

MONITORAGGIO DELL'EFFICACIA DELLA CASTRAZIONE CHIMICA ED IMMUNOLOGICA DEL VERRO

MONITORING THE EFFICACY OF CHEMICAL AND IMMUNOLOGIC CASTRATION IN BOARS

TONON F.^{1,3}, LUCCARDA S.², STELLETTA C.³, VENCATO J.³, ROMAGNOLI S.³

¹ *Suivet*; ² *Libero professionista*; ³ *Dipartimento MAPS, Università di Padova*

Parole chiave: castrazione immunologica, castrazione chimica, vero, efficacia

Key words: Immunological castration, chemical castration, boar, efficacy

Riassunto

Sono stati valutati gli effetti della somministrazione di deslorelin e di un vaccino contro il GnRH nei verri fino al 120 giorno dopo trattamento. I verri sono stati scelti di età differenti (120, 195, 280 giorni), e suddivisi in tre gruppi di trattamento (Deslorelin, Vaccino, e controllo). Sono stati effettuati due metodi di monitoraggio attraverso l'applicazione del test di stimolo con analogo del GnRH e con la citologia testicolare. I risultati indicano un blocco della funzionalità testicolare nel caso del deslorelin e l'esigenza di integrare il protocollo con ulteriori richiami dopo il 90° giorno dalla seconda dose vaccinale.

Abstract

Effects of deslorelin and a vaccine anti-GnRH were evaluated on boars up to 120 days after treatments. Boars were at different age at the starting time (120, 195 and 280 days) and subdivided in three groups of treatment (Deslorelin, Vaccine, Control). Two monitoring methods were applied using GnRH challenge test and testicular cytological evaluation. Results indicate a testicular functionality block on the case of deslorelin implant while it could be useful to consider subsequent doses after 90 days from the end of anti-GnRH vaccine protocol.

INTRODUZIONE

La castrazione chirurgica rappresenta molto spesso una necessità per garantire al consumatore determinate caratteristiche organolettiche delle carni e dei prodotti a base di carne suina; nonché per agevolare l'allevamento del suino riducendone l'aggressività e il comportamento sessuale nei soggetti maschi. Questa pratica zootecnica a livello europeo è in diminuzione come si evince dalla lettura di due report eseguiti all'interno della UE a pochi anni di distanza (Fredriksen *et al.* 2009; Kallas *et al.* 2013). La spinta per un superamento di questa pratica nasce dall'ormai provato stato di forte stress e dolore (Hay *et al.*, 2003), causato al suinetto da tale metodica. Dal 2009 è in commercio in Europa l'Improvac®, un vaccino in grado di immunizzare i suinetti contro il GnRH endogeno. Il prodotto è costituito da una molecola di GnRH di sintesi senza attività farmacologica, incapace cioè di legarsi ai recettori specifici, coniugata con il tossoide difterico. Il tossoide deriva dalla tossina difterica prodotta da *Corynebacterium Diphtheriae* trattata affinché perda la sua tossicità conservando al contempo la sua immunogenicità. Poiché il titolo anticorpale tende a scendere sotto il livello minimo dopo 6-8 settimane dalla seconda iniezione e di conseguenza si ha una risalita dei livelli di testosterone che indicano una ripresa funzionale del testicolo (Wicks *et al.*, 2013); lo schema vaccinale indicato dalla casa produttrice non è applicabile nell'allevamento del suino pesante (180 kg e 9 mesi di vita circa) caratteristico del nostro paese. Seguendo tale schema infatti il

tempo intercorrente tra la seconda iniezione e la macellazione sarebbe di gran lunga superiore alle 6-8 settimane; anche la possibilità di posticipare la seconda dose vaccinale presenta evidenti difficoltà dovute all'aumento dell'aggressività ed il raggiungimento della maturità sessuale. Risulta opportuno pertanto, prevedere una terza dose vaccinale aggiuntiva per mantenere i livelli anticorpali sopra il livello protettivo come già sperimentato da Bilskis *et al.* (2012).

