibles de origen zoonótico. 2011.** Bogotá, CO. Consultado 14 may. 2013. Disponible en: http://saludpublicabogota.org/wiki/images/4/49/GO_eventos_transmisibles_de_origen_zoonotico.pdf
- 17) **Hafez, ES. 1984.** Reproducción e inseminación Artificial en animales: Endocrinología de la reproducción. 4 ed. Trad. FM, Berenguer Ibarro. MX. Interamericana. 84-93 p.

- 18) **Hill, RW; Wyse, GA; Anderson. 2006.** Fisiología animal: Reproducción. Trad. Medica Panamericana. Madrid, ES. Panamericana. 511-516 p.
- 19) **Innpulso. 2011.** Vacuna de Inmunicación dentro de lo mejor de la ciencia chilena en 2010(en línea). s. n. t.Consultado 12 may. 2014. Disponible en:<http://www.innpulso.cl/vacuna-de-inmunicacion-dentro-de-lo-mejor-de-la-ciencia-chilena-en-2010/>
- 20) **Intervet. 1999.** Compendium de reproducción animal: Reproducción canina. 3 ed. Intervet. 130 p.
- 21) **Kutzler, M. 2013.** Métodos utilizados para medir la capacidad de respuesta inmune a la vacuna anticonceptiva en los perros (correo electrónico). San Salvador, SV. s. e.
- 22) **Lara Ascencio, F. 2013.** Diseño estadístico para anteproyecto de investigación (entrevista). San Salvador, SV. Facultad de Ciencias Agronómicas/Universidad de El Salvador.
- 23) **Matamoros, R; Gomez, C; Andaur, M. 2002.** Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria (en línea). Temuco, CL. Universidad Católica de Temuco. Consultado 29 may. 2013. Disponible en: <http://mingaonline.uach.cl/pdf/amv/v34n2/art03.pdf>
- 24) **MINSAL (Ministerio de Salud/Unidad de Salud Ambiental, SV). 2013a.** Casos de rabia humana y animal, años 2008 a 2013. San Salvador, SV.
- 25) **MINSAL (Ministerio de Salud/Unidad de Salud Ambiental/Área de zoonosis, SV). 2013b.** Población estimada de perros a nivel nacional y regional/Dosis de rabia utilizada en campañas antirrábicas y Datos estadísticos de rabia en humanos y animales. San Salvador, SV. s. p.

- 26) **MINSAL (Ministerio de Salud, SV); OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. 2003.** Evaluación del programa nacional de rabia de el salvador (en línea). Ministerio de Salud y Asistencia Social de El Salvador. Dirección de Control y Vigilancia Epidemiológica. Unidad de Zoonosis. Consultado 15 may. 2013. Disponible en: <http://www1.paho.org/cdmedia/hdmvp01/docs.rabia/paises/EVAL.RABIA.ELSA LVADOR.pdf>
- 27) **Mir, F; Fontaine, E. 2012.** Agonistas de la GnRH como alternativa a la esterilización quirúrgica (en línea). ARGOS. Paris, FR. Consultado 22 abr. 2013. Disponible en: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/7656/ARTICULOS-ARCHIVO/Agonistas-de-la-GnRH-como-alternativa-a-la-esterilizacion-quirurgica.html>
- 28) **Muñoz Rojas, MA; Vargas Rodríguez, IM; Soler-Tobar, D. 2011.** Métodos para el control de poblaciones caninas. Revista Sapuvet de Salud Pública. Consultado 15 jun. 2013. Disponible en: www.researchgate.net/...For...Control.../32bfe511ebce8a49f6.pdf
- 29) **Nelson, R.; Couto, G. 2000.** Manual de medicina interna de animales pequeños: testosterona. ed. C. King. 2 ed. Ohio. ES. Harcourt. 541 p
- 30) **NWRC (National Wildlife Research Center, US). 2013.** Development of Injectable and Oral Contraceptive Technologies and Their Assessment for Wildlife Population and Disease Management: GonaCon™ New GnRH Single Shot. Consultado 11 may. 2013. Disponible en: http://www.aphis.usda.gov/wildlife_damage/nwrc/research/reproductive_control/

