

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

**Avaliação da eficácia imun contraceptiva de vacinas baseadas na expressão do hormônio
liberador de gonadotrofina (GnRH) em machos suínos**

Jean Vitor Bondavalli

Araquari, 2024

Jean Vitor Bondavalli

Avaliação da eficácia imun contraceptiva de vacinas baseadas na expressão do hormônio liberador de gonadotrogina (GnRH) em machos suínos

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Fabiana Moreira

Araquari, 2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

B711a Bondavalli, Jean Vitor
Avaliação da eficácia imunocontraceptiva de vacinas
baseadas na expressão do hormônio liberador de
gonadotrogina (GnRH) em machos suínos / Jean Vitor
Bondavalli; orientadora Fabiana Moreira;
coorientadora Ivan Bianchi. -- Rio do Sul, 2024.
51 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal
Catarinense, campus Araquari, , Rio do Sul, 2024.

Inclui referências.

1. Imunocastração. 2. Suinocultura. 3. GnRH. 4.
Castração. I. Moreira, Fabiana , II. Bianchi, Ivan .
III. Instituto Federal Catarinense. . IV. Título.

JEAN VITOR BONDAVALLI

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IMUNOCONTRACEPTIVA DE VACINAS BASEADAS NA EXPRESSÃO
DO HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINA (GNRH) EM MACHOS SUÍNOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Produção e Sanidade Animal aprovada em sua forma final pelo curso de Mestrado do Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari*.

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA MOREIRA**
Data: 21/08/2024 07:59:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

autenticação eletrônica na folha de assinaturas

Prof.^a Dr.^a Fabiana Moreira - Instituição IFC – Campus Araquari

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **JOSE CRISTANI**
Data: 21/08/2024 14:19:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

autenticação eletrônica na folha de assinaturas

Prof. Dr José Cristani - Instituição UDESC

Documento assinado digitalmente
 **DIOGENES DEZEN**
Data: 21/08/2024 08:26:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

autenticação eletrônica na folha de assinaturas

Prof. Dr. Diogenes Dezen - Instituição IFC – Campus Concórdia

Documento assinado digitalmente
 **IVAN BIANCHI**
Data: 21/08/2024 16:01:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

autenticação eletrônica na folha de assinaturas

Coordenador do Curso

Prof. Dr. Ivan Bianchi - Instituição IFC – Campus Araquari

Araquari

2024

Jean Vitor Bondavalli

Avaliação da eficácia imun contraceptiva de vacinas baseadas na expressão do hormônio liberador de gonadotrogina (GnRH) em machos suínos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 12/07/2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabiana Moreira (Orientadora)

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Instituto Federal Catarinense – Campus Araquari

Prof. Dr. Diogenes Dezen

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia

Prof. Dr. José Cristani

Doutor em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita

Universidade do Estado de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha família por todo apoio e amor, principalmente aos meus pais, que foram os alicerces em cada passo da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a Nossa Senhora Aparecida a quem sou devoto, por sempre iluminarem a minha vida e por todas as bênçãos, dádivas e proteção a mim concedidas.

Agradeço especialmente aos meus pais, Jorge Bondavalli e Saionara de Fátima Bondavalli, meus exemplos de vida, trabalho e força, por viabilizarem os caminhos e as condições para atingir os meus objetivos, além de todo o amparo, atenção e amor incondicional de sempre.

Aos meus avós paternos, Antônio Anatalício Bondavalli e Maria Scharf Bondavalli (*in memoriam*), por serem meu incentivo e inspiração, e por todo o amor que me foi dedicado durante a passagem deles por esta vida; deles trago muitos exemplos e a certeza de que, de onde estão, estão olhando por mim e vibrando com a minha vitória. Ofereço essa conquista a eles... Saudades eternas.

Aos meus avós maternos, Osni Canani de Ataíde e Dalva Wolff de Ataíde, por toda a ajuda, incentivo e amparo, por todos os ensinamentos que levarei comigo por toda a vida, por serem meus exemplos de força de vontade e garra; e por todo o amor e admiração que recebo. Obrigado pela oportunidade de ter vocês perto de mim.

Aos meus irmãos, meus eternos parceiros de vida, por todo o carinho, motivação, cuidado e admiração a mim dedicados.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e dividiram comigo bons momentos de união.

Agradeço em especial a Bruna Maria Camargo de Almeida, por ser a grande parceira que é, por todo amor, carinho, incentivo e paciência que tem comigo.

À empresa Pamplona Alimentos S/A, a Edival Justen, diretor de suprimentos e fomento agropecuário, Fabrício Murilo Beker, gerente de fomento agropecuário e a Yuso Henrique Tutida, Médico Veterinário Sanitarista e grande inspirador da minha profissão por me autorizarem e incentivarem a ingressar no programa de pós graduação em paralelo à jornada de trabalho.

Ao corpo técnico do fomento agropecuário que me auxiliou na realização do trabalho, especialmente aos colegas da equipe de creche, terminação e WTF pelo acompanhamento a campo que juntamente com a equipe seleta de estagiários do IFC e do produtor Giovani Nardelli e família, proporcionaram uma excelente condução do trabalho.

Aos professores doutores José Cristani e Diogenes Dezen por aceitarem o convite para fazer parte da banca avaliadora e disponibilizarem o seu tempo.

A todos os colegas do Instituto Federal Catarinense, professores e alunos em especial à Monique Quirino, que de alguma forma me auxiliaram nos trabalhos, meu obrigado.

Aos professores pesquisadores Fabio Leivas e Neida Conrad, pela disponibilização da biotecnologia a ser testada, ao apoio técnico e disponibilidade de tempo a este estudo.

Ao meu professor co-orientador Ivan Bianchi por toda a experiência a mim transmitida, sempre disposto a ajudar e pela grande amizade que fiz.

A minha professora orientadora Fabiana Moreira, pela confiança em mim depositada, pelo conhecimento repassado e por todas as oportunidades que recebi.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram e apoiaram durante essa jornada.

O sucesso não é definitivo, e o fracasso não é fatal: o que importa é a coragem para seguir em frente. (Winston Churchill)

Resumo

BONDAVALLI, Jean. **Avaliação da eficácia imun contraceptiva de vacinas baseadas na expressão do hormônio liberador de gonadotrogina (GnRH) em machos suínos.** 2024. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2024.

A imunocastração tem sido amplamente utilizada na suinocultura por ser um método que, além de eficaz, corresponde às demandas de bem-estar animal, podendo, ainda, melhorar os indicadores de produção. As vacinas são desenvolvidas com o objetivo de inibirem o GnRH, inibindo a espermatogênese e promovendo alterações metabólicas. O presente estudo visou avaliar a eficácia da imunocastração com utilização de vacinas utilizando como antígeno o GnRH (conjugadas com a proteína LTB da *Escherichia coli*) sobre o efeito contraceptivo em suínos na fase de crescimento e terminação. O estudo envolveu 32 suínos machos em crescimento e terminação, divididos em quatro grupos de tratamento, sendo eles, o grupo castrado cirurgicamente (G1), o grupo que recebeu a vacina comercial (G2), o grupo que recebeu a vacina recombinante GnRH 1 (G3) e o grupo que recebeu a vacina recombinante GnRH 2 (G4). Foram realizadas pesagens para avaliação do peso final e ganho de peso médio, avaliação do comportamento sexual e exame andrológico, coletas de sangue nos dias 41, 75, 95 e 105 para avaliar as dosagens séricas de testosterona e análise sorológica dos níveis de anti-GnRH. Os resultados mostraram diferenças nos níveis de testosterona, volume testicular e anticorpos anti-GnRH entre os grupos ($P < 0,05$). Aos 20 e 30 dias após a administração da segunda dose (D95 e D105), os leitões que receberam as vacinas experimentais apresentaram níveis de anticorpos anti-GnRH semelhantes aos níveis observados no Grupo 2 (vacina comercial) ($P > 0,05$). No entanto, as vacinas experimentais anti-GnRH não foram eficazes quanto a vacina comercial na redução dos níveis séricos de testosterona e volume testicular ($P < 0,05$). Entre as vacinas experimentais, a vacina anti-GnRH 1 foi mais eficaz na supressão dos níveis de testosterona e manutenção do tônus testicular ($P < 0,05$). A vacina comercial causou lesões testiculares mais severas (escores 3 e 4), enquanto a vacina GnRH 1 foi mais frequente o escore 3 e a GnRH 2 resultou em lesões mais leves (escores 1 e 2). Sendo assim, o tecido testicular apresentou maior frequência de lesões intensas e severas com a administração da vacina comercial, no entanto a vacina GnRH 1 apresentou maior intensidade de lesões degenerativas que a vacina GnRH 2, assim como foi mais eficaz em suprimir os níveis de testosterona e em manter o tônus testicular, o que pode demonstrar uma possível alternativa para a imunocastração.

Palavras-chave: Imunocastração; Suinocultura; GnRH; Testosterona

Abstract

BONDAVALLI, Jean. Evaluation of the immunocontraceptive efficacy of vaccines based on the expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in male pigs. 2024. 50p. Dissertation (Master of Science) - Postgraduate Program in Animal Production and Health, Dean of Research, Postgraduate Studies and Innovation, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2024.

Immunocastration has been widely used in pig farming as it is an effective method that meets animal welfare demands and can improve production indicators. The vaccines are developed to inhibit GnRH, thus inhibiting spermatogenesis and promoting metabolic changes. This study aimed to evaluate the efficacy of immunocastration using vaccines with GnRH (conjugated with *Escherichia coli* LTB protein) as the antigen on the contraceptive effect in pigs during the growth and finishing phases. The study involved 32 male pigs in the growth and finishing phases, divided into four treatment groups: surgically castrated (G1), commercial vaccine (G2), recombinant GnRH 1 vaccine (G3), and recombinant GnRH 2 vaccine (G4). Weighings were performed to evaluate final weight and average weight gain, sexual behavior assessment, and andrological examination. Blood samples were collected on days 41, 75, 95, and 105 to assess serum testosterone levels and anti-GnRH antibody levels. The results showed differences in testosterone levels, testicular volume, and anti-GnRH antibodies between the groups ($P < 0.05$). At 20 and 30 days after the second dose (D95 and D105), piglets that received the experimental vaccines showed anti-GnRH antibody levels similar to those observed in Group 2 (commercial vaccine) ($P > 0.05$). However, the experimental anti-GnRH vaccines were not as effective as the commercial vaccine in reducing serum testosterone levels and testicular volume ($P < 0.05$). Among the experimental vaccines, the anti-GnRH 1 vaccine was more effective in suppressing testosterone levels and maintaining testicular tone ($P < 0.05$). The commercial vaccine caused more severe testicular lesions (scores 3 and 4), while the GnRH 1 vaccine more frequently resulted in score 3 lesions, and the GnRH 2 vaccine resulted in milder lesions (scores 1 and 2). Thus, testicular tissue showed a higher frequency of intense and severe lesions with the administration of the commercial vaccine. However, the GnRH 1 vaccine caused more intense degenerative lesions than the GnRH 2 vaccine and was more effective in suppressing testosterone levels and maintaining testicular tone, suggesting a potential alternative in immunocastration.