Il deslorelin è un super agonista del GnRH (Suprelorin®, Virbac) 100 volte più potente del GnRH endogeno; attualmente in commercio per l'induzione temporanea della infertilità maschile nel cane e nel furetto. Il Suprelorin® si presenta come un impianto a lento rilascio da inserire sottocute, disponibile in due concentrazioni: 4.7 mg e 9.4 mg. Il deslorelin agisce provocando l'internalizzazione e la degradazione dei recettori del GnRH presenti nelle cellule gonadotrope dell'ipofisi anteriore (down regulation) senza un aumento compensatorio della loro sintesi. Questo fenomeno è dovuto al continuo stimolo recettoriale provocato dal costante rilascio di deslorelin dall'impianto sottocutaneo che sostituisce il rilascio pulsatile del GnRH ipotalamico. Conseguenza del trattamento con il deslorelin è l'interruzione della funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadico tramite la mancata sintesi e secrezione di LH ed FSH a livello ipofisario ed il blocco della spermatogenesi a livello di spermatogoni (Kauffold *et al.*, 2010). L'utilizzo di questo principio attivo nel suino maschio, allo scopo di prevenire l'odore di verro bloccando la produzione di testosterone, è stato sperimentato da Kauffold *et al.* (2010); precedentemente Kopera *et al.* (2008, 2009) avevano condotto degli studi circa le alterazioni morfofunzionali nelle cellule testicolari e l'immunolocalizzazione dei recettori per gli androgeni a livello testicolare ed epididimale in suini trattati con deslorelin. Nel loro studio Kauffold *et al.* hanno impiantato intramuscolarmente con Suprelorin® 4.7mg 5 suini maschi di 5 settimane di vita per valutare gli effetti sulla funzionalità sessuale. La crescita testicolare è stata marcatamente ridotta rispetto ai suini del gruppo controllo e sia la steroidogenesi che la spermatogenesi risultavano sopresse in 4 dei 5 suini a 26 e 27 settimane di vita. Il 5° suino aveva mostrato una ripresa della crescita testicolare a 17 settimane di vita, alti livelli ormonali a 26 e 27 settimane al momento dei prelievi e una ripresa della spermatogenesi a 34 settimane.

L'ipotetico vantaggio, derivante dall'utilizzo di questo prodotto, starebbe nella necessità di trattare una sola volta i suinetti anziché le due-tre volte necessarie per l'Improvac; evitando lo stress ed il dolore causati dalla castrazione chirurgica. Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'efficacia della castrazione chimica con Deslorelin e immunologica con vaccino anti GnRH attraverso l'applicazione di un metodo integrato di monitoraggio basato sulla risposta allo stimolo con analoghi del GnRH e sulla citologia testicolare.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 9 suini maschi provenienti da allevamenti industriali. L'età ed il peso dei singoli capi all'inizio dell'esperimento erano rispettivamente di: \approx 120d e 50kg per i capi n° 1-4-7; \approx 195d e 100kg per i capi 2-5-8; \approx 280d e 160kg per i capi 3-6-9. I 9 suini sono stati accasati in due box che comprendevano un'area interna ed una più piccola esterna e marchiati sul dorso con un numero identificativo progressivo da 1 a 9. I suini sono stati divisi in tre gruppi di trattamento, ciascuno dei quali composto da un individuo per ognuna delle tre classi di età sopra elencate. Il terzo gruppo, denominato "controllo" non ha ricevuto trattamenti. All'inizio della monitoraggio i gruppi erano così composti: Gruppo 1, deslorelin: n° 1 (120 d), n° 2 (195 d), n° 3 (280 d); Gruppo 2, Improvac: n° 4 (120 d), n° 5 (195 d), n° 6 (280 d); Gruppo 3, controllo: n° 7 (120 d), n° 8 (195 d), n° 9 (280 d).

Durante il primo giorno di monitoraggio (d 0) a tutti i suini è stato fatto un test di stimolo

