

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CONTRACEPCIÓN QUÍMICA EN  
CHIVOS**

**“Por”**

**MACHADO Magdalena**

**PIÑEYRÚA Melanie**

**VAZQUEZ Carolina**

**TESIS DE GRADO presentada como  
uno de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias  
Veterinarias**

**Orientación: Medicina Veterinaria**

**MODALIDAD: Ensayo experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2016**

## **PÁGINA DE APROBACIÓN**

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

Segundo miembro (Tutor):                      Lic. MSc. Julia Giriboni

Tercer miembro:

Cuarto miembro:                                      DMV. MSc. Lorena Lacuesta

Quinto miembro:                                      Lic. MSc. PhD. Rodolfo Ungerfeld

Fecha:

Autores:    Magdalena Machado

Melanie Piñeyrúa

Carolina Vazquez

## DEDICATORIA

*“Si tienes un gran sueño debes estar dispuesto a un gran esfuerzo para concretarlo, porque solo lo grande alcanza lo grande”*

Facundo Cabral

A este equipo de trabajo que sin duda hizo que este proceso sea más agradable y más sencillo, compartiendo responsabilidades, esfuerzo y dedicación, pero más que nada buenos momentos, alegrías y una hermosa amistad que sin duda quedará para toda la vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Veterinaria y a todos los profesores por nuestra formación como personas y como profesionales.

A nuestra tutora Julia Giriboni, por el apoyo brindado y la paciencia en cada etapa de este proceso.

A nuestra co-tutora Lorena Lacuesta por la atención y consejos brindados.

A nuestro co-tutor Rodolfo Ungerfeld por el tiempo dedicado.

A Milton Pintos por su ayuda con el manejo y cuidado de los animales.

A nuestras familias (padres, madres, hermanos y hermanas) quienes nos han apoyado y motivado en nuestra formación académica, creyeron en nosotros en todo momento y nunca dudaron de nuestras habilidades. Sin ellos no hubiera sido posible este logro.

A nuestros amigos/as, los de la vida y los que tuvimos la suerte de conocer en esta etapa tan hermosa que hoy culminamos, gracias por esos momentos de estudio y diversión.

A todos GRACIAS!!

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	9
SUMARY.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Regulación neuroendócrina de la reproducción.....	12
1.2. Métodos de contracepción.....	13
1.2.1. Inmunoneutralización de GnRH.....	15
1.2.2. Agonistas de GnRH.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos particulares.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Animales y su manejo.....	19
3.2. Administración de implante de agonista de GnRH.....	19
3.3. Administración de vacuna anti GnRH.....	19
3.4. Evaluación testicular.....	20
3.5. Colección y evaluación seminal.....	21

3.6.	Análisis estadístico.....	21
4.	RESULTADOS.....	22
4.1.	Características testiculares.....	22
4.1.1.	Circunferencia escrotal.....	22
4.1.2.	Ecogenicidad testicular.....	23
4.2.	Características seminales	
4.2.1.	Concentración espermática.....	24
4.2.2.	Motilidad espermática masa.....	25
4.2.3	Motilidad espermática individual.....	26
4.2.4.	Porcentaje de espermatozoides normales.....	27
4.3.	Cantidad de animales a los que se les pudo colectar semen.....	28
5.	DISCUSIÓN.....	29
6.	CONCLUSIONES.....	32
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

## TABLA DE ABREVIATURAS

CE	Circunferencia escrotal
FSH	Hormona folículo estimulante
GC	Grupo de chivos no tratados
GI	Grupo de chivos tratados con implante de agonista de GnRH
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GV	Grupo de chivos tratados con vacuna anti-GnRH
IP	Intensidad de pixeles
LH	Hormona luteinizante
MI	Motilidad espermática individual
MM	Motilidad espermática de masa