Keywords: Immunocastration; Pig farming; GnRH; Testosterone

Lista de Figuras

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Controle endócrino da função testicular de machos suínos..... | 17 |
| Figura 2 | Níveis séricos de testosterona de leitões submetidos à castração cirúrgica (aos 7 dias de vida) ou imunológica (aos 100 e 135 dias de vida) com diferentes tipos de vacina anti-GnRH..... | 32 |
| Figura 3 | Volume testicular mensurado em leitões submetidos a castração imunológica (aos 100 e 135 dias de vida) com diferentes tipos de vacina anti-GnRH..... | 33 |
| Figura 4 | Níveis séricos de testosterona de suínos castrados e desafiados com Acetato de Buserelina antes e depois da segunda dose da vacina (D95) | 34 |
| Figura 5 | Fotomicrografia de escore de lesões testiculares dos suínos submetidos a diferentes vacinas para imunocastração..... | 36 |

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Grupos e tratamentos experimentais de suínos com e sem a aplicação das vacinas imun contraceptivas..... | 25 |
| Tabela 2 | Parâmetros de desempenho dos suínos submetidos aos diferentes métodos de contracepção..... | 28 |
| Tabela 3 | Níveis de anticorpos anti-GnRH de suínos submetidos à castração cirúrgica e imunológica (aos 100 e 135 dias de vida) com diferentes vacinas..... | 30 |
| Tabela 4 | Frequência de escores de lesões testiculares dos suínos submetidos a imunocastração independente da vacina utilizada..... | 34 |
| Tabela 5 | Frequência de escores de lesões testiculares dos suínos submetidos a imunocastração de acordo com as vacinas utilizadas..... | 35 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|------|--|
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| GnRH | Hormônio Liberador de Gonadotrofinas |
| LTB | Subunidade B de Enterotoxina Termo-lábil |
| GPD | Ganho de Peso Diário |
| PF | Peso Final |

Lista de Símbolos

| | |
|------|------------------|
| µg | Microgramas |
| g/kg | Gramas por quilo |
| °C | Grau Celsius |
| ml | Mililitros |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|-----|
| 1 | CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE | 17 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 22 |
| 2.1 | Geral | 22 |
| 2.2 | Específicos | 22 |
| 3 | EFICÁCIA IMUNOCONTRACEPTIVA DE VACINA RECOMBINANTE EM SUÍNOS | 22 |
| 3.1 | Introdução | 23 |
| 3.2 | Material e Métodos..... | 25 |
| 3.2.1 | Comitê de Ética no Uso de Animais | 25 |
| 3.2.2 | Local e animais..... | 25 |
| 3.2.3 | Avaliação do comportamento sexual e exame andrológico..... | 27 |
| 3.2.4 | Desafio de GnRH | 29 |
| 3.2.5 | Coleta de tecido testicular e análise histológica..... | 29 |
| 3.2.6 | Análise estatística | 30 |
| 3.3 | Resultados | 30 |
| 3.4 | Discussão | 338 |
| 3.5 | Conclusão | 42 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 44 |
| 5 | REFERÊNCIAS..... | 47 |

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

A carne suína é uma das fontes de proteína animal mais produzidas e consumidas no mundo, sendo o Brasil responsável por grande parte do seu fornecimento. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2022 o Brasil produziu 4,983 milhões de toneladas de carne suína, um aumento de 5,3% ao ano de 2021. Apesar dos desafios vivenciados pela cadeia produtiva no cenário atual, a produção de suínos é uma atividade econômica muito importante para o país, e o desenvolvimento de tecnologias inovadoras e sustentáveis permitem a potencialização da suinocultura brasileira, mantendo o Brasil em destaque no mercado mundial da carne suína.

A castração de suínos machos é uma prática comum no sistema produtivo, realizada com o objetivo de cessar a produção de hormônios sexuais do animal e assim evitar o comportamento agressivo dos machos inteiros, a reprodução não planejada e o odor sexual na carne causado pelo acúmulo de androstenona e escatol no tecido adiposo (BONEAU & WEILER, 2019; GARRIDO et al., 2017; ZANATA et al., 2018). Esses fatores indesejáveis surgem com o início da puberdade, quando os animais possuem seis a sete meses de idade, período caracterizado pela capacidade do animal de fertilizar uma fêmea, com número suficiente de espermatozoides e comportamento sexual (GONZÁLEZ, 2002).

O controle endócrino reprodutivo dos suínos machos ocorre por meio de *feedbacks* positivos e negativos entre os hormônios sintetizados e liberados pelo hipotálamo, hipófise anterior e gônadas masculinas. Ao receber uma mensagem no sistema nervoso central (SNC), o hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e esse é transportado até a hipófise anterior. Depois de estimulada, a hipófise anterior secreta as gonadotrofinas hipofisárias: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), que seguirão pela corrente sanguínea até os testículos. Nos testículos, o FSH atua diretamente nas células de Sertoli localizadas nos túbulos seminíferos, responsáveis pela espermatogênese; enquanto o LH atua nas células de Leydig que são responsáveis pela secreção de andrógenos, dos quais o mais importante é a testosterona (GONZÁLEZ, 2002; ČANDEK-POTOKAR et al., 2017).

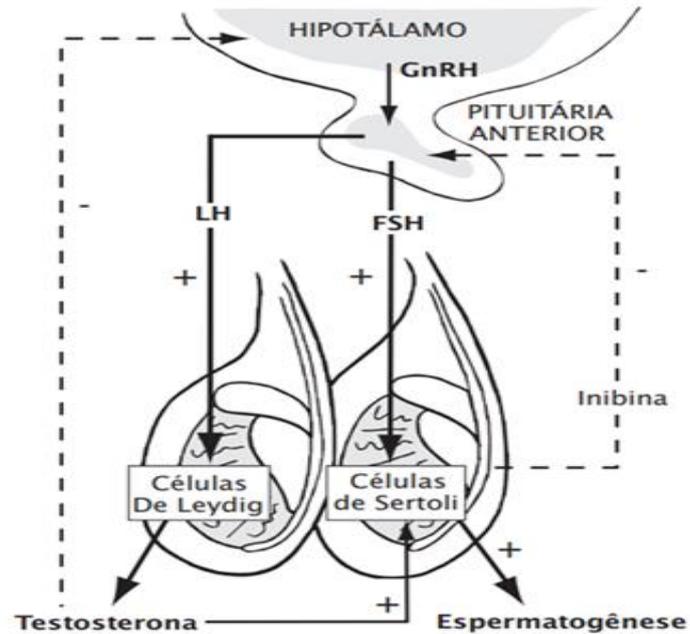


Figura 1. Controle endócrino da função testicular de machos suínos.

O controle da função reprodutiva no macho é realizado pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículos. A secreção do GnRH é modulada pelas gonadotrofinas hipofisiárias (LH, FSH) e pela testosterona produzida pelos testículos. A inibina, um hormônio glicoprotéico secretada pelas células de Sertoli no testículo, inibe especificamente a secreção de FSH (PTASZYNSKA, 2007).

Após o nascimento do animal, com o avançar da idade ocorre o aumento nos níveis de GnRH, bem como a maior produção de LH e FSH. Entretanto, no período pós-natal a produção de testosterona é baixa. Com o início da puberdade há alteração do padrão de secreção de GnRH pelo hipotálamo, de LH pela hipófise anterior e consequente aumento da produção e secreção de testosterona pelos testículos. O FSH também participa da esteroidogênese, atuando na produção de receptores para gonadotrofinas no testículo (GONZÁLEZ, 2002; ČANDEK-POTOKAR et al., 2017). Assim, a puberdade provoca o maior desenvolvimento dos testículos e maior liberação de hormônios esteróides, incluindo a androstenona, hormônio que inibe o catabolismo do escatol e se deposita no tecido adiposo, deixando a carne com o odor característico de macho inteiro (DORAN et al., 2004; ZAMARATSKAIA et al., 2008).

Ainda que o método cirúrgico seja uma alternativa contraceptiva eficaz e muito utilizada, estudos mostram que a castração cirúrgica ocasiona estresse, dor aguda e crônica,

infecções e diminuição no ganho de peso (PRUNIER et al., 2006; VON BORELL et al., 2009, BONEAU & WEILER, 2019), e por isso vêm sendo questionada mundialmente por impactar no bem-estar animal. Diante da pressão causada pelos consumidores e pelo mercado internacional, principalmente por países da União Europeia, que buscam por métodos que minimizem o sofrimento dos animais e valorizem o bem-estar animal, novas alternativas inovadoras têm sido adotadas para evitar a castração cirúrgica.

A castração através da aplicação de vacinas é uma alternativa promissora ao método cirúrgico e vem sendo utilizada como prática de rotina na terminação de suínos, com objetivo de melhorar as condições de manejo e qualidade da carne. O GnRH é um decapeptídeo muito utilizado na produção de imun contraceptivos, e a supressão desse hormônio leva ao bloqueio da estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, inibição da produção de FSH e LH pela hipófise anterior e esteroides testiculares, atrofia dos tecidos gonadais, inibição da espermatogênese e alterações metabólicas (ČANDEK-POTOKAR et al., 2017). Essas alterações também levam a algumas mudanças no comportamento dos animais, como a redução da agressividade, aumento do apetite e ingestão de alimentos e modificação no desempenho de crescimento (BATOREK et al., 2012; MARTINS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2022; AHMED et al., 2022).

A Vivax[®] é vacina comercial disponível no Brasil, e deve ser administrada em duas doses com intervalo mínimo de 4 semanas: a primeira dose pode ser aplicada após os animais atingirem 8 a 9 semanas de idade, já a segunda deve ser administrada entre 4 ou 5 semanas antes do abate (PFIZER, 2008). Assim como outras vacinas, a primeira dose apenas sensibiliza o sistema imune do animal sem provocar uma resposta imunológica significativa, mantendo a alta taxa de crescimento e melhor conversão alimentar de forma fisiológica, semelhante ao macho inteiro. É a partir da segunda dose que ocorre a estimulação efetiva do sistema imune e produção de anticorpos específicos contra o GnRH, ocorrendo a inibição das funções testiculares e conseqüentemente ausência de testosterona, androstenona e maior eliminação de escatol pelo organismo do suíno (PFIZER, 2008; MARTINS et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022).

Para demonstrar a eficácia do método vacinal na castração de suínos, ZOELS et al. (2020) comprovaram que a concentração de testosterona nas fezes diminuiu significativamente duas semanas após a segunda dose da vacina imun contraceptiva; no soro, a concentração diminuiu da segunda dose até o momento do abate, que ocorreu com

idade de 24 e 26 semanas. Semelhantemente, SAMOILIUK et al. (2021) observaram que após duas semanas da castração de suínos, o nível de testosterona sérica dos machos imunocastrados foi 7,8 vezes menor que animais não castrados e 4,5 vezes menor que animais castrados pelo método cirúrgico.

Suínos imunocastrados apresentam melhor eficiência alimentar que os animais castrados cirurgicamente, com maior ganho de peso diário, melhor conversão alimentar, diminuição da espessura de toucinho e melhor qualidade de carne magra (BATOREK et al., 2012; NAUTRUP et al., 2018; ZOELS et al., 2020; MARTINS et al., 2022). Acerca dos benefícios relacionados ao bem-estar animal, a castração pelo método vacinal é menos dolorosa para o animal quando comparada a castração cirúrgica sem anestesia e diminui os comportamentos agressivos dos machos após a segunda dose vacinal (BONNEAU & WEILER, 2019; ČANDEK-POTOKAR et al., 2017).

Pesquisadores avaliaram o efeito da imunocastração na morfologia, histopatologia e fisiologia do sistema reprodutivo dos machos, comprovando sua eficácia na inibição da funcionalidade das gônadas, observadas pela atrofia dos túbulos seminíferos, diminuição da espermatogênese, redução das células de Leydig, bem como a diminuição dos níveis de esteroides no tecido testicular e no soro (MITJANA et al., 2020; ESLABÃO et al., 2021; SAMOILIUK et al., 2021; PAWLICKI et al., 2022).

Um dos desafios na produção de vacinas anti-GnRH é o fato desta molécula possuir baixo peso e baixa imunogenicidade, sendo necessário a conjugação do GnRH a proteínas carreadoras, de forma química, eletrostática ou por fusão genética. Atualmente as vacinas produzidas são de DNA recombinantes constituídas por proteínas ou peptídeos purificados que proporcionam maior segurança aos animais. Todavia, essa purificação elimina alguns componentes antigênicos que diminuem a imunogenicidade da vacina, sendo necessária a adição de moléculas capazes de potencializar a resposta imune (ESLABÃO, 2020).

Algumas cepas enterotoxigênicas de *Escherichia coli* produzem a exotoxina termo-lábil (LT), que é dividida em subunidade A e B. A subunidade B dessa exotoxina (LTB) é um pentâmero atóxico de 60 kDa altamente estável, que tem sido utilizada como molécula carreadora de antígeno, capaz de potencializar significativamente a apresentação do antígeno ao sistema imune e estimular a produção de anticorpos sistêmicos e mucosos (CONCEIÇÃO et al., 2006). LTB é caracterizada como uma molécula sinalizadora potente com a capacidade de estimular uma forte resposta sistêmica contra antígenos co-administrados

ou acoplados (YAMAMOTO et al., 2001; CONCEIÇÃO et al., 2006). A própria subunidade LTB é capaz de aumentar a resposta imunológica a antígenos suplementados com ela, tornando-se assim uma candidata ideal como molécula transportadora. Esta molécula forma uma estrutura cilíndrica pentamérica, responsável por se ligar a um receptor de superfície celular, o gangliosídeo GM1 (NASHAR et al., 2001).

A expressão das proteínas recombinantes imunocontraceptivas expressas em *E. coli* é bastante consolidada e eficaz. Em estudos em camundongos machos BALB/c, foi comprovado a capacidade de *E. coli* induzir a produção de anticorpos anti-GnRH, no qual se observou soroconversão, redução ou ausência de espermatogênese, atrofia dos túbulos seminíferos e redução das células de Leydig (ESLABÃO et al. 2021).