della funzionalità testicolare (GnRH challenge test) consistente nel prelievo di un campione di 5 cc di sangue alla giugulare, la successiva somministrazione di 2 cc di buserelin (Dalmarelin® Fatro), ed un ulteriore prelievo a 60 minuti dalla somministrazione. Al gruppo deslorelin è stato impiantato l'impianto nel sottocute del padiglione auricolare destro. Al gruppo Improvac è stata somministrata la prima delle tre iniezioni previste e nel gruppo controllo si è proceduto con la castrazione chirurgica mediante anestesia sul suino n° 7 lasciando interi i restanti due che sarebbero stati castrati successivamente, permettendoci così di avere nel gruppo controllo dei soggetti con livelli di testosterone fisiologici. Il gruppo Improvac ha ricevuto la seconda dose di vaccino a 1 mese e la terza a 4 mesi. Durante i 5 mesi di monitoraggio si è proceduto alla raccolta di campioni ematici, prelevati alla giugulare mediante vacutainer, con cadenza settimanale nel primo mese e quindicinale nei mesi successivi. Il test di stimolo della funzione testicolare con la buserelina è stato effettuato al t 0 e di seguito con cadenza mensile. A 3 mesi dall'inizio del monitoraggio è stato eseguito su ciascun suino l'esame citologico ago aspirato con ago sottile. Per eseguire la TFNAC un ago butterfly da 21G, collegato ad una siringa da 20ml, è stato inserito nel testicolo e si è raccolto del materiale su più piani spostando la butterfly. Il materiale raccolto è stato strisciato su vetrino, è stato colorato con May-Grunwald Giemsa modificata ed esaminato al microscopio ottico. Per ogni vetrino sono state contate almeno 200 cellule spermatogeniche e 200 cellule del Sertoli. Per ogni campione sono stati calcolati i seguenti dati: frequenza relativa di ogni cellula della spermatogenesi; SI (indice spermatico): percentuale di spermatozoi sul totale delle cellule spermatogeniche; SEI (indice sertoliano): percentuale delle cellule del Sertoli sul totale delle cellule spermatogeniche; SSEI (indice spermatico/sertoliano): percentuale di spermatozoi sulle cellule del Sertoli. I suini numero 8 e 9 sono stati castrati chirurgicamente sotto anestesia al 3 mesi dall'inizio del monitoraggio.

RISULTATI

I risultati dell'andamento della testosteronemia basale sono riportati nei grafici 1 mentre il confronto della risposta al GnRH challenge test viene riportato in grafico 2. In tabella 1 vengono riportati i risultati della citologia testicolare.

Grafico 1. Livelli di testosteronemia basale di suini interi, castrati chimicamente e immunologicamente durante 5 mesi di monitoraggio.

Graphic 1. Basal Testosterone levels of immunological, chemical castrated and control boars during 5 months of monitoring.

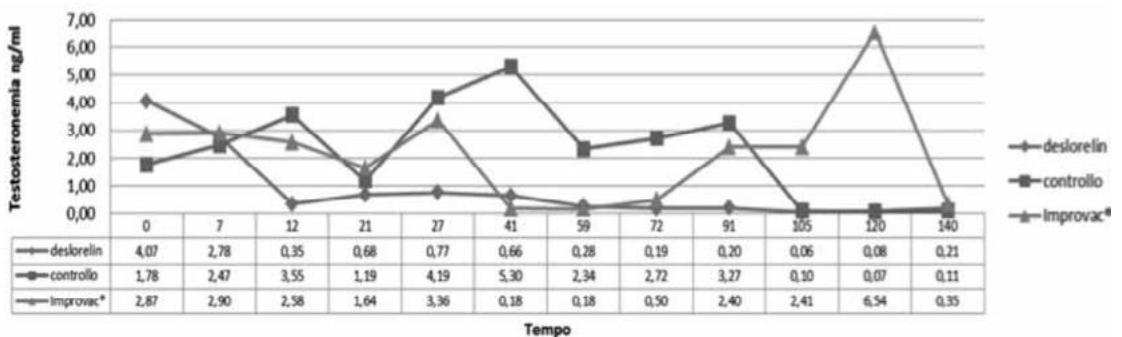


Grafico 2. Confronto della risposta al GnRH challenge test di suini castrati immunologicamente, chimicamente e interi

Graphic 2. Comparison of responses to GnRH challenge test of control, immunological and chemical castrated boars

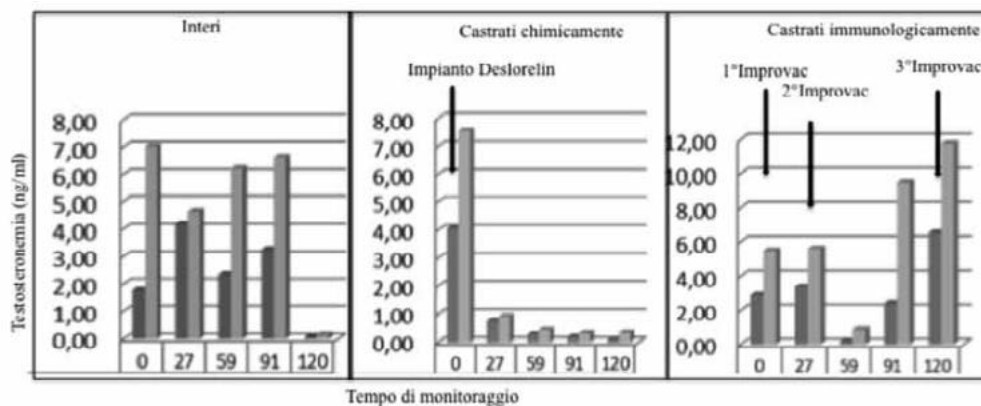


Tabella 1. Valori (media \pm e.s.m.) delle cellule spermatogenetiche nei gruppi di suini interi, castrati immunologicamente e chimicamente.