- 31) **OIE (Organización Mundial de Salud Animal, FR). 2010.** El control de las poblaciones de perros vagabundos (en línea). Consultado 2 abr. 2013. Disponible en:http://web.oie.int/esp/normes/mcode/es_chapitre_1.7.7.pdf
- 32) **Orellana, GS. 2013.** Ministerio de Salud lanza campaña de vacunación contra la rabia (en línea). Diario Co Latino. San Salvador, EV. Consultado 08 jun. 2013. Disponible en:
<http://www.diariocolatino.com/es/20130209/nacionales/112589/Ministerio-de-Salud-lanza-Campa%25C3%25B1a--de-Vacunaci%25C3%25B3n-contr-la-Rabia.htm>
- 33) **Parra, A. 2012.** Tenencia responsable de mascotas (diapositiva). Unidad de Zoonosis y Vectores. Departamento de Salud Ambiental. Subsecretaría de Salud Pública. Ministerio de Salud. Chile. 29 diapositivas.
- 34) **Pfizer. s f.** Ficha técnica o resumen de las características del producto(en línea). S. n. t. Consultado 21 ago. 2013. Disponible en:http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000136/WC500064060.pdf
- 35) **Ptaszynska, M. 2007.** Compendio de Reproducción Animal. 9 ed. Asunción, PY. Intervet-Senervia. 283-284 p.
- 36) **Radostits, OM; Clive, GC; Arundel, JH; Blood, DC; Hinchcliff, KW. 2002.** Medicina Veterinaria tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, equino, caprino: Rabia. 9 ed. Madrid, ES. McGraw-Hill Interamericana. V. 2, 1425 p.
- 37) **Richard, BF. 2004.** Vacunas y Vacunaciones: Vacunas recombinantes. Trad. RG, Seeber. AR. McGraw-Hill Interamericana. 11-12, 95 p.

- 38) **Sáenz Iturriaga, L. 2012.** Estrategias Inmunológicas para el control de la población canina (en línea). Centro Biotecnológico BIOVETEC. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias FAVET. Universidad de Chile. CL. Consultado 14 may. 2013. Disponible en: http://www.sag.cl/sites/default/files/3_I_saenz.pdf
- 39) **Salcedo, A. 2000.** Los perros de la calle (en línea). El Diario de Hoy. San Salvador, SV. Consultado 12 may. 2013. Disponible en: <http://www.elsalvador.com/noticias/EDICIONESANTERIORES/2000/NOVIEMBRE/noviembre15/NACIONAL/nacio16.html>
- 40) **Santana Cruz, MM.2011.** Efectos de variantes aplicadas a los procedimientos tecnológicos en la conservación seminal en la especie canina. Tesis doctoral. Las Palmas, ES. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 249 p.
- 41) **Serrano, H; Gómez Olivares, JL; Mendieta, E; Salame, A; García Suárez, MD. 2010.** Estrategias de control de población canina (en línea). Ciencia en la frontera: Revista de ciencia y tecnología de la UACJ. MX. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez v. 8, 21-31 p. Consultado 21 may. 2013. Disponible en: <http://www.uacj.mx/difusion/publicaciones/Documents/ciencias%20de%20la%20frontera/CIENCIAENLAFRONTERAVOL8n%C3%BAm2.pdf>
- 42) **SUIZAVET. s. f.** Hormonas: Testosterona (en línea). s. n. t. Consultado 22 may. 2013. Disponible en: <http://www.suizavet.com/manuales/hormonas.pdf>
- 43) **Tizard, IR. 1998.** Inmunología Veterinaria: Las defensas del cuerpo. 5 ed. Trad. M.E. Ariaza. México. McGraw-Hill Interamericana. 4-7 p.
- 44) **Valera, MA. s. f.** Reproducción canina (en línea). s. n. t. Consultado 12 may. 2014. Disponible en: <http://www.centauroveterinarios.com/tienes/reproduccionCanina.pdf>

- 45) **Waite, KL. 2006.** Generation of a FHV-1 Viral Vaccine Against Gonadotropin Releasing Hormone for Immunocontraception of Felines. Tesis Master of Science In Biomedical and Veterinary Sciences. Oregon, US. Virginia State University. 81 p.