Com base nessa revisão, a imunocastração é uma alternativa promissora à castração cirúrgica de suínos machos, proporcionando melhores condições de bem-estar ao animal, alteração endócrina e reprodutiva, além de potencializar o desempenho produtivo dos suínos, colaborando com o desenvolvimento da atividade econômica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a eficácia da imunocastração com utilização de vacinas recombinantes experimentais sobre o efeito contraceptivo em suínos na fase de crescimento e terminação.

2.2 Específicos

- Avaliar a soroconversão dos anticorpos anti-GnRH dos animais imunocastrados;
- Avaliar os níveis séricos de testosterona total dos animais dos grupos experimentais;
- Avaliar o comportamento sexual dos animais dos diferentes tratamentos;
- Avaliar as características histológicas das gônadas masculinas dos animais dos grupos experimentais;
- Avaliar os parâmetros de desempenho dos animais.

Avaliação da eficácia imun contraceptiva de vacinas baseadas na expressão do hormônio liberador de gonadotrogina (GnRH) em machos suínos

3

Avaliação da eficácia imun contraceptiva de vacinas baseadas na expressão do hormônio liberador de gonadotrogina (GnRH) em machos suínos

Bondavalli J.V.², Queiroz K.B.F.¹, Quirino M.W.², Bianchi I.^{1,2}, Leite F.L.³, Conrad N.³, Gasperin, B.G.³, Peripolli, V.², Schwegler E.², Silveira, M.F.², Tutida Y.H.⁴, Moreira F.^{1,2*}

¹Instituto Federal Catarinense – IFC, Araquari- SC; ²Pós-graduação em Produção e Sanidade Animal, Instituto Federal Catarinense – IFC, Araquari- SC; ³Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Capão do Leão-RS; ⁴Pamplona Alimentos S.A – Rio do Sul - SC

3.1 Introdução

No manejo da suinocultura a castração dos animais é uma prática comum no sistema produtivo, realizada com o objetivo de cessar a produção de hormônios sexuais no animal. O controle endócrino reprodutivo dos suínos machos ocorre por meio de feedback positivo entre os hormônios sintetizados e liberados pelo hipotálamo, hipófise anterior e gônadas masculinas (BONEAU & WEILER, 2019).

No início da puberdade, de seis a sete meses de idade, os suínos machos começam a apresentar comportamento sexual, além disso, possuem número suficiente de espermatozoides para fertilizar as fêmeas (GONZÁLEZ, 2002). A castração tem como objetivo evitar esses fatores, também o comportamento agressivo dos machos inteiros e o odor sexual na carne causado pelo acúmulo de androstenona e escatol no tecido adiposo (BONEAU & WEILER, 2019; GARRIDO et al., 2017; ZANATA et al., 2018).

Embora a cirurgia seja uma opção contraceptiva eficaz e comum, estudos demonstram que pode causar estresse, dor aguda, infecções e redução do ganho de peso nos animais (PRUNIER et al., 2023; VON BORELL et al., 2009, BONEAU & WEILER, 2019), gerando uma série de questionamentos sobre o impacto sobre o bem-estar dos suínos. Como resposta, a castração por meio de vacinas surge como uma alternativa promissora ao método cirúrgico e está sendo cada vez mais adotada na produção de suínos, com o intuito de aprimorar as condições de manejo e a qualidade da carne (BATOREK et al., 2012).

Suínos imunocastrados apresentam melhor eficiência alimentar que os animais castrados cirurgicamente, com maior ganho de peso diário, melhor conversão alimentar, redução da espessura de toucinho e melhor qualidade de carne (BATOREK et al., 2012;

NAUTRUP et al., 2018; ZOELS et al., 2020; MARTINS et al., 2022). Acerca dos benefícios relacionados ao bem-estar animal, a castração pelo método vacinal é menos dolorosa para o animal quando comparada a castração cirúrgica sem anestesia, além disso reduz comportamentos agressivos dos machos após a segunda dose vacinal (BONNEAU & WEILER, 2019; ČANDEK-POTOKAR et al., 2017).

A vacina comercial (Vivax® Zoetis) é a mais utilizada no Brasil e deve ser administrada em duas doses com intervalo mínimo de 4 semanas, sendo a primeira dose pode ser aplicada após os animais atingirem 8 a 9 semanas de idade, e a segunda deve ser administrada entre 4 ou 5 semanas antes do abate (PFIZER, 2008; ZOETIS, 2024).

Um dos desafios na produção de vacinas anti-GnRH é o fato desta molécula possuir baixo peso e baixa imunogenicidade, sendo necessário a conjugação do GnRH a proteínas carreadoras. O antígeno presente na vacina comercial é um análogo sintético e incompleto do fator de liberação de gonadotrofinas (GnRF), ligado a uma proteína carreadora para torná-lo imunogênico; isto é, para ajudar a desencadear uma resposta imunológica (ZOETIS, 2024).

Algumas cepas enterotoxigênicas de *Escherichia (E.) coli* produzem a exotoxina termo-lábil (LT), que é dividida em subunidade A e B. A subunidade B dessa exotoxina (LTB) é um pentâmero atóxico de 60 kDa altamente estável, que tem sido utilizada como molécula carreadora de antígeno, capaz de potencializar significativamente a apresentação do antígeno ao sistema imune e estimular a produção de anticorpos sistêmicos e mucosos (CONCEIÇÃO et al., 2006).

A expressão das proteínas recombinantes imunocontraceptivas expressas em *E. coli* é bastante consolidada e eficaz e em camundongos machos BALB/c, foi comprovado a capacidade de *E. coli* induzir a produção de anticorpos anti-GnRH, no qual se observou soroconversão, redução ou ausência de espermatogênese, atrofia dos túbulos seminíferos e redução das células de Leydig (ESLABÃO et al. 2021).

Com base neste contexto, a imunocastração se consolidou como uma alternativa promissora à castração cirúrgica de suínos machos, proporcionando melhores condições de bem-estar animal, alteração endócrina, reprodutiva e melhor desempenho produtivo (SHENCKEL, F.S. et al., 2007; BATOREK et al., 2012; ČANDEK-POTOKAR et al., 2017; BONNEAU & WEILER, 2019), porém, ainda são necessário estudos com o intuito de melhorar e aumentar as alternativas de vacinas. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a

eficácia imun contraceptiva de vacinas experimentais recombinante constituída da molécula de GnRH fusionado à toxina de *Escherichia coli* (LTB) em suínos.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Comitê de Ética no Uso de Animais

Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Catarinense (IFC) - Campus Araquari sob o protocolo nº 428/2023.

3.2.2 Local e animais

O estudo foi conduzido em uma granja experimental localizada na cidade de Rio do Oeste, estado de Santa Catarina, Brasil, na latitude 27° 11' 33,76" S e longitude 49° 47' 48,36" W com altitude de 365 metros.

Para este estudo foram utilizados 32 suínos machos na fase de crescimento e terminação após transferência da creche em torno de 60 dias de idade e peso médio de 24 ± 0,5 kg, onde foram identificados de acordo com cada um dos tratamentos e realocados aleatoriamente dentro do galpão em duas baias com 16 animais em cada baia.

O galpão de alojamento era composto por cortinas para a ventilação com ajuste manual. As baias eram de piso de concreto e semiripado e possuíam dois bebedouros, tipo pendular, sendo 1 para cada 8 animais, e um comedouro em linha em inox com distribuição da ração de forma manual. A nutrição administrada foi com base nas rações conforme indicação da empresa.

A Ração Crescimento Leitão é composta por 160,0 g/kg de proteína e matéria mineral de 100,00 g/kg, sendo adicionados os medicamentos Tiamulina, Amoxicilina e Ivermectina. A Ração Crescimento Reforço é composta por 150,0 g/kg de proteína e matéria mineral de 100,00 g/kg, adicionados de Tilmicosina e Dysantic. A Ração Crescimento I era composta por 150,0 g/kg de proteína e matéria mineral de 100,00 g/kg. A ração Crescimento II por 140,0 g/kg de proteína e matéria mineral de 100,00 g/kg. A ração Terminação I e Terminação II por 130,0 g/kg de proteína e matéria mineral de 90,00 g/kg, sendo a Terminação I adicionado de

Tilmicosina, a ração Terminação III composta por 7,0 g/kg de proteína e matéria mineral de 90,00 g/kg.

2.4.3 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro tratamentos: Grupo 1 – suínos castrados cirurgicamente aos sete dias de idade (n=8); Grupo 2 – aplicação de vacina imun contraceptiva comercial (n=8); Grupo 3 – aplicação de vacina GnRH 1(n=8); Grupo 4 – aplicação de vacina GnRH 2 (n=8) (Tabela 1).

Os animais do Grupo 1 foram castrados seguindo o protocolo de castração cirúrgica da empresa, realizada aos três dias de idade, na maternidade, através da incisão medial no saco escrotal e túnicas até a exposição total do testículo para o debridamento ou escarificação do cordão espermático e retirada das gônadas. Os animais do Grupo 2 foram submetidos a Vacina Comercial Vivax Zoetis®, feita a partir de um análogo sintético e incompleto do fator de liberação de gonadotrofinas (GnRF), ligado a uma proteína carreadora (ZOETIS, 2024).

Após todos passarem pela fase de creche, foram encaminhados para o galpão de crescimento e terminação, e a partir deste momento o primeiro dia do experimento correspondeu ao dia 0, onde foram realizadas as pesagens, identificação por número e cores diferentes de brincos para a distribuição dos grupos em baias de 16 animais cada.

Os suínos dos grupos 2, 3 e 4 receberam duas doses de 2 ml do imunógeno, via intramuscular, nos dias 41 e 75 de experimento (100 e 135 dias de vida). Os animais foram pesados individualmente em balança digital nos dias 0, 41, 75, 95 e 105 dias de experimento. Os dados coletados foram inseridos em planilhas do Excel e posteriormente submetidos a análise de ganho de peso diário (GP) e peso final (PF).

Tabela 1. Grupos e tratamentos experimentais de suínos com e sem a aplicação das vacinas imunocontraceptivas.

| GRUPOS | TRATAMENTOS | N.º DE ANIMAIS |
|--------------|---|----------------|
| G1 | Castração cirúrgica: animais castrados pelo método cirúrgico aos 03 dias de vida na maternidade | 08 |
| G2 | Vacina comercial: imunoconcepção com vacina comercial (GnRF-proteína) | 08 |
| G3 | Vacina GnRH 1: imunoconcepção com vacina GnRH 1 | 08 |
| G4 | Vacina GnRH 2: imunoconcepção com vacina GnRH 2 | 08 |
| TOTAL | | 32 |

3.2.3 Produção do antígeno recombinante GnRH/LTB

A produção do antígeno recombinante foi seguindo Eslabão et al.,2020. Brevemente, a expressão e recuperação da proteína eLTB/GnRH foram realizadas conforme descrito anteriormente (GIL et al. 2013). As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade usando colunas HisTrap™ HP de 1 ml pré-carregadas com Ni Sepharose™ e o Sistema de Cromatografia Líquida Automatizada AKTAprime™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). A proteína purificada eLTB/GnRH foi dialisada em PBS com concentrações decrescentes de ureia por 72 h e, em seguida, armazenada a -20 °C para análise posterior. A concentração da proteína foi determinada através de curva de BCA, utilizando *BCA Protein Assay kit* (GE Healthcare).

Para vacina G3 a dose vacinal foi estabelecida em 400 µg de rGnRH/LTB, e para a G4 a dose vacinal foi estabelecida em 300 µg de rGnRH/LTB, suspensas em solução salina, ambas as vacinas foram adsorvidas em hidróxido de Alumínio [Al (OH)3] a 10% (V/V), sendo 2 ml a dose administrada intramuscular.

3.2.3 Avaliação do comportamento sexual e exame andrológico

A avaliação do comportamento sexual dos machos teve início duas semanas antes da administração das vacinas imunocontraceptivas (dia 28 e 35 do experimento) e realizada semanalmente até a data do abate, totalizando 12 avaliações. As avaliações foram realizadas por meio de observação direta dos animais nas duas baias durante 60 minutos, pelo mesmo

observador, e os dados anotados em uma planilha de acordo com o número de observações de cada comportamento e alterações física dos testículos, conforme cada tratamento. Para avaliação dos parâmetros testiculares foi realizado o exame andrológico de todos os animais nos dias 41, 75, 95 e 105 do experimento. Os testículos foram submetidos a inspeção e palpação para avaliação da simetria, mobilidade, tônus, medição da largura e comprimento e obtenção do volume testicular conforme descrito por Mellagi et al., (2019).