Trattamenti	Spermatogoni	Spermatociti primari	Spermatociti secondari	Spermatidi ab	Spermatidi cd	SI	SEI	SSEI
Deslorelin	8,71 \pm 2,86	75,12 \pm 10,77 ^a	12,34 \pm 7,36 ^a	2,14 \pm 2,14	1,68 \pm 0,82 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	1,58 \pm 0,92	0,00 \pm 0,00 ^a
Improvac	5,77 \pm 3,11	21,07 \pm 7,96 ^b	6,41 \pm 3,64 ^{ab}	14,92 \pm 4,22	12,84 \pm 3,32 ^{ab}	38,98 \pm 7,80 ^b	12,32 \pm 3,78	198,58 \pm 58,43 ^{ab}
Controllo	3,11 \pm 0,84	19,07 \pm 3,56 ^b	1,81 \pm 0,36 ^b	15,13 \pm 3,41	14,70 \pm 2,55 ^b	46,18 \pm 3,82 ^b	31,17 \pm 10,05	332,67 \pm 55,73 ^b

Lettere differenti (a,b) indicano una differenza significativa ($P < 0,05$) tra i gruppi.

DISCUSSIONE

I verri 8 e 9 del gruppo controllo presentano una testosteronemia basale variabile ma senza una chiara tendenza all'aumento o alla diminuzione i cui valori medi sono simili a quelli rilevati da altri Autori in suini interi usati come controllo (Kauffold et al., 2010; Lealiifani et al., 2011; Kubale et al., 2013; Dunshea et al., 2001; Zamaratskaia et al., 2008; Wicks et al., 2013). Al 3° mese, i soggetti 8 e 9 sono stati castrati chirurgicamente e si nota un crollo del testosterone ematico a livelli tipici dei soggetti castrati (Kauffold et al., 2010; Turkstra et al., 2011; Dunshea et al., 2001; Zamaratskaia et al., 2008). Per tutta la durata del monitoraggio, ad eccezione dell'inizio, il suino numero 7 mostra una testosteronemia basale coerente con

quella dei soggetti castrati (Kauffold et al., 2010; Turkstra et al., 2011; Dunshea et al., 2001; Zamaratskaia et al., 2008).

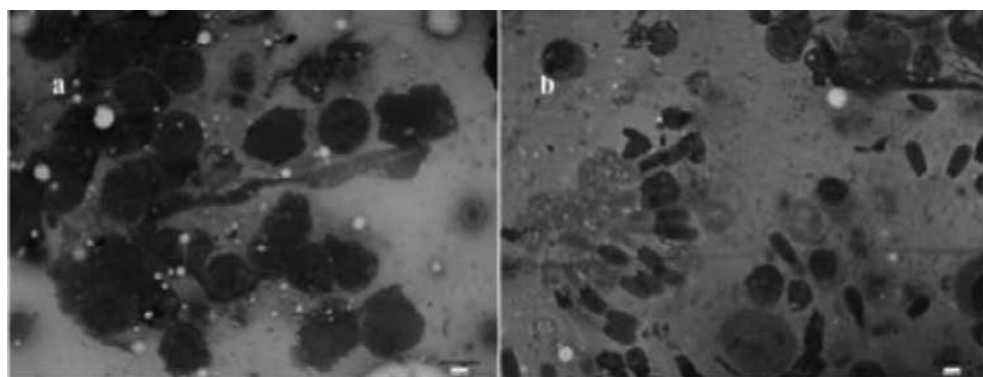
Nel gruppo deslorelin l'andamento della testosteronemia durante il monitoraggio si discosta sensibilmente rispetto al gruppo controllo mostrando un rapido e significativo declino tra 0 e il 12° giorno dove raggiunge un valore medio inferiore ad 1 ng/ml per poi stabilizzarsi per tutto il successivo periodo di monitoraggio. I livelli di testosteronemia basale registrati al 12° giorno al 120° giorno sono simili ai valori riportati da Kauffold et al. (2010). I risultati del test di stimolo nel gruppo deslorelin mostrano a t0 valori analoghi a quelli del gruppo controllo mentre a partire dal test di stimolo effettuato al 27° giorno e per i successivi si nota che la testosteronemia a 60' dalla somministrazione dell'agonista buserelin non supera mai il valore di 1 ng/ml mostrando anzi lievissimi incrementi non significativi indicanti una soppressione della funzionalità testicolare. Il gruppo Improvac® ha ricevuto le tre dosi vaccinali agli 0, 27° e 120°; tra la prima e la seconda somministrazione non si osserva una variazione sensibile della testosteronemia poiché la prima dose ha il compito di sensibilizzare il sistema immunitario ma non stimola una sufficiente produzione di anticorpi anti-GnRH come dimostrato da Zamaratskaia et al. (2008) e Wicks et al. (2013). A partire dalla seconda somministrazione di Improvac® il testosterone diminuisce a livelli comparabili con quelli dei soggetti del gruppo deslorelin e del soggetto castrato del gruppo controllo e si mantengono su tali livelli fino al 72° giorno e si nota successivamente un recupero della funzionalità testicolare evidenziato inoltre dagli elevati valori della testosteronemia dopo il test di stimolo a 91° e al 120° giorno. La soppressione della funzionalità testicolare è dimostrata dal risultato del test di stimolo al 59° giorno in cui la testosteronemia post stimolazione non supera 1 ng/ml. Dopo la terza e ultima somministrazione del vaccino al 120° giorno è stato effettuato un ultimo dosaggio del testosterone basale al 140° giorno dove i valori erano nuovamente scesi, purtroppo però non è stato eseguito nuovamente il test di stimolo per testare la funzionalità testicolare pertanto non possiamo affermare con certezza che la terza dose abbia nuovamente soppresso il testicolo; a riguardo comunque possiamo citare lo studio di Bilskis et al. (2012) che dimostrano come anche la terza somministrazione di Improvac® sia efficace.