11. ANEXOS.

Anexo 1. Casos de rabia confirmados en humanos y animales, años 2008 a 2013, El Salvador.

ESPECIE	2008	2009	2010	2011	2012	2013*
Humano	1	0	0	0	0	0
Canino	42	18	5	2	2	1
Felino	4	10	7	1	2	1
Bovino	7	18	8	0	9	3
Equino	0	0	0	0	0	0
Caprino	1	0	2	1	0	0
Ovino	0	0	1	0	0	0
Porcino	2	1	1	0	2	0
Murciélago	0	2	0	0	0	0
Coyote	0	1	0	0	0	0
Hámster	0	0	0	0	0	0
Mapache	0	0	0	0	0	0
TOTAL	57	50	24	4	15	5

***Hasta semana epidemiológica 25.**

Fuente: Laboratorio de Referencia Nacional, MINSAL y Laboratorio de Diagnostico Veterinario, MAG. El Salvador 2013.

Anexo 2. Hojas de control.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA



“Evaluación en la eficacia de péptido sintético análogo del GnRH con toxoide diftérico como método contraceptivo en *Canis lupus familiaris* machos en el cantón de Primavera, municipio de Santa Ana, departamento de Santa Ana, El Salvador”.

Hoja resumen para toma de muestra				Página 1/4
Tipo de muestra: SANGRE CANINA				
ANIMAL	FECHA DE TOMA DE MUESTRA: (D/M/A)	CANTIDAD (ml)	RESULTADO	OBSERVACIONES
Tratamiento 1 (Control)				
01				
02				
03				
04				
Tratamiento 2 (1ml una aplicación)				
05				
06				
07				
08				
Tratamiento 3 (1ml dos aplicaciones)				
09				
10				
11				
12				
Tratamiento 4 (2ml una aplicación)				
13				
14				
15				
16				
Tratamiento 5 (2ml dos aplicaciones)				
17				
18				
19				
20				

Hoja individual de control; TRATAMIENTO No: _____				
Can No. _____	Fecha primera dosis _____	ml _____	Fecha segunda dosis _____	ml _____
		DATOS GENERALES		
		Raza: <input type="checkbox"/> Mixta <input type="checkbox"/> Otra:	Sexo: <input checked="" type="checkbox"/> Macho	<input checked="" type="checkbox"/> Entero
		Color:	Edad (meses):	Peso (Kg):
Nombre: _____		Propietario: _____		
Lugar: Cantón Primavera Santa Ana		Departamento: Santa Ana		municipio: _____
MEDICIÓN Y RESULTADOS				
A) TESTOSTERONA SÉRICA:		Resultados obtenidos por ELISA:		
1	Fecha: (d/m/a)	_____ng/ml		
	Toma de muestra de sangre (ml):			
2	Fecha d/m/a:	_____ng/ml		
	Toma de muestra de sangre (ml):			
3	Fecha: (d/m/a)	_____ng/ml		
	Toma de muestra de sangre (ml):			
4	Fecha: (d/m/a)	_____ng/ml		
	Toma de muestra de sangre (ml):			
B) MEDICIÓN DE TAMAÑO TESTICULAR				
1	Día / mes / año: _____		; semana: _____	
	Testículo Derecho Largo (cm):	Testículo Derecho Ancho(cm):		
	Testículo Izquierdo Largo (cm):	Testículo Izquierdo Ancho (cm):		
2	Día / mes / año: _____		; semana: _____	
	Testículo Derecho Largo (cm):	Testículo Derecho Ancho(cm):		
	Testículo Izquierdo Largo (cm):	Testículo Izquierdo Ancho (cm):		
3	Día / mes / año: _____		; semana: _____	
	Testículo Derecho Largo (cm):	Testículo Derecho Ancho(cm):		
	Testículo Izquierdo Largo (cm):	Testículo Izquierdo Ancho (cm):		
4	Día / mes / año: _____		; semana: _____	
	Testículo Derecho Largo (cm):	Testículo Derecho Ancho(cm):		
	Testículo Izquierdo Largo (cm):	Testículo Izquierdo Ancho (cm):		
5	Día / mes / año: _____		; semana: _____	
	Testículo Derecho Largo (cm):	Testículo Derecho Ancho(cm):		
	Testículo Izquierdo Largo (cm):	Testículo Izquierdo Ancho (cm):		
Observaciones:				

ANAMNESIS

INFORMACIÓN BÁSICA

NOMBRE: _____ **edad:** _____ **color:** _____

Carácter: Social ___ Agradable ___ Miedoso ___ Agresivo ___

ACTITUD: alerta ___ activo ___ nervioso ___ sumiso ___

Procedencia: casa callejero se desconoce

Peso: _____ kg.