3.2. 5 Coleta de sangue e análises sorológicas de testosterona e análise da dinâmica da IgG anti-GnRH

Os animais foram submetidos a cinco coletas de sangue, para obtenção de soro, durante o período experimental, nos dias 41, 75, 95 e 105 dias de experimento. Para a coleta os animais foram contidos fisicamente com o uso do cachimbo. O sangue foi coletado diretamente da veia jugular, com agulha de 40x12 (18G de polegada) e seringa de 10 ml em tubos com ativador de coágulo para a análise sorológica dos níveis séricos de testosterona e armazenados em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As concentrações séricas de testosterona foram determinadas usando o teste de quimiluminescência por meio de kits específicos e padronizados.

Essas amostras foram analisadas por um técnico treinado do Laboratório de Análises Clínicas Pasin (Santa Maria, Brasil) e validadas com amostras de soro reunidas na diluição de 1:20 com limite de detecção de 12 mg/dl. Para as análises da dinâmica dos anticorpos IgGs anti-GnRH foi utilizada *in house* ELISA indireto baseado em Eslabão et al., 2020. Brevemente, Ensaio ELISA indiretos foram realizados com soro de cada grupo individualmente de cada coleta. As placas foram revestidas durante a noite a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ com $0,2\text{ }\mu\text{g}$ de GnRH/LTB purificado por poço. As amostras de soro foram diluídas 1:200, e um anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com HRP (Sigma-Aldrich) foi usado. As reações foram visualizadas com orto-fenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich), interrompidas com 2 N H₂SO₄ e analisadas a uma OD de 492 nm usando um espectrofotômetro de leitor de microplacas ELISA MR 700 (Dynatech Laboratories, Alemanha). Todas estas análises foram realizadas no laboratório da UFPel Campus Capão do Leão-RS.

3.2.4 Desafio de GnRH

Aos 95 dias de experimento (20 dias após a segunda dose da vacina imun contraceptiva) foi administrada uma dose de Acetato de Buserelina (Gonaxal, Biogénesis Bagó), um análogo do GnRH, para análise da concentração de testosterona antes e depois da aplicação do hormônio. Para isso, foi realizada a primeira coleta de sangue seguida da administração do Acetato de Buserelina, com agulha 40x12 e seringa de 5 ml via intramuscular na tábua do pescoço, e após duas horas realizada a segunda coleta de sangue, em tubos com ativador de coágulo para a análise sorológica dos níveis séricos de testosterona e armazenados em temperatura de - 20 °C no Laboratório de Análises Clínicas Pasin (Santa Maria, Brasil).

3.2.5 Coleta de tecido testicular e análise histológica

Ao final do experimento, para os grupos 2, 3 e 4, foi realizada a coleta de uma amostra dos testículos direito em frigorífico, referente a cada tratamento, e armazenados em frascos estéreis de 50 ml contendo solução de formol a 10%. As amostras de testículos foram encaminhadas para a realização do processamento histológico clássico com coloração de hematoxilina-eosina (HE) e leitura por meio de microscopia óptica no LAPVET do Instituto Federal Catarinense – Campus Araquari. Para os animais do grupo 1, não houve coleta dos testículos, uma vez que não receberam vacina devido a castração cirúrgica realizada aos três dias de idade.

A leitura das lâminas dos testículos dos suínos foi realizada baseada na classificação por escores de lesões adaptada descrita por Withoeft et al., (2019). Foram atribuídos quatro escores de lesões do parênquima testicular, sendo grau 1 discreta (maioria dos túbulos seminíferos encontrava-se normal), grau 2 leve (leve redução dos túbulos seminíferos, de células de Sertoli e de Leydig), grau 3 moderada (moderada atrofia dos túbulos seminíferos e das células de Sertoli e Leydig) e grau 4 intensa (acentuada atrofia dos túbulos seminíferos e das células de Sertoli e Leydig). Após a determinação dos escores o método aplicado foi intra e inter avaliação realizado por dois observadores pelo critério de avaliação de cinco campos contendo 10 túbulos seminíferos para cada uma das lâminas, referentes a cada animal, para enfim definir o escore ou grau de lesão. A interpretação dos resultados das análises de coeficiente Kappa foram baseadas no estudo conduzido por Perroca e Gaidzinski, (2003).

3.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por medidas repetidas utilizando o software Statistical Analysis System® (SAS Inst. Inc., Cary, NC. versão 9.4) através do procedimento GLIMMIX. O tratamento, o momento e a interação entre os fatores foram considerados como efeitos fixos e as múltiplas comparações foram realizadas com o teste de Tukey. Para as análises de lesões no tecido testicular foi utilizado o teste de correlação de Spearman e o método de coeficiente de Kappa Cohen's para avaliar o grau de concordância entre os avaliadores considerando o nível de significância $P < 0,05$ também pelo software SAS 9.4.

3.3 Resultados

De acordo com resultados apresentados na Tabela 2 foi possível observar que não houve diferença entre o PM e GPD independente do tratamento aos quais os suínos foram submetidos ($P > 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros de desempenho dos suínos submetidos aos diferentes métodos de contracepção.

| | Castração cirúrgica | Vacina comercial | GnRH 1 | GnRH 2 | EPM | Valor de P |
|-----------------|----------------------------|-------------------------|---------------|---------------|------------|-------------------|
| Peso, Kg | | | | | | |
| D0 | 24,5 | 21,8 | 24,2 | 23,0 | 1,1 | 0,11 |
| D41 | 65,6 | 65,4 | 65,8 | 65,8 | 1,3 | 1,00 |
| D75 | 108,0 | 108,6 | 105,3 | 106,0 | 2,4 | 0,74 |
| D105 | 139,3 | 141,2 | 140,7 | 140,9 | 3,1 | 0,97 |
| GPD, Kg | | | | | | |
| D0 a D41 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 0,0 | 0,30 |
| D41 a D75 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,2 | 0,0 | 0,36 |
| D75 a D105 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 0,1 | 0,24 |
| D41 a D105 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 0,0 | 0,93 |
| D0 a D105 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 0,0 | 0,64 |

*EPM: Erro Padrão da Média; GPD: Ganho de Peso médio Diário; $P < 0,05$.

Foram realizados exames andrológicos e avaliado a frequência de observações quanto a simetria testicular, mobilidade testicular e tônus testicular, entre os diferentes tratamentos e aos 46 dias (D46), 75 dias (D75) e 105 dias (D105). Quanto à simetria testicular, não houve diferença significativa ($P>0.05$) entre os tratamentos e o tempo de avaliação.

Em relação a mobilidade testicular, foi observado, no D105 uma diferença significativa entre o grupo G3 e os outros grupos, com apenas 32,5% dos suínos do tratamento apresentando mobilidade testicular, oposto aos 100% dos grupos vacina Comercial e grupo G4. Na observação do tônus testicular, foi avaliado quanto flácido (FL), fibroelástico (FE) e firme (FR). Houve diferença entre os grupos Vacina Comercial e G3 no momento D105 apresentando, respectivamente, 12,5% e 87,5% de suínos do tratamento com tônus testicular firme (FR) ($P<0,05$).

A Tabela 3 apresenta os níveis de anticorpos anti-GnRH em leitões submetidos à castração cirúrgica e imunológica com as diferentes vacinas após a administração das duas doses. Foi observado o efeito da interação entre tratamento e momento de avaliação sobre os níveis de anticorpos. Os leitões que receberam as vacinas recombinantes experimentais apresentaram níveis de anticorpos anti-GnRH semelhantes aos níveis observados no Grupo 2 (vacina comercial). Para todos os grupos vacinados, houve aumento dos níveis de anticorpos após a administração da segunda dose, os quais se mantiveram elevados até o momento que precedeu o abate dos animais (D105).

Tabela 3. Níveis de anticorpos anti-GnRH de suínos submetidos à castração cirúrgica e imunológica (aos 100 e 135 dias de vida) com diferentes vacinas.

| Momento | Castração cirúrgica (G1) | Vacina comercial (G2) | Vacina GnRH 1 (G3) | Vacina GnRH 2 (G4) | Valor de P | | |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|--------|------------|
| | | | | | Trat | Mom | Trat x Mom |
| D41 | 0,054 ± 0,004 ^{Aa} | 0,063 ± 0,006 ^{Aa} | 0,054 ± 0,008 ^{Aa} | 0,053 ± 0,007 ^{Aa} | | | |
| D75 | 0,141 ± 0,021 ^{Aa} | 0,349 ± 0,031 ^{Ba} | 0,524 ± 0,076 ^{Ca} | 0,339 ± 0,03 ^{Ba} | < 0.01 | < 0.01 | < 0.01 |
| D95 | 0,210 ± 0,051 ^{Ab} | 1,160 ± 0,075 ^{Bb} | 1,302 ± 0,125 ^{Bb} | 1,092 ± 0,07 ^{Bb} | < 0.01 | < 0.01 | < 0.01 |
| D105 | 0,197 ± 0,056 ^{Aa} | 1,000 ± 0,076 ^{Bb} | 1,289 ± 0,123 ^{Bb} | 0,952 ± 0,10 ^{Bb} | | | |

D41 e D75: momentos de aplicação da 1ª e 2ª dose de vacina, respectivamente (D0: primeiro dia de alojamento na fase de crescimento e terminação). Os resultados (média ± erro padrão da média) referem-se aos valores de absorbância do soro sanguíneo, os quais são diretamente proporcionais aos níveis de anticorpos anti-GnRH. ^{A,B} indicam diferença entre os tratamentos dentro do momento de avaliação (na linha) e ^{a,b,c} indicam diferença entre os momentos de avaliação dentro do tratamento (na coluna; P < 0.05). Trat: tratamento. Mom: momento.

Na Figura 2 observa-se as variações nas concentrações séricas de testosterona entre os diferentes métodos de castração ou tratamentos ao longo do tempo. Foi observado efeito da interação entre tratamento e momento de avaliação dos leitões ($P < 0,05$) e os níveis séricos de testosterona ($P < 0,05$). Após a aplicação da primeira dose das vacinas foi observado no D75, que os níveis séricos de testosterona entre os grupos de suínos foram semelhantes independente da vacina utilizada ($P > 0,05$). Após 20 dias da aplicação da segunda dose, os níveis de testosterona sérica do grupo de animais que recebeu a vacina comercial (G2) reduziram drasticamente, se igualando ao grupo que foi castrado cirurgicamente (G1) até o final do experimento ($P > 0,05$), diferindo dos grupos de suínos que receberam as vacinas recombinantes experimentais que obtiveram níveis séricos superiores de testosterona ($P < 0,05$). O grupo de suínos que receberam a Vacina GnRH 1 (G3), obteve um aumento significativo no momento final do experimento (D105), quando comparado ao grupo de animais que receberam a vacina GnRH 2 (G4) ($P < 0,05$).

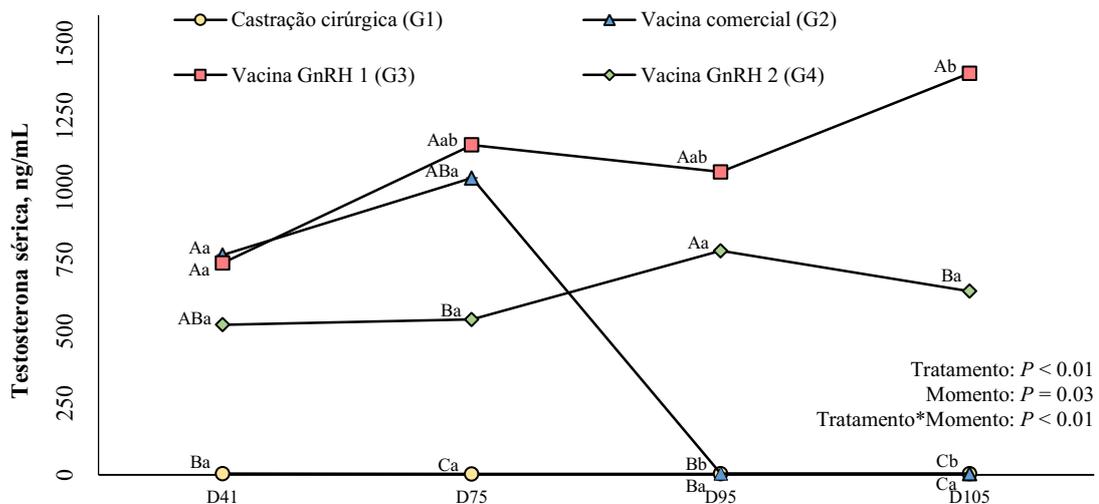


Figura 2. Níveis séricos de testosterona de leitões submetidos à castração cirúrgica (aos 7 dias de vida) ou imunológica (aos 100 e 135 dias de vida) com diferentes tipos de vacina anti-GnRH. Os dados representam as médias (+/- SME) por tratamento (n=8 por grupo). ^{A,B,C} indicam diferença entre os tratamentos dentro do momento de coleta ($P < 0,01$) e ^{a,b} indicam diferença entre os momentos de coleta dentro do tratamento ($P < 0,01$). DO: 1^a dia de alojamento na fase de crescimento e terminação. D41 e D75: momentos de aplicação da 1^a e 2^a dose de vacina, respectivamente.