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Medición de la circunferencia escrotal (a) e imagen de ecografía testicular de chivos Gabón (b).....	20
Figura 2. Circunferencia escrotal de chivos tratados con vacuna anti-GnRH, chivos tratados con implante de agonista de GnRH y chivos no tratados.....	22
Figura 3. Intensidad de pixeles de ecografías testiculares de chivos tratados con vacuna anti-GnRH, chivos tratados con implante de agonista de GnRH y chivos no tratados.....	23
Figura 4. Concentración espermática de chivos tratados con vacuna anti-GnRH, chivos tratados con implante de agonista de GnRH y chivos no tratados.....	24
Figura 5. Motilidad espermática de masa de chivos tratados con vacuna anti-GnRH, chivos tratados con implante de agonista de GnRH y chivos no tratados.....	25
Figura 6. Motilidad espermática individual de chivos tratados con vacuna anti-GnRH, chivos tratados con implante de agonista de GnRH y chivos no tratados.....	26
Figura 7. Espermatozoides normales (%) de chivos tratados con vacuna anti-GnRH, chivos tratados con implante de agonista de GnRH y chivos no tratados .....	27

## RESUMEN

El crecimiento excesivo de las poblaciones de animales en zoológicos y reservas naturales causa un impacto negativo a nivel socio-económico y de bienestar animal. Por esto, surge la necesidad de buscar métodos de control de la reproducción como la contracepción química. El objetivo del presente trabajo fue comparar la eficacia del uso de agonistas de GnRH e inmunoneutralización de GnRH en las características testiculares y la calidad seminal. El experimento se realizó en primavera hacia el inicio de otoño (de noviembre a marzo) con 25 chivos adultos de Gabón, adjudicados a tres grupos: implante de agonista GnRH (GI, n=8), vacuna anti-GnRH (GV, n=8) y un grupo control (GC, n=9). Los registros se realizaron 1 vez en noviembre, 3 veces en diciembre, con un intervalo de 10 días y luego mensual hasta el mes de marzo. La circunferencia escrotal se midió con un escrotímetro y se realizaron ecografías testiculares. Se determinó el volumen, motilidad espermática de masa e individual en el semen fresco. La circunferencia escrotal no varió entre grupos pero si varió a lo largo del tratamiento ( $P= 0,004$ ), se observó una interacción entre grupo y tiempo ( $P= 0,007$ ): desde enero a marzo el GC tuvo mayor CE que el GV y GI. El porcentaje de espermatozoides normales y la intensidad de pixeles fueron mayores en el GC con respecto a GV y GI ( $P< 0,0001$ ) y variaron durante el tratamiento ( $P< 0,0001$ ) y ( $P= 0,0003$ ) respectivamente. Por otra parte, la concentración espermática, la motilidad espermática de masa así como la motilidad espermática individual fueron menores en el GV y en el GI con respecto al GC ( $P< 0,0001$ ) y no variaron a lo largo del tratamiento. Se concluyó que tanto el uso crónico de un agonista de GnRH, como la inmunoneutralización de GnRH en chivos afectaron negativamente la calidad seminal y las características testiculares en chivos de Gabón, no existiendo diferencias en la eficacia y duración de los efectos entre ambos tratamientos.

## SUMMARY

The overgrowth of animal populations in zoos and natural reserves causes a negative impact to socio-economic status and animal welfare. Therefore its needs to find effective methods of reproduction control, such as the chemical contraception, as the use of GnRH agonists and GnRH immunoneutralization. The aim of this study was to compare the effectiveness of both methods, by assessing testicular characteristics and semen quality. The experiment was conducted in the spring to the autumn start (November to March), three groups of adult Gabon goats were used: implants GnRH agonist group (GI, n=8), anti-GnRH vaccine group (GV, n=8), and a control group (GC, n=9). The recordings were made in November 1, 3 times in December with an interval of 10 days and then monthly until March. Scrotal circumference was measured with a centimeter and testicular ultrasounds were performed. Fresh semen was evaluated and volume, sperm motility mass and individual sperm motility were determined. Scrotal circumference was not different between groups, but varied throughout the treatment and there was an interaction between group and time was observed ( $P= 0.007$ ): from January to March, the GC was more CE than GV and GI. The normal sperm percentage and intensity of pixels were higher in the GC regarding GV and GI ( $P< 0.0001$ ) and varied during treatment ( $P< 0.0001$ ) and ( $P = 0.0003$ ) respectively. Moreover, sperm concentration, sperm motility mass and individual sperm motility were lower in the GV and the GI with respect to GC ( $P< 0.0001$ ) and remained unchanged throughout the treatment. It was concluded that both the chronic use of a GnRH agonist, such as GnRH immunoneutralization negatively affected semen quality and testicular characteristics in Gabon goats, there are no differences in efficacy and duration of effect between the two treatments.