Condición corporal: muy delgado delgado ideal sobrepeso obeso

Pelo/piel: seco normal graso

Presencia de ectoparásitos: SI ___ NO ___, de que tipo _____

SIGNOS VITALES:

Frecuencia cardíaca _____/min. Frecuencia respiratoria _____/min.

Temperatura corporal _____ ° C. Tiempo de llenado capilar _____ seg.

Mucosa oral: _____

Mucosa conjuntival: _____

CONTROL DE VACUNAS: SI ___ NO ___;

Cuales _____

Frecuencia de vacunación: una vez al año _____ otro _____

CONTROL DE DESPARASITACION: SI ___ NO ___

Frecuencia de desparasitación: una vez al año _____ dos veces al año _____

Tres veces al año _____ otro _____

Producto: _____

HA SUFRIDO ENFERMEDADES

Observaciones:

MEDIO AMBIENTE

Convive con otros animales: SI___ NO___, cuales: _____

Lugar donde duerme: dentro de la casa_____ Fuera de la casa_____ Otro lugar_____

Sale de la casa: SI___ NO___

Convive o tiene contacto con perros de la calle: SI___ NO___

CLIMA: frio___ caluroso___ templado _____

Observaciones:

ALIMENTACIÓN

Tipo de alimentación: Concentrado_____ Comida casera_____ Mixto_____

Otro_____

Frecuencia de alimentación: una vez al día_____ dos veces al día_____ tres veces al día_____ otro_____ Cantidad de alimento ofrecido: _____

Origen del agua de bebida: potable_____ pozo_____ captación _____ otro_____

Disposición: a libre consumo_____ por cantidad_____, que cantidad_____

Observaciones:

REPRODUCCIÓN

Ha concebido camadas: SI___ NO___

Hace cuanto: en el último celo_____ Mas de 6 meses_____ Mas de 12 meses_____ No sabe_____

Se estimula recientemente con los celos de perras: SI___ NO___

Reacción de la estimulación de masaje del pene:

Excelente_____ Muy Bueno_____ Bueno _____ Poco_____ Nada_____

Apariencia de testículos:

Normales___ Asimetricos ___ Hipoplasicos ___ Hiperplasicos _____

Observaciones:

Anexo 4.Resultado de niveles de testosterona sérica por medio de ELISA.

MEDICION DE TESTOSTERONA PRE Y POS VACUNACION						
Tratamientos	No. de identificación	Nombre	fechas pre vacunación		fechas post vacunación	
			14 de feb 2014	02 de abril 2014	16 de jun 2014	02 de jul 2014
			ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
T1	CONTROL	7 Duke	5.6	5.7	5.9	2.2
		11 Cariñito	1.0	4.5	1.0	3.5
		13 Chester	1.4	0.5	4.5	2.9
		16 Caballito	4.9	5.9	6.5	3.8
T2	1 ml	3 Oso (A)	1.9	1.7	0.4	1.4
		4 Terry (A)	4.3	3.5	3.1	6.8
		5 Gufi	5.1	3.5	7.5	13.1
		6 Punki	1.4	1.5	0.1	0
T3	1 mlx2	2 Negro	0.5	3.1	6.4	2.4
		9 Terry (B)	1.2	5.0	0.2	0.8
		10 Collar de Plata	4.9	8.1	1.4	1.4
		21 Ranger	3.0	1.6	8.2	7.0
T4	2 ml	8 Rocky	9.8	8.0	13.1	15.0
		12 Terry (C)	2.2	8.7	15.6	4.3
		19 Poppy (A)	4.7	5.5	4.0	10.1
		20 Tayson	5.4	7.7	0.8	0.3
T5	2 mlx2	1 Sereno	3.6	10.6	0.2	0.7
		14 Peluche	9.2	3.9	0.5	0.2
		15 Poppy (B)	6.8	7.7	0.3	0.4
		17 Oso (B)	8.2	10.7	0.8	0.3

Anexo 5. Pruebas estadísticas de tamaño testicular en perros prueba Tukey, por el programa SAS.