A Figura 3 demonstra o efeito da interação entre tratamento e momento de avaliação dos leitões ($P < 0,05$) e o volume testicular ($P < 0,05$). No D41, os valores médios do volume testicular foram semelhantes entre os três grupos de suínos que receberam as vacinas ($P > 0,05$).

No D75, foi observado um aumento no volume testicular em comparação com o D41 nos grupos de suínos 3 e 4 ($P < 0,05$). O volume testicular dos animais dos Grupos 3 e 4 aumentou mesmo após a administração da segunda dose de vacina, atingindo valores 3 a 4 vezes maiores do que os observados para o Grupo 2 no D95.

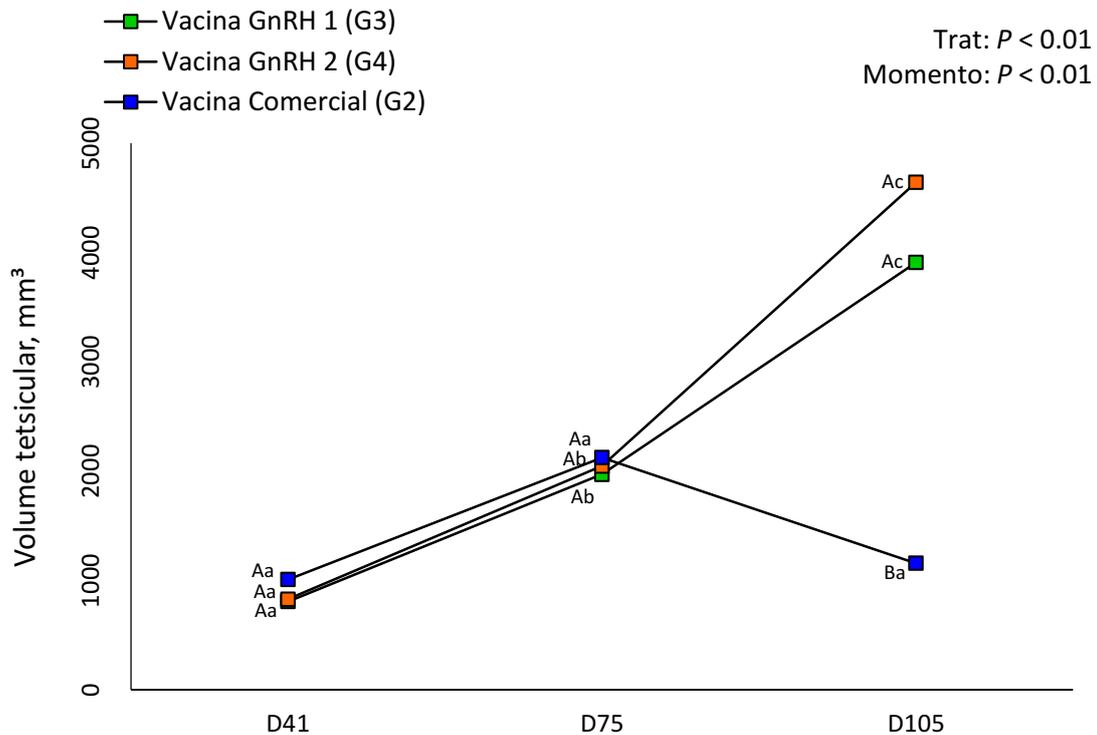


Figura 3. Volume testicular mensurado em leitões submetidos a castração imunológica (aos 100 e 135 dias de vida) com diferentes tipos de vacina anti-GnRH. Os dados representam as médias (+/- SME) referente a cada tratamento ($n=8$ por grupo). ^{A,B} indicam diferença entre os tratamentos dentro do momento da mensuração e ^{a,b,c} indicam diferença entre os momentos da mensuração dentro do tratamento ($P < 0,05$). D41 e D75: momentos de aplicação da 1ª e 2ª dose de vacina, respectivamente.

Quanto aos estudos de comportamento sexual, foram observados o comportamento e alterações quanto a brigas e agressividade, montas contínuas, comportamento sexual ativo, escroto avermelhado e testículos aumentados de tamanho. Em relação a esses parâmetros, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Em relação ao desafio da aplicação do GnRH, os resultados revelaram diferenças significativas nos níveis de testosterona entre os grupos antes e depois da administração de Acetato de Buserelina, (Fig.4). Foi possível observar que antes e depois do desafio, os suínos castrados cirurgicamente e aqueles que receberam a vacina comercial apresentaram níveis séricos mais baixos de testosterona em comparação aos grupos de suínos que receberam as vacinas experimentais recombinantes de GnRH ($P < 0,01$). Após o tratamento, os grupos de

animais que receberam a vacina comercial e a GnRH 1 apresentaram aumento nos níveis de testosterona, em relação ao primeiro momento ($P < 0,01$). Já o grupo de animais que receberam a vacina GnRH 2 não apresentaram diferença nos níveis séricos de testosterona antes e após a aplicação de Acetato de Buserelina.

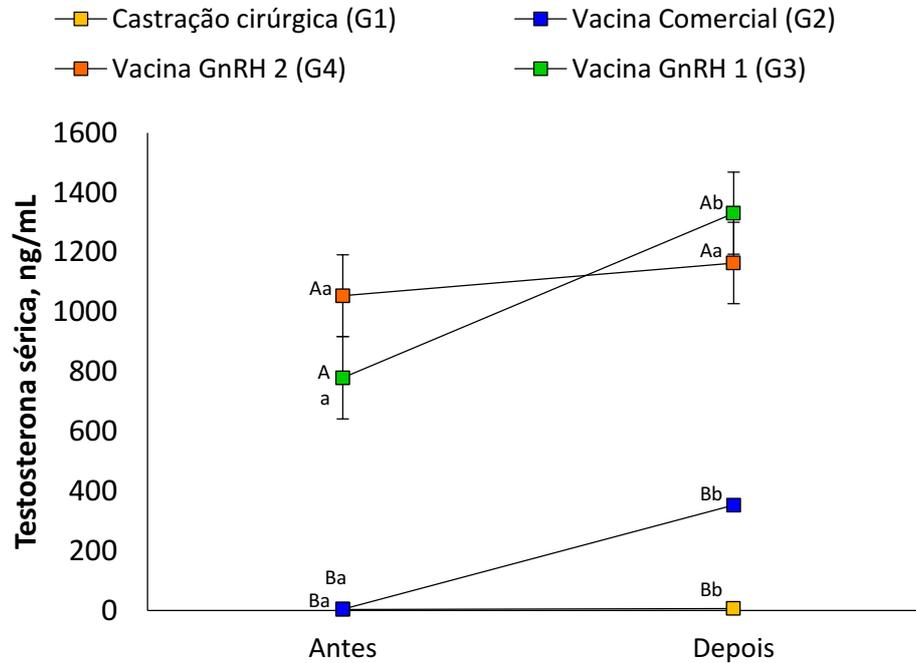


Figura 4. Níveis séricos de testosterona de suínos castrados e desafiados com Acetato de Buserelina antes e depois da da segunda dose da vacina (D95). Os dados representam as médias (+/- SME) referente a cada tratamento (n=8 por grupo). ^{A,B} indicam diferença entre os tratamentos dentro do momento da mensuração e ^{a,b} indicam diferença entre os momentos da mensuração dentro do tratamento ($P < 0,05$). “Antes” equivale a mensuração antes da aplicação do GnRH e “Depois” equivale ao momento 2 horas depois da aplicação de GnRH.

Em relação às avaliações histológicas dos testículos a análise dos resultados demonstraram 93% de correlação entre os dois avaliadores em relação aos três tratamentos ($P < 0,001$). E a análise de confiabilidade geral dos dados revelou um coeficiente Kappa entre 0,71 a 0,88 com índice de confidencialidade (IC) de 0,79 indicando uma boa concordância entre os avaliadores.

Tabela 4. Frequência de escores de lesões testiculares dos suínos submetidos a imunocastração independente da vacina utilizada.

| Classificação geral | Avaliador 1 | | | | Kappa | P | IC* |
|---------------------|-------------|----------|----------|----------|-------|--------|-----------|
| | Escore 1 | Escore 2 | Escore 3 | Escore 4 | | | |
| Avaliador 2 | | | | | 0,79 | 0,2911 | 0,71-0,88 |
| Escore 1 | - | - | - | - | | | |
| Escore 2 | 18 | 7 | - | - | | | |
| Escore 3 | - | 26 | 2 | - | | | |
| Escore 4 | - | 1 | 33 | 4 | | | |

*IC: índice de confiabilidade.

Em relação aos resultados de acordo com os tratamentos a análise de confiabilidade revelou um Kappa de 0,73 para o grupo 1, de 0,75 para o grupo 2 e 0,76 para o grupo 3 com IC que variou de 0,53 a 0,95 dependendo do tratamento (Tabela 5).

Foi possível notar na somatória das frequências que para o grupo de suínos submetidos a vacina comercial, para ambos os avaliadores, somente foram observados os escores 3 e 4 (grau moderado e severo, respectivamente) para as lesões testiculares, diferindo das vacinas recombinantes. Todavia, observando as lesões do tecido testicular do grupo de animais submetidos a aplicação da vacina GnRH 1, os escores mais frequentes foram o 3 (grau moderado), enquanto para o grupo que recebeu a vacina GnRH 2 foram observados com mais frequência os escores 1 e 2 (grau discreto e leve) de lesões testiculares. A figura 5 mostra os escores de lesões testiculares de acordo com a vacina aplicada nos suínos do estudo.

Tabela 5. Frequência de escores de lesões testiculares dos suínos submetidos a imunocastração de acordo com as vacinas utilizadas.

| Classificação geral | Avaliador 1 | | | | Kappa | P | IC* |
|---------------------|-------------------------|----------|----------|----------|-------|--------|-----------|
| | Escore 1 | Escore 2 | Escore 3 | Escore 4 | | | |
| Avaliador 2 | | | | | | | |
| | Vacina Comercial | | | | | | |
| Escore 1 | - | - | - | - | | | |
| Escore 2 | - | - | - | - | 0,73 | 1,000 | 0,53-0,93 |
| Escore 3 | - | - | 18 | 3 | | | |
| Escore 4 | - | - | 3 | 21 | | | |
| | Vacina GnRH 1 | | | | | | |
| Escore 1 | 5 | 3 | - | - | | | |
| Escore 2 | 13 | 2 | - | - | 0,75 | 0,5438 | 0,58-0,91 |
| Escore 3 | - | - | 11 | 1 | | | |
| Escore 4 | - | - | 1 | 4 | | | |
| | Vacina GnRH 2 | | | | | | |
| Escore 1 | 13 | 4 | - | - | | | |
| Escore 2 | - | 13 | - | - | 0,76 | 0,1718 | 0,58-0,95 |
| Escore 3 | - | 1 | 4 | - | | | |
| Escore 4 | - | - | - | - | | | |

*IC: índice de confiabilidade.