L'effetto del trattamento con deslorelin evidenziato in questa analisi citologica, trova somiglianze con i rilievi istologici presenti in letteratura. I suini trattati non maturano sessualmente e non hanno spermatozoi nell'ejaculato, fino alla regressione dell'effetto del farmaco (Kauffold et al., 2010; Kopera, et al., 2008). A livello istologico si notano delle alterazioni a carico dei tubuli e dell'interstizio, variabili in base alla durata del trattamento. In linea generale si nota un arresto maturativo a livello di spermatogoni, quindi sono visibili solo le cellule del Sertoli, gli spermatogoni e pochi spermatozoi (Kauffold et al., 2010), e nel caso di trattamenti prolungati (tre mesi) la perdita delle cellule germinali è quasi completa in molti tratti del tubulo (Kopera et al., 2008). Quindi, sia i risultati istologici di questi Autori che i risultati citologici di questo studio rivelano un arresto maturativo (Figura 1).

I suini trattati con Improvac non hanno invece differenze significative rispetto ai suini interi del gruppo controllo. Gli studi istologici in letteratura riportano visibili alterazioni istologiche a livello testicolare: distruzione numerica e morfologica delle cellule del Leydig, e spermatogenesi variabilmente alterata. A livello tubulare i quadri vanno da una leggera distruzione dell'epitelio tubulare (perdita spermatozoi e diminuzione degli strati germinativi) ad una grave perdita di cellule germinali (sindrome a sole cellule del Sertoli). Inoltre si nota una drastica diminuzione degli spermatozoi epididimali con un notevole aumento delle alterazioni morfologiche degli stessi. (Einarsson et al., 2009). La vaccinazione precoce aumenta gli effetti distruttivi sulla spermatogenesi, quindi il quadro istologico peggiora: più tubuli sono affetti da grave perdita di cellule germinali, e maggiori sono i tubuli con sindrome

a sole cellule del Sertoli. Tuttavia, fra i vaccinati precocemente, alcuni hanno spermatozoi nell'epididimo, seppur in numero estremamente ridotto e in gran parte malformati (Einarsson, et al., 2011). Questi quadri non sono sovrapponibili a quanto ottenuto nella citologia a causa delle tempistiche con cui è stato effettuato il prelievo citologico, nel nostro studio infatti la vaccinazione è stata eseguita a t0, t27 e t120 quindi la citologia ha fotografato molto probabilmente il momento in cui la funzionalità testicolare era in forte ripresa, come suggeriscono i valori del test di stimolo del gruppo Improvac a t91, in risposta alla probabile caduta del livello anticorpale sotto il livello protettivo. La casa produttrice dell'Improvac® indica la durata della copertura anticorpale in 4-6 settimane mentre Wicks et al. (2013) nella loro pubblicazione indicano in 8 settimane la durata della soppressione della produzione di testosterone, un tempo inferiore ai 74 giorni intercorsi tra la nostra seconda vaccinazione e il prelievo citologico.