Largos derechos testiculares

Rango Estandarizado de Tukey (HSD) Prueba para tdl1

(Medias con la misma letra no son significativamente diferentes)

AgrupaciónTukey	MEDIA	N	TRATAMIENTO
A	4.2250	4	5
A	3.9500	4	3
A	3.8000	4	4
A	3.4250	4	1
A	3.3000	4	2

El sistema SAS

Anexo 6. Análisis de varianza y prueba de contrastes ortogonales, por el programa SAS.

El Procedimiento GLM

Contraste de largos testículos derechos

Variable Dependiente: tdl1					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Value	Pr > F
Modelo	4	2.30300000	0.57575000	0.67	0.6220
Error	15	12.86500000	0.85766667		
Total corregido	19	15.16800000			

R-cuadrado	Coficiente de variación	Raíz MSE	Media tdl1
0.151833	24.76211	0.926103	3.740000

Contraste	DF	Contraste SS	Cuadrado medio	F Value	Pr > F
TESTIGO vs DOSIS	1	0.49612500	0.49612500	0.58	0.4587
1ml vs 1x2ml	1	0.84500000	0.84500000	0.99	0.3367
2ml vs 2x2ml	1	0.36125000	0.36125000	0.42	0.5262
1ml vs 2ml	1	0.50000000	0.50000000	0.58	0.4570

El sistema SAS

Anexo 7. Análisis de varianza y prueba de contrastes ortogonales, por el programa SAS.

Testosterona 1 (tt1)

El Procedimiento GLM

Variable Dependiente: tt1

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Value	Pr > F
Model	4	58.1770000	14.5442500	2.54	0.0836
Error	15	86.0325000	5.7355000		
Total corregido	19	144.2095000			

R-cuadrado	Coeficiente de variación	Raíz MSE	Media tdl1
0.403420	56.28415	2.394890	4.255000

Contraste	DF	Contraste SS	Cuadrado medio	F Value	Pr > F
TESTIGO vs DOSIS	1	5.30450000	5.30450000	0.92	0.3515
1ml vs 1x2ml	1	1.20125000	1.20125000	0.21	0.6538
2ml vs 2x2ml	1	4.06125000	4.06125000	0.71	0.4133
1ml vs 2ml	1	11.04500000	11.04500000	1.93	0.1855

El sistema SAS

Anexo 8. Inserto de vacuna Innosure®.



Innosure®



484090016



Vacuna para la eliminación del olor sexual en la carne de cerdos machos y método alternativo a la castración quirúrgica.

**Para uso en cerdos únicamente
Solución inyectable
USO VETERINARIO**

BENEFICIOS Y VENTAJAS DEL PRODUCTO:

Innosure® elimina las sustancias responsables del olor sexual en la carne de cerdos machos: la androstenona y el escatol. Este efecto se logra cuatro semanas después de una segunda vacunación y mediante un efecto inhibitorio sobre el factor de liberación de gonadotropinas (GnRF). Innosure®: es preparado a partir de un análogo del GnRF ligado a una proteína transportadora. Es auxiliado con un adyuvante sintético acuoso para incrementar el nivel y duración de la inmunidad. Cada dosis de vacuna contiene 0.4 mg del conjugado de GnRF modificado + Toxoide de Difteria.

Los cerdos machos vacunados con Innosure® ofrecen las ventajas del crecimiento natural de los machos enteros tales como:

- Mejor eficiencia alimenticia y mejor conversión de alimento a carne.
 - Menos grasa y más músculo: más magredad en la canal.
 - Tasas adecuadas de crecimiento
- Adicionalmente, la vacuna permite los siguientes beneficios:
- Ningún olor sexual en la carne
 - Reducción de comportamiento sexual después de la segunda vacunación.
 - Mejor bienestar animal.
 - Menor producción de efluentes al medio ambiente en virtud de la mejor conversión alimenticia.