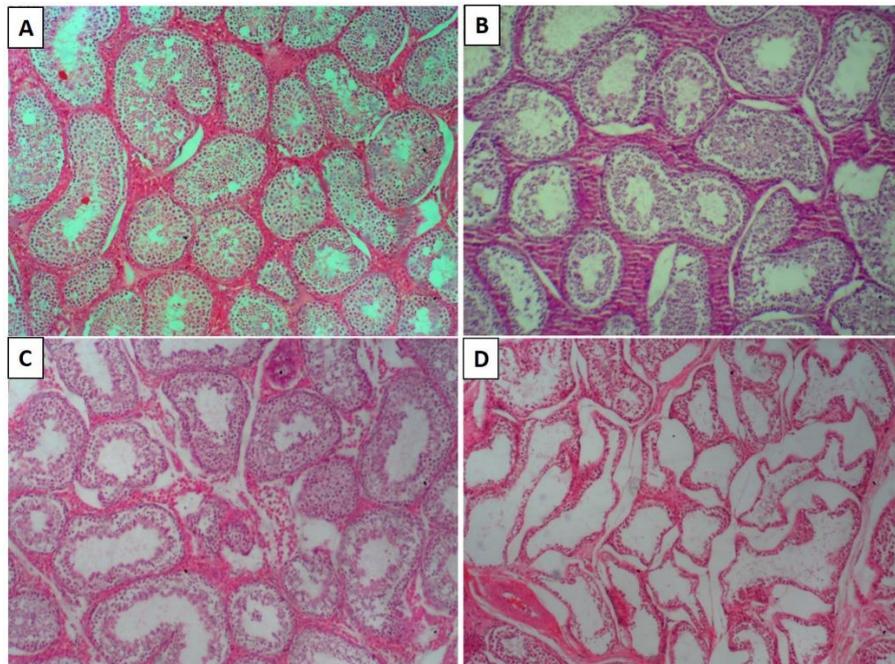


Figura 5. Fotomicrografia de escore de lesões testiculares dos suínos submetidos a diferentes vacinas para imunocastração. A. Escore 1: GnRH 2. B. Escore 2: GnRH 2. C. Escore 3: GnRH 2. Escore 4: Vacina Comercial. Aumento de 4 X.

3.4 Discussão

Os resultados de resposta humoral produzido pelas vacinas deste estudo demonstraram que todos os grupos de suínos imunocastrados responderam às vacinas com níveis de anticorpos anti-GnRH significativos superiores aos controles (castrados). A resposta vacinal pode ser detectada já com a primeira dose, de ~5.5 para G2, ~9.7 para G3 e ~6.3 em aumento nos níveis de IgG específica anti-GnRH comparando ao dia zero (Dia 41) (Tabela 3). Entretanto, os valores de ELISA para IgG específica anti-GnRH mais elevados foram observados 20 dias após a segunda dose vacinal (dia 95) (Tabela 3).

Em estudos avaliando os efeitos da imunização contra o GnRH em suínos machos, foi relatado um aumento significativo nos níveis de IgG anti-GnRH no logo após a primeira aplicação da vacina imunizante, indicando uma resposta imune inicial detectável contra GnRH (PINHEIRO, et al., 2019), similar ao observado no presente estudo. Wako et al., (2017) relatou que concomitante ao aumento nos níveis de anticorpos anti-GnRH observa-se alterações na função reprodutiva e nos níveis de testosterona sérica. Esses resultados sugerem que a primo sensibilização vacinal é uma parte importante da eficácia da imunocastração em suínos machos. No presente estudo constatamos a importância da primo vacinação, sendo que observamos um aumento significativo ($p < 0.05$) nos níveis séricos de IgG específica anti-GnRH nos grupos G2, G3 e G4, 20 dias após a primeira dose. Sendo que os níveis mais elevados foram detectados 20 dias após a segunda dose e se mantiveram elevados até a última análise dia D105 (30 dias após a segunda dose) do experimento (Tabela 3).

Esses dados corroboram outros estudos relatados na literatura, onde a imunocastração ocorre ao induzir elevados níveis de anticorpos anti-GnRH, sugerindo que os anticorpos específicos anti-GnRH neutralizem a ação do GnRH (COLAZO & HAYIRLI, 2008; VOLDERS, et al., 2018). Contudo, neste estudo, os níveis de anticorpos produzidos pelas vacinas experimentais recombinantes não foram capazes de reduzir os níveis séricos de testosterona similares ao da vacina comercial. Alguns fatores podem ter contribuído para estes resultados, tais como uma resposta imune inadequada, não sendo suficiente para suprimir a produção de GnRH de forma eficaz, resultando em uma produção contínua de testosterona (AMADORI, et al., 2016). Além disso, é possível considerar a variabilidade individual, como genética, idade, ambiente e o tempo necessário para eficácia total, até que ocorra a supressão hormonal de forma efetiva (FERNANDEZ, et al., 2018).

A diferença nos níveis de IgG específicos anti-GnRH pode não refletir os níveis reais observados na vacina comercial usada como controle. O antígeno recombinante usado para formular as vacinas experimentais foi o mesmo usado para o ELISA, o que pode não refletir adequadamente a quantificação dos anticorpos anti-GnRH induzidos pela vacina comercial. No entanto, Eslabão et al. (2020) mostraram que os anticorpos anti-GnRH induzidos pela vacina comercial foram capazes de reconhecer a quimera recombinante GnRH/LTB. Além disso, Khan et al. (2007) relataram que não foi possível determinar diferença nos níveis de testosterona em camundongos imunizados com os antígenos GnRH-I, GnRH-II e GnRH-III fundidos com toxoide tetânico. Assim, pode-se sugerir que os níveis de anticorpos anti-GnRH induzidos pelas vacinas experimentais em suínos não foram suficientes para bloquear o efeito do GnRH.

Vale notar que um experimento similar conduzido com camundongos com as vacinas quiméricas recombinantes GnRH/LTB, onde as vacinas experimentais induziram níveis significativamente mais altos de anticorpos específicos anti-GnRH, bem como um efeito significativo sobre as gônadas, que a vacina comercial, a mesma usada no presente estudo (ESLABÃO et al., 2020, 2021). Além disso, um ponto importante a considerar é o adjuvante do LTB que está diretamente relacionado à sua atividade de ligação ao gangliosídeo GM1 (NASHAR et al. 2001). Esse gangliosídeo é uma molécula de sinalização bem caracterizada com capacidade potente de estimular respostas de anticorpos contra antígenos co-administrados ou acoplados (YAMAMOTO *et al.* 2001; CONCEIÇÃO *et al.* 2006). No entanto, parece que as concentrações de LTB usadas na molécula quimérica não foram suficientes para atuar como único adjuvante da vacina, sendo necessários diferentes adjuvantes para induzir adequadamente uma resposta imune vacinal.

No presente estudo, as vacinas experimentais recombinantes GnRH/LTB foram adjuvadas com alumínio, enquanto nos estudos de Eslabão et al. (2020, 2021) foi utilizado um adjuvante à base de óleo (MONTANIDE ISA 50 V2, SEPPIC, França), proporcionando uma melhor resposta imune vacinal, até melhor do que a vacina comercial.

Sharma et al. (2014) relataram uma regressão gonadal não uniforme, em camundongos, imunizados com construções recombinantes de GnRH, sugerindo que esse efeito se deva ao uso de tampão fosfato como base de emulsão do antígeno. No presente estudo, ambos os antígenos das vacinas experimentais foram diluídos em PBS, assim como o PBS foi usado na formulação final para ajustar os volumes com o adjuvante. No entanto,

estava fora do escopo deste estudo avaliar esses possíveis fatores que poderiam influenciar os resultados alcançados pelas vacinas experimentais.

Em seu estudo, Duschea et al., (2001) relatou que somente após a segunda vacinação o crescimento testicular cessou e os níveis de testosterona reduziram significativamente, se mantendo pelo menos até 4 semanas após a segunda vacinação. Sendo assim, sugere-se ser necessário algum tempo após a segunda dose para que a supressão hormonal completa seja alcançada (RAJENDER, S., & SINGH, L, 2008; VINCENT, et al., 2017).

Outro fator importante a se considerar é o intervalo entre as aplicações, ou seja, cada vacina possui um intervalo conforme seu protocolo, que é determinado através de estudos científicos para definir com critério esse período. Em seu estudo utilizando vacinas anti-GnRH, Martin et al., (2020), utilizaram a primeira dose aos 84 dias e a segunda aos 154 dias de vida, com um intervalo de 10 semanas. Já Yao et al., (2018) avaliaram 3 doses com um intervalo de 2 semanas entre cada aplicação. No presente estudo, é possível que seja necessário estudos para definir o intervalo ideal entre as aplicações para um efeito considerável da vacina.

Utilizando também vacinas anti-GnRH LTB, Eslabão (2020) demonstrou redução dos níveis de testosterona sérica em camundongos, no entanto, deve-se considerar que suínos e camundongos possuem diferenças notáveis na fisiologia da reprodução. Embora os machos não experimentem um ciclo estral como as fêmeas, eles ainda estão sujeitos a flutuações hormonais, a resposta ao ciclo estral, diferenças anatômicas e na espermatogênese (KINDER & BRIESFIELD, 2007). Essas diferenças refletem as necessidades reprodutivas e o comportamento específico de cada espécie.

Deve-se considerar a forma de produção de vacinas recombinantes, uma vez que a ligação de proteínas imunogênicas do GnRH pode influenciar a qualidade da resposta imunológica, além disso, o método de castração provocar variações nas respostas de sinalização do hormônio inibidor de GnRH sobre o eixo hipotálamo-hipófise, bem como interferir no feedback negativo dos níveis de testosterona pelas gônadas (FANG et al., 2010; HAN, et al., 2017).

No presente estudo a vacina GnRH 1 (G3) foi a que apresentou maiores níveis de anti-GnRH logo após a primeira aplicação da vacina. Ao analisar os níveis de testosterona, verificou-se que, após a segunda dose da vacina, os níveis de testosterona nos grupos que receberam a vacina comercial e a vacina GnRH 2 (G4) diminuíram significativamente. No

entanto, os suínos do grupo que receberam a vacina GnRH 2 mostraram um aumento nos níveis de testosterona no momento final do experimento.

Quanto a histologia testicular, estudos indicaram que a imunocastração pode levar a uma redução do tamanho testicular por causar alterações histológicas nos testículos, como a degeneração das células espermatogênicas, diminuição significativa no diâmetro dos túbulos seminíferos e atrofia das células intersticiais endócrinas com núcleos picnóticos (STOJANOVIK, et al., 2017; SLADEK, et al., 2018). Estas mudanças são atribuídas à redução nos níveis do hormônio folículo-estimulantes (FSH) e luteinizante (LH) os quais são essenciais para a manutenção da função testicular e, conseqüentemente, a manutenção da secreção de esteroides testiculares, principalmente a testosterona (ZAMARATSKAIA, et al., 2008).

O presente estudo corroborou com o encontrado por Paixão et al., (2021), que observaram que os suínos submetidos a imunocastração com a mesma vacina comercial apresentaram diminuição significativa das dimensões escrotais e alterações na morfologia testicular. Sendo assim, a vacina comercial foi mais eficaz na atrofia e lesão testicular, observada por meio das alterações histológicas. Dentre as vacinas recombinantes, o uso da vacina GnRH 1 promoveu maior frequência de lesões testiculares moderada a grave (escores 3 e 4) nos suínos que a vacina GnRH 2 quando comparada ao GnRH 2, sendo assim, sugerindo que a vacina recombinante GnRH 1 apresentou maior eficácia.

Com base nos dados apresentados, fica claro que a vacina GnRH 1 resultou em maiores níveis de anti-GnRH na primeira aplicação e redução significativa dos níveis de testosterona em comparação a vacina GnRH 2 no momento final do experimento (D105). Os níveis de testosterona corroboraram com os resultados encontrados na histologia testicular, visto que a vacina GnRH 1, obteve maiores níveis de lesão testicular. Além disso, a vacina GnRH 1 apresentou os melhores resultados quanto ao tônus testicular, sendo semelhante a vacina comercial. Isso sugere que, apesar de possíveis diferenças na eficácia imunológica entre as vacinas GnRH 1 e 2, a vacina GnRH 1 foi mais eficaz em suprimir os níveis de testosterona nos suínos ao longo do tempo.

Essa diferença nos resultados entre as duas vacinas pode ser atribuída às diferenças em sua composição e método de produção. Algumas vacinas, como a vacina GnRH 1, geralmente contêm antígenos bacterianos específicos, que podem estimular uma resposta imune mais robusta e duradoura, enquanto outras vacinas podem conter antígenos mais

refinados e concentrados, podendo ser menos eficazes na indução de uma resposta imune forte (ESLABÃO, 2020).

Neste estudo foi realizado o desafio de GnRH para comprovação dos resultados dos níveis séricos de testosterona, e este teste é utilizado para avaliar a função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o qual regula a produção de hormônios sexuais, avaliando a função gonadal através de a administração de GnRH IM e a medição dos níveis séricos de hormônios gonadotróficos, como a testosterona em dois momentos, antes e após a aplicação (CARR et al., 1989).