Figura 1. Citologia testicolare di verri impiantati con deslorelin (a) di interi (b)



CONCLUSIONI

Il test di stimolo si è dimostrato capace di valutare la soppressione della funzionalità testicolare nei due gruppi di trattamento e il recupero funzionale nei soggetti immunocastrati; la citologia testicolare ha confermato i risultati del test di stimolo nel gruppo deslorelin mentre nel gruppo Improvac®, data la tempistica di esecuzione, ha fotografato la ripresa della spermatogenesi dopo il declino dell'immunità acquisita.

Nell'allevamento del suino pesante, tipico della realtà italiana, i due metodi di castrazione si sono dimostrati efficaci nella soppressione della testosteronemia e della spermatogenesi.

BIBLIOGRAFIA

Bilskis R., Sutkeviciene N., Riskeviciene V., Januskauskas A., Zilinskas H. (2012) "Effect of active immunization against GnRH on testosterone concentration, libido and sperm quality in mature AI boars". *Acta Vet Scand.* 54, 33.

Dunshie F.R., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long K.A., Loopaticki S., Nugent E.A., Simons J.A., Walker J., Hennessy D.P. (2001) "Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance". *J Anim Sci.* 79, 2524-2535.

Einarsson S., Andersson K., Wallgren M., Lundström K., Rodriguez Martinez H. (2009) "Short and long term effects of immunization against gonadotropin releasing hormone, using Improvac TM, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs".

Theriogenology. 71, 302-310.

Einarsson S., Brunius C., Wallgren M., Lundstrom K., Andersson K., Zamaratskaia G., Rodriguez Martinez H. (2011) "Effects of early vaccination with Improvac (R) on the development and function of reproductive organs of male pigs". *Anim Reprod Sci.* 127, 1-2, 50-55.

Fredriksen B., Font I Furnols M., Lundstrom K., Migdal W., Prunier A., Tuytens F.A.M., Bonneau M. (2009) "Practice on castration of piglets in Europe" *Animal.* 3:11, 1480-1487.

Hay M., Vulin A., Gènin S., Sales P., Prunier A. (2003) "Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days". *Appl Anim Behav Sci.* 82, 201-218.

Kallas Z., Gil J.M., Panella-Riera N., Blanch M., Font-i-Furnols M., Chevillon P., De Roest K., Tacken G., Oliver M.A., (2013) "Effect of tasting and information on consumer opinion about pig castration". *Meat Sci.* 95, 242-249.

Kauffold J., Rohrmann H., Boehm J., Wehrend A. (2010) "Effects of long-term treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin®) on sexual function in boars". *Theriogenology.* 74, 733-740.

Kopera I., Tuz R., Hejmej A., Schwarz T., Koczanowski J., Bilinska B. (2009) "Immunolocalization of androgen receptor in the boar epididymis: the effect of GnRH agonist deslorelin". *Reprod Domest Anim.* 44, 266-272.

Kopera I., Tuz R., Kotula-Balak M., Schwarz T., Koczanowski J., Bilinska B. (2008) "Morphofunctional alterations in testicular cells of deslorelin-treated boars: an immunohistochemical study". *J Exp Zool Part A.* 309, 117-126.

Kubale V., Batorek N., Skrlep M., Prunier A., Bonneau M., Fazarinc G., Candek-Potokar M. (2013) "Steroid hormones, boar taint compounds, and reproductive organs in pigs according to the delay between immunocastration and slaughter". *Theriogenology.* 79, 69-80.

Lealiifano A.K., Pluske J.R., Nicholls R.R., Dunshea F.R., Campbell R.G., Hennessy D.P., Miller D.W., Hansen C.F., Mullan B.P. (2011) "Reducing the length of time between harvest and the secondary gonadotropin-releasing factor immunization improves growth performance and clears boar taint compounds in male finishing pigs". *J Anim Sci.* 89, 2782-2792.

Wicks N., Crouch S., Pearl C. A. (2013) "Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization". *Anim Reprod Sci.* 142, 149-159.

Zamaratskaia G., Andersson H.K., Ghen G., Andersson K., Madej A., Lundström K. (2008) "Effect of a gonadotropin-releasing hormone vaccine (Improvac™) on steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs". *Reprod Dom Anim.* 43, 351-359.