Instrucciones: Cada dosis consiste en 2 ml. De vacuna. Los cerdos machos enteros deben recibir dos dosis cumpliendo el siguiente protocolo: la primera dosis debe administrarse cuatro (4) semanas antes de la segunda dosis y la segunda dosis debe administrarse cuatro (4) a seis (6) semanas antes del sacrificio de los cerdos.

Ejemplo: si los cerdos son enviados a sacrificio a las 23 a 25 semanas de edad; la primera dosis debe aplicarse a las 15 semanas de edad y la segunda dosis debe aplicarse a las 19 semanas de edad.

Dos semanas antes de enviar los cerdos a sacrificio debe hacerse una inspección visual; el cerdo que presente comportamiento de monta frecuente deberá recibir una dosis adicional de 2 ml. y debe ser enviado a sacrificio cuatro (4) semanas después de esta última vacunación. Esto puede ocurrir por un error humano al no aplicar correctamente a un cerdo la primera ó la segunda dosis.

Via de administración: Subcutánea, en la base del cuello detrás de la oreja.

ADVERTENCIA: La inyección accidental en humanos puede afectar la fertilidad y el embarazo en las mujeres. Este producto no debe ser manipulado por mujeres en estado de embarazo. En caso de una inyección accidental se recomienda consultar al médico inmediatamente.

Esta vacuna está contraindicada en cerdos destinados a reproducción. Manténgase fuera del alcance de los niños, animales domésticos y personas discapacitadas.

Almacénese a temperaturas entre 2°C y 8 °C. No debe congelarse.

Venta bajo fórmula de Médico Veterinario.

PRECAUCIONES:

1. Almacene de 2° a 8° C. La exposición prolongada a temperaturas más elevadas puede afectar adversamente la potencia. No congele.
2. Utilice los contenidos completos una vez abierto el producto.

3. Puede haber inflamación después de la vacunación y en una proporción pequeña de los cerdos, lo cual puede durar varias semanas antes de disminuir gradualmente.

4. Manténgase fuera del alcance de los niños, animales domésticos y personas discapacitadas. Este producto ha demostrado ser eficaz en animales sanos.

Si los animales están incubando una enfermedad infecciosa, son mal alimentados o tienen parásitos, están tensos debido al transporte o las condiciones ambientales, o de algún otro modo inmunocomprometidos, o la vacuna no es administrada de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta, puede ser que no se produzca una respuesta inmune.

Pfizer Salud Animal
Manufacturado por:
Pfizer Animal Health S.A.,
Rue Laid Burniat 1,
1348 Louvain – la –Neuve,
Bélgica.

Importado y Distribuido a Centroamérica por:
Pfizer Centroamérica/Panamá.

Registros:

Costa Rica Reg. MAG. No.: BE7-64-36-4344
Honduras Reg. No.: PB-598
El Salvador Reg. No.: VET-2007-03-3582
Panamá Reg. No.: RB-419-10

Presentaciones y Contenidos Netos:

50 dosis (100 ml)
125 dosis (250 ml)

Bibliografía:

1. BONNEAU, M., Le DENMAT, M., VAUDELET, J.C., VELOSO NUNES, J.R., MORTENSEN, A.B. and MORTENSEN, H.P. (1992). Contributions of fat androstenone and skatole to boar taint. I. Sensory attributes of fat and pork meat. *Livestock Prod. Sci.* 32:63-80.
2. BONNEAU, M. (1995). Information on the EU research program. Presentation to EAAP Working Group, September, 27-29, 1995, Milton Keynes, UK.
3. HANSEN-MOLLER, J. and GODT, J. (1995). A consumer study of Danish entire male pigs. Presentation to EAAP Working Group, September, 27-29, 1995, Milton Keynes, UK.
4. HENNESSY, D. (1995). Assessment of the magnitude and significance of lboar taint as a meat quality issue to the Australian Pig Industry. (DAV 111P Final Report to the Pig Research & Development Corporation, Canberra, Australia.)