No presente estudo, os resultados de desafio para o GnRH mostraram que animais submetidos à castração cirúrgica, vacina comercial e a vacina GnRH 1 apresentaram aumento de testosterona do momento antes da primeira aplicação em relação a avaliação após a aplicação do teste. Já a vacina GnRH 2, não apresentou diferença entre os momentos, o que talvez possa demonstrar uma eficácia da GnRH 2, visto que se a castração for bem-sucedida, os níveis de testosterona após a aplicação de GnRH tendem a ser menores. Isso ocorre porque aplicação de GnRH, que normalmente estimula a produção de hormônios sexuais, não terá o mesmo efeito em suínos castrados, uma vez que os testículos não estão ativos (MARCONDES et al., 2002). Assim, é esperado que os níveis de testosterona em suínos castrados permanecem baixos mesmo após o desafio de GnRH, enquanto em suínos não castrados, os níveis de testosterona aumentam em resposta ao GnRH (JOHNSON & WANG, 2015). Porém, devemos considerar que a Vacina GnRH 1 foi a que apresentou resultados mais próximos ao da castração cirúrgica e vacina comercial, o que pode ser o esperado.

No presente estudo, não foi observado diferença quanto aos parâmetros de desempenho dos suínos submetidos aos diferentes métodos de castração. Da mesma forma estudos observaram que não houve diferença significativa no ganho de peso diário entre os grupos de suínos castrados cirurgicamente e imunocastrados (GUIMARÃES et al., 2016; SUTHERLAND et al., 2019). Os suínos imunocastrados também podem apresentar eficiência alimentar, deposição de gordura e qualidade de carne semelhantes ao de suínos inteiros (SQUIRES et al., 2007; TAVAREZ, et al., 2015). Esses achados sugerem que a imunocastração pode ser uma alternativa viável à castração cirúrgica em suínos, visto que oferecem resultados de desempenho semelhantes.

A avaliação andrológica em suínos pode oferecer informações sobre a funcionalidade testicular desses animais. De acordo com Schulzen et al., (2015) e Roça, et al., (2016) em

suínos castrados com vacinas anti-GnRH, o tônus e a mobilidade testicular podem ser diferentes em comparação a suínos inteiros. Em suínos imunocastrados, os testículos tendem a apresentar uma redução no tamanho e na firmeza em comparação a suínos inteiros, devido à supressão da função testicular resultante da imunização contra o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que reduz a produção de hormônios sexuais masculinos. Portanto, é esperado que os testículos tenham um tônus reduzido, ou seja, se apresentem mais flácidos em suínos imunocastrados.

Estudos demonstraram que a imunização contra GnRH influencia na redução significativa de testosterona em suínos machos, com concomitante diminuição do tônus testicular em comparação com os suínos não imunizados (BONNEAU, et al., 2013; GUTHRIE, et al., 2015). Sendo assim, com os resultados do presente estudo, foi possível observar que os suínos submetidos a aplicação da vacina GnRH 2 apresentaram maior tônus testicular, quando comparado aos animais que receberam a vacina comercial, e a vacina GnRH 1. Portanto, esse pode ter sido o efeito gerado pelos maiores níveis de testosterona sérica após a primeira aplicação para a vacina GnRH 2.

A mobilidade testicular é outro parâmetro andrológico que também pode ser afetada em suínos imunocastrados, pois com a redução da atividade hormonal, os testículos podem apresentar mobilidade diminuída em comparação com suínos inteiros (BATOREK, et al., 2014). No entanto, a mobilidade testicular pode variar entre os indivíduos e também pode ser influenciada por fatores como a idade e a genética, uma vez que suínos imunizados apresentaram mobilidade reduzida em comparação ao grupo controle de machos inteiros (BONNEAU, et al., 2013; GUTHRIE, et al., 2015). Neste estudo, os suínos que receberam a vacina GnRH 2 apresentaram menor mobilidade testicular em relação aos animais que receberam as outras duas vacinas. Esses dados vão em contraposto aos encontrados em relação ao tônus testicular, visto que a Vacina GnRH 2 foi a que apresentou resultados mais eficientes do que os outros grupos no parâmetro mobilidade testicular e resultados menos eficientes no parâmetro tônus testicular.

Em explicação aos resultados encontrados, Schulzen et al., (2015) relataram que a imunocastração resulta na redução da produção de hormônios sexuais masculinos, como a testosterona, afetando a função testicular, o que pode levar a testículos com maior firmeza, devido à diminuição do tamanho e da atividade hormonal, mas com menor mobilidade devido à redução da atividade fisiológica, como os resultados encontrados para Vacina GnRH

2. Além disso, Caldéron-Diáz, et al. (2018) relataram que a imunocastração pode causar mudanças na composição tecidual dos testículos, incluindo fibrose e diminuição da vascularização, o que pode afetar a mobilidade testicular sem necessariamente comprometer a firmeza do órgão.

Portanto, é possível concluir que os estudos fornecem evidências sobre a eficácia e os benefícios potenciais da imunocastração em comparação com a castração cirúrgica em suínos, destacando sua relevância para o controle do odor sexual sem alterar os ganhos de produtividade (SUTHERLAND et al., 2019; TAVAREZ, et al., 2015). Ao considerar a eficácia das vacinas anti-GnRH na redução dos níveis de testosterona, é importante levar em conta não apenas a resposta imune induzida pelas vacinas, mas também o efeito final sobre os parâmetros hormonais e reprodutivos dos animais (WAKO, et al., 2017). Porém, ainda são necessários mais estudos que permitam melhor entender a resposta imunológica obtida com estes imunógenos, bem como identificar as oportunidades de melhorias na elaboração de uma vacina recombinante que não comprometa o intuito contraceptivo para suínos.

3.5 Conclusão

Foi possível concluir que o desempenho dos suínos foi semelhante, independentemente do método de contracepção.

As vacinas experimentais produziram elevados níveis de anticorpos anti-GnRH fusionado a LTB similares à vacina comercial após a segunda dose, mantendo-se até o final do estudo. No entanto, as vacinas recombinantes (G3 e G4) foram menos eficazes na redução dos níveis séricos de testosterona, indicando que a supressão hormonal não foi eficiente quanto a obtida pela vacina comercial, apesar da alta produção de anticorpos.

O exame andrológico revelou que a mobilidade e o tônus testicular variaram significativamente entre os grupos ao longo do tempo. Sendo a mobilidade testicular significativamente menor no grupo GnRH 1, enquanto o tônus testicular apresentou-se mais firme em suínos submetidos à vacina comercial.

As avaliações histológicas confirmaram que a vacina comercial causou lesões testiculares mais graves e frequentes, corroborando com os níveis reduzidos de testosterona. O tecido testicular apresentou maior frequência de lesões com a administração da vacina comercial, no entanto a vacina GnRH 1 apresentou maior intensidade de lesões degenerativas que a vacina GnRH 2, e foi mais eficaz na supressão dos

níveis séricos de testosterona demonstrando potencial maior da vacina GnRH 1 nos principais parâmetros avaliados em relação a GnRH 2 nos suínos deste estudo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vacinas recombinantes anti-GnRH (expressos de forma recombinante com a proteína LTB da *Escherichia coli*) levaram à produção de altos níveis de anticorpos da mesma forma que a vacina comercial. No entanto, apesar de atingirem níveis semelhantes, as vacinas não foram suficientemente eficazes na redução dos níveis séricos de testosterona, tampouco no volume dos testículos.

Os resultados sugerem que, embora as vacinas experimentais GnRH possam induzir uma resposta imunológica robusta, a eficácia na supressão da produção de testosterona e na indução de lesões testiculares é variável e inferior à vacina comercial. Fatores como a composição do adjuvante e a formulação das vacinas podem ter influenciado esses resultados, indicando a necessidade de ajustes na formulação e no protocolo de aplicação para melhorar a eficácia das vacinas experimentais.

Em conclusão, enquanto a imunocastração representa uma alternativa promissora à castração cirúrgica, as vacinas experimentais precisam de melhorias para alcançar a eficácia da vacina comercial atualmente disponível. Estudos futuros devem focar em otimizar a formulação das vacinas e os protocolos de administração para garantir uma supressão hormonal eficaz e consistente nos animais tratados.

5 REFERÊNCIAS

- ABPA, 2022. **Relatório Anual 2022.** <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>.
- AHMED, S.; JIANG, X., LIU, G.; SADIQ, A.; FAROOQ, U.; WASSIE, T.; SALEEM, A. H.; ZUBAIR, M. New trends in immunocastration and its potential to improve animal welfare: a mini review. **Tropical Animal Health and Production**, 54, 369, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03348-8>.
- AMADORI, M.; RAZZUOLI, E.; BAIOCCHI, C.; FRANZO, G.; BORDONI, V.; BERTOCCHI, M.; MARTINELLO, M.; SCHIAVON, E. The application of vaccinology to manage virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. **Expert Review of Vaccines**, 15, 3, 377–386, 2016.
- BATOREK, N.; ČANDEK-POTOKAR, M.; BONNEAU, M.; VAN MILGEN, J. Meta-analysis of the effect of immunocastration on production performance, reproductive organs and boar taint compounds in pigs. **Animal**, 6, 8, 1330-1338, 2012. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000146>.
- BONNEAU, M.; DUFOUR, R.; CHOUVET, C.; ROULET, C.; MEADUS, W.; SQUIRES, E. J. Anti-gonadotropin-releasing hormone vaccination in pigs: From clinical investigation to commercial application. **Animal Reproduction Science**, 136, 3-4, 223–231, 2013.
- BONNEAU, M.; WEILER, U. Pros and Cons of Alternatives to Piglet Castration: Welfare, Boar Taint, and Other Meat Quality Traits. **Animals**, 9, 11, 884, 2019. <https://doi.org/10.3390/ani9110884>.
- CALDÉRON-DIÁZ, J. A.; KJELDSEN, N.; VALROS, A.; MUNK, O. L.; HERSKIN, M. S.; KIRKDEN, R. D.; FORKMAN, B.; AHLSTRØM, Ø.; HOLST, H.; BAKKEN, M. Cross-Fostering: Implications for Pig Mortality, Welfare and Performance. **Animal Welfare**, 27, 239-250, 2018. <https://doi.org/10.7120/09627286.27.3.239>.
- ČANDEK-POTOKAR, M.; ŠKRLEP, M.; ZAMARATSKAIA, G. Immunocastration as Alternative to Surgical Castration in Pigs. **Theriogenology**, 6, 2017. <http://doi.org/10.5772/intechopen.68650>.
- CARR, B. R.; MACDONALD, P. C.; SIMPSON, E. R. The Role of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Human Reproduction. **Endocrine Reviews**, 10, 1, 71-93, 1989. DOI: 10.1210/edrv-10-1-71.
- CHANG, X.; YANG, Y.; ZHANG, X.; WU, Z.; ZHANG, M.; CHEN, Z. Recombinant Gonadotropin-Releasing hormone vaccine inhibits reproductive function and tumor growth in rats. **International Immunopharmacology**, 90, 107129, 2021.
- COLAZO, M. G.; HAYIRLI, A. Review: Immunocastration of male animals: A review of its implications and prospects for the animal industry. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, 2, 7, 979–992, 2008.

CONCEIÇÃO, F. R., MOREIRA, Â. N., & DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, 24(29-30), 5734-5743, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.04.036>.

DORAN, E.; WHITTINGTON, F. W.; WOOD, J. D.; MCGIVAN, J. D. Cytochrome P450IIE1 (CYP2E1) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated pig hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, 140, 1, 81-92, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00015-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00015-7).

DUSCHEA, D., BRANKO, K., MILICA, Z., & IVAN, P. Effects of immunocastration on growth performance and testicular development in male pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42(2), 145-150, 2001. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-42-145>.

ESLABÃO, L. B., CONRAD, N. L., ALBUQUERQUE, P. M. M., CUNHA, R. C., PIRAINÉ, R. E. A., CORCINI, C. D., & LEITE, F. P. L. Immunocontraceptive potential of a recombinant chimeric protein composed by a single gonadotropin-releasing hormone molecule and B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in a mice model. **Biotechnology Research and Innovation**, 4, 1, e2019081, 2020. <https://doi.org/10.4322/biori.2019081>.

ESLABÃO, L. B.; CONRAD, N. L.; ALBUQUERQUE, P. M. M. de.; CUNHA, R. C.; VARELA JUNIOR, A. S.; LEITE, F. P. L. Immunogenicity of a Recombinant Gonadotropin-releasing Hormone Associated to the B Subunit of *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin Expressed in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* Platforms. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 64, 2021. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021210144>.

FANG, Z. F., WANG, L. G., & ZHANG, X. M. Immune responses and fertility control in male wild boars immunized with recombinant GnRH vaccine. **Theriogenology**, 74, 3, 425-431, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.013>.

FERNANDEZ, M. E., GAMBELÍN, M. J., VIVAS, A. B., & CASTRO, M. J. Variability in the immune response to GnRH vaccines: Influence of genetic background, environment, and the timing of vaccination. **Journal of Animal Science**, 96(7), 2737-2745. HAN, et al., 2018

GARRIDO, M. D.; EGEA, M.; LINARES, M. B.; BORRISSE-PAIRÓ, F.; RUBIO, B.; VIERA, C.; MARTÍNEZ, B. **Sensory characteristics of meat and meat products from entire male pigs**. *Meat Science*, 129, 50-53, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.011>.

GIL, L. A., CUNHA, C. E. P., MOREIRA, G. M. S. G., SALVARANI, F. M., ASSIS, R. A., LOBATO, F. C. F., MENDONÇA, M., DELLAGOSTIN, O. A., & CONCEIÇÃO, F. R. Production and evaluation of a recombinant chimeric vaccine against *Clostridium botulinum* neurotoxin types C and D. **PLoS One**, 8, 7, 1-10, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069692>.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**, UFRGS, 87p., 2002.

GUIMARÃES, S. E. F.; OLIVEIRA, H. N.; SILVA, M. V. G. B.; BARBOSA, R. L.; MERIGHE, G. K. F. Immunocastration as an alternative to traditional castration in pig production systems: A review. **Animal Reproduction Science**, 17, 2, 515-522, 2016.

GUTHRIE, H. D.; ESTIENNE, M. J.; HARPER, A. F.; KERSEY, R. D.; MAUGER, D. T.; DAY, B. N. Immunization against gonadotropin-releasing hormone in male swine: effects on production, hormonal status, and reproductive organs. **Theriogenology**, 83, 5, 750–757, 2015.

HAN, X., HUANG, W., & DENG, Y. Immunogenicity of a new recombinant GnRH vaccine in male rats. **Theriogenology**, 87, 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.002>.

JOHNSON, H.; WANG, Y. (2015). Advances in the development of GnRH vaccines for livestock. *Reproductive Biology*, 15(1), 8-17. DOI: 10.1016/j.repbio.2014.11.002.

KHAN, M. A. H., FERRO, V. A., KOYAMA, S., KINUGASA, Y., SONG, M., OGITA, K., TSUTSUI, T., MURATA, Y., & KIMURA, T. Immunisation of male mice with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes suppresses fertility in vivo. **Vaccine**, 25(18), 3544-3553, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.089>.

KINDER, J. E.; BRIESFIELD, D. Endocrine control of estrus and ovulation. In: Foxcroft, G.R.; et al. (Eds.), **Reproduction in Farm Animals Springer**, 85-102, 2007.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal Biology**, 62, 4A, 609- 614, 2002.

MARTINS, P.C.; ALBUQUERQUE, M. P.; MACHADO, I. P.; MESQUITA, A. A. Implicações da imunocastração na nutrição de suínos e nas características de carcaça. **Archivos de Zootecnia**, 62, 105-118, 2013. <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=49558826008>

MELLAGI, A.P.G.; QUIRINO, M.; OLIVEIRA, G.S.; GAGGINI, T.S.; PASCHOAL, A.F.L.; LUCCA, M.S.; ULGUIM, R.R.; BORTOLOZZO, F.P. Atualizações na avaliação andrológica em suínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 43, 2, 47-53, 2019. Disponível em: <[http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p04753%20\(RB768\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p04753%20(RB768).pdf)>.

MITJANA, O.; BONASTRE, C.; TEJEDOR, M. T.; GARZA, L.; LATORRE, M. A.; MORENO, B.; FALCETO, M. V. Immuno-castration of female and male pigs with anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine: Morphometric, histopathological and functional studies of the reproductive system. **Animal Reproduction Science**, 221, 2020. 106599. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106599>.

NASHAR, T. O., BETTERIDGE, Z. E., & MITCHELL, R. N. Evidence for a role of ganglioside GM1 in antigen presentation: Binding enhances presentation of Escherichia coli enterotoxin B subunit (EtxB) to CD4(+) T cells. **International Immunology**, 13, 4, 541-551, 2001. <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/13.4.541>.

NAUTRUP, B. P.; VAN VLAENDEREN, I.; ALDAZ, A.; MAH, C. K. The effect of immunization against gonadotropin-releasing factor on growth performance, carcass characteristics and boar taint relevant to pig producers and the pork packing industry: A meta-analysis. **Research in Veterinary Science**, 119, 182-195, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.06.002>.

OLIVEIRA, A.; FURLAN, B.; GROLLI, E.; DAL MAGRO, M.; SCHLOSSER, P.; LOCATELLI, M. L. Imunocastração em suínos - situação atual. **Inovação**, 1, 1, 2022. Disponível em: <<https://revistas.uceff.edu.br/inovacao/article/view/129/200>>.

PAIXÃO, G.; FONTELA, S. B.; MARQUES, J.; ESTEVES, A.; CHARNECA, R.; PAYAN-CARREIRA, R. Long-Term Immunocastration Protocols Successfully Reduce Testicles' Size in Bísaro Pigs. **Animals**, 11, 3, 632, 2021. DOI: 10.3390/ani11030632.

PAWLICKI, P.; GALUSZKA, A.; PARDYAK, L.; TUZ, R.; PŁACHNO, B.J.; MALOPOLSKA, M.; DUBNIEWICZ, K.; YANG, P.; KOTULA-BALAK, M.; TARASIUK, K. Leydig Cells in Immunocastrated Polish Landrace Pig Testis: Differentiation Status and Steroid Enzyme Expression Status. **International Journal of Molecular Sciences**, 23, 11, 6120, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23116120>.

PERROCA, MG., GAIDZINSKI, R.R. Avaliando a confiabilidade interavaliadores de um instrumento para classificação de pacientes - coeficiente Kappa. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, 37, 1, 72-80. 2003.

PFIZER ANIMAL HEALTH. **IMPROVAC® Mode of Action**, Technical Bulletin, 2008.

PINHEIRO, L. F.; SILVA, M. R. G.; PINHEIRO, J. P. J.; FERREIRA, D. O.; MELO, M. M. Anti-Gonadotropin-Releasing Hormone Immunocastration in Swine. **Frontiers in Veterinary Science**, 6, 445, 2019.

PRUNIER, A.; BONNEAU, M.; VON BORELL, E.H.; CINOTTI, S.; GUNN, M.; FREDRIKSEN, B.; GIERSING, M.; MORTON, D. B.; TUYTTENS, F. A. M.; VELARDE, A. A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. **Animal Welfare**, 15, 3, 277-289, 2023.

PTASZYNSKA, M. **Compêndio de Reprodução Animal**. Intervet. 399p., 2007.

RAJENDER, S.; SINGH, L. PCR-based markers for the screening of Y-chromosomal microdeletions in infertile men. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1135, 1, 23–31, 2008.

REITER, S.; ZÖLS, S.; RITZMANN, M.; STEFANSKI, V.; WEILER, U. Penile Injuries in Immunocastrated and Entire Male Pigs of One Fattening Farm. **Animals**, 7, 9, 71, 1-7, 2017. <https://doi.org/10.3390/ani7090071>.

ROÇA, R. O.; ASSIS, G. A.; SILVA, T. P.; AMORIM, R. L. A review of boar taint and the feasibility of its elimination. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 53, 4, 377–387, 2016.

SAMOILIUK, V. V.; KOZIY, M. S.; BILYI, D. D.; MASLIKOV, S. M.; SPITSINA, T. L.; GALUZINA, L. I. Effect of immunological castration of male pigs on morphological and functional condition of the testicles. **Regulatory Mechanisms in Biosystems**, 12, 1, 20-26, 2021. <https://doi.org/10.15421/022104>.

- SCHULZEN, J.; SCHULZEN, F.; EINARSSON, S.; ZAMARATSKAIA, G. Evaluation of Immune Responses against GnRH and Their Effects on Endocrine and Testicular Functions in Male Rats and Boars. **Journal of Reproduction and Development**, 61, 4 339–345, 2015.
- SHARMA, S., MCDONALD, I., MILLER, L., & HINDS, L. A. Parenteral administration of GnRH constructs and adjuvants: Immune responses and effects on reproductive tissues of male mice. **Vaccine**, 32, 5555-5563, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.075>.
- SLADEK, Z.; PRUDIKOVA, M.; KNOLL, A.; KULICH, P.; STEINHAUSEROVA, I.; BORILOVA, G. Effect of early immunocastration on testicular histology in pigs. **Veterinární medicína**, Czech Academy of Agricultural Sciences, 63, 1, 18-27, 2018.
- SQUIRES, E. J.; GONYOU, H. W.; FISHER, A. D.; TAIT, R. G.; DIXON, W. T. Effect of immunization against gonadotropin-releasing factor (GnRF) on testicular development, feedlot performance, and carcass traits of beef bulls. **Journal of Animal Science**, 85, 5, 1201–1206, 2007.
- STOJANOVIC, S.; USCEBRKA, G.; ZIKIC, D.; STUKELJ, M. Histological and Morphometric Examination of the Testes of Boars and Male Pigs Immunocastrated with Improvac®. **Acta Scientiae Veterinariae**, 45, 1, 7, 2017. <http://doi.org/10.22456/1679-9216.80582>.
- SUTHERLAND, M. A.; SALAK-JOHNSON, J. L.; MCGLONE, J. J. Immunocastration in Swine. In: Advances in Pig Welfare, **Woodhead Publishing**, 235-252, 2019.
- TAVAREZ, R., POWELL, T., & CAMPBELL, R. Effects of immunocastration on carcass and meat quality in male pigs. **Meat Science**, 108, 151-157, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.017>
- VINCENT, S. E.; MCDONALD, P. G.; PRATT, R.; CAPALDO, N. D.; PROULX, S. R. Immunization against gonadotropin releasing hormone results in transient reduction in food intake and increased body weight gain in male rats. **Physiology & Behavior**, 174, 96–103, 2017.
- VOLDERS, M.; TUYTTENS, F. A. M.; VERBIEST, S.; GEERS, R. An economic comparison of surgical castration and vaccination against gonadotropin-releasing factor in Belgian pig production systems. **Veterinary Journal**, 233, 34-43, 2018.
- VON BORELL, E.; BAUMGARTNER, J.; GIERSING, M.; JÄGGIN, N.; PRUNIER, A.; TUYTTENS, F. A.; EDWARDS, S. A. Animal welfare implications of surgical castration and its alternatives in pigs. **Animal**, 3, 11, 1488-1496, 2009. <https://doi.org/10.1017/S1751731109004728>.
- WAKO, K.; HASHIZUME, T.; MIYAMOTO, A.; HASEGAWA, T. Immunization against Gonadotropin Releasing Hormone: Effects on Endocrine and Testicular Functions, Immunoreactivity, and Efficacy in Rats and Boars. **Journal of Veterinary Medical Science**, 79, 10, 1691–1698, 2017.
- WITHOEFT, J.A.; CHIOCCA, M.; SANTIANI, F.; LEONARDO SILVA DA COSTA, L.S.; MATEUS, K.A.; DOS SANTOS, M.R.; CASAGRANDE, R.A.; CUCCO, D.C. Avaliação anatomopatológica de testículos de bovinos (*Bos taurus*) superprecoces submetidos a imunocastração. **Acta Scientiae Veterinariae**, 47, 1695, 2019.

YAMAMOTO, M., MCGHEE, J. R., HAGIWARA, Y., OTAKE, S., & KIYONO, H. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. **Scandinavian Journal of Immunology**, 53(3), 211-217, 2001. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3083.2001.00883.x>.

ZAMARATSKAIA, G.; RYDHMER, L.; ANDERSSON, H. K.; CHEN, G.; LOWAGIE, S.; ANDERSSON, K.; LUNDSTRÖM, K. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on hormonal profile and behaviour of male pigs. **Animal Reproduction Science**, 108, 1-2, 37-48, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.001>.

ZANATA, F. A.; FREITAS, P. V. D. X.; ALMEIDA, E. M.; ZANATA, R. A. BARBOSA, L. M.; RIBEIRO, F. M.; CARVALHO, T. A. Imunocastração em suínos. **Revista Científica Rural**, v. 20, n.1, 2018. <https://revistas.uceff.edu.br/inovacao/article/view/129>.

ZOELS, S.; REITER, S.; RITZMANN, M.; WEIß, C.; NUMBERGER, J.; SCHÜTZ, A.; LINDNER, P.; STEFANSKI, V.; WEILER, U. Influences of Immunocastration on Endocrine Parameters, Growth Performance and Carcass Quality, as Well as on Boar Taint and Penile Injuries. **Animals**, 10, 2, 346, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10020346>.

ZOETIS. VIVAX: **A tecnologia inovadora.** 2024. Disponível em: <https://www.improvac.com/br/>. Acesso em: 14 abr. 2024.