## 1. INTRODUCCIÓN

La sobrepoblación de animales silvestres y domésticos es una situación frecuente originada por el crecimiento excesivo de las poblaciones, lo que causa un impacto negativo sobre la salud pública, además de generar problemas socio-económicos y de bienestar animal (Downes et al., 2009). Actualmente la situación que se presenta en los zoológicos y en las reservas naturales de Uruguay, es el exceso de chivos Gabón y Ciervos Axis. (Rodriguez y Rohrer, 2014). El crecimiento en el tamaño de estas poblaciones no es deseable debido a limitaciones edilicias y de recursos económicos (AZA, 2001).

En relación a los animales de compañía (perros y gatos callejeros) la preocupación radica en los perjuicios sociales que esto genera: animales abandonados, mal nutridos y enfermos, que pueden ser envenenados, eutanasiados o incluso muren debido a las malas condiciones a las que se ven enfrentados (ver revisión: Kutzler y Wood, 2006). A esto se le suma el riesgo que representa para la salud, el bienestar y la seguridad de las personas (Brusoni et al., 2007), ya que existen más de cien enfermedades zoonóticas que pueden transmitir los perros, como rabia, leptospirosis, brucelosis, salmonelosis e hidatidosis (Ortega, 2001).

Todo lo mencionado anteriormente ha llevado a la necesidad de buscar métodos efectivos en el control de la reproducción. Una de las alternativas es la castración quirúrgica y más recientemente la castración química, siendo ésta utilizada principalmente en los machos.

## 1.1 . Regulación neuroendócrina de la reproducción en el macho

La reproducción en los mamíferos está regulada fundamentalmente por un sistema neuro- endócrino constituido por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. La hormona liberadora de gonadotropina (*gonadotrophin-releasing hormone*: GnRH) es un decapeptido producido por el hipotálamo y liberado de forma pulsátil. La GnRH llega a la adenohipófisis por el sistema porta hipofisario, donde estimula la liberación de gonadotropinas: hormona luteinizante (*Luteinizing hormone: LH*) y hormona folículo estimulante (*Follicle stimulating hormone: FSH*) (ver revisión: Griswold y McLean, 2006). Ambas gonadotropinas son glucoproteínas heterodímeras, su liberación depende de los patrones pulsátiles de secreción de la GnRH (Cunningham y Klein, 2014). Las gonadotropinas entran a la circulación y ejercen su acción sobre los testículos regulando la producción de hormonas esteroideas y la espermatogénesis. La LH se une a los receptores de membrana de las células de Leydig y estimula la producción de testosterona a partir de colesterol. La FSH es indispensable para el inicio de la espermatogénesis (Bielli, 2002).

Una vez iniciada la espermatogénesis, la FSH no parece tener un rol fundamental en el mantenimiento de la misma. Además, la FSH determina la cantidad, tamaño y actividad de las células de Sertoli, lo que limita la cantidad de espermatozoides que podrán producirse (Bielli, 2002). La FSH junto con la testosterona estimulan la síntesis y liberación de inhibina, activina, transferrina y de proteínas ligadoras de andrógenos (*Androgen binding protein: ABP*) (ver revisión: Griswold y McLean, 2006). Tanto la inhibina como la activina son hormonas proteicas que participan en la regulación de la secreción de FSH. La inhibina es secretada por los testículos y ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH, actuando directamente sobre la adenohipófisis. Por el contrario, la activina aumenta la secreción de FSH (Aman y Schanbacher, 1983). La transferrina participa en la transferencia de nutrientes a las células germinativas, lo que también determina la cantidad de espermatozoides que se producen. Las proteínas ligadoras de andrógenos se secretan en los túbulos seminíferos y su función es mantener altas concentraciones de andrógenos, especialmente de testosterona en los testículos (Bielli, 2002). La testosterona

producida por las células de Leydig llega a los túbulo seminíferos, donde es necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis (Bielli, 2002). Además, una alta concentración local de testosterona dentro del testículo se considera esencial para que la espermatogénesis pueda darse con normalidad (Laudat et al., 1998). La testosterona también es esencial para el desarrollo y mantenimiento del comportamiento y de los caracteres sexuales masculinos (Ungerfeld, 2002).

## 1.2. Métodos de contracepción

Para el control de la reproducción se puede optar por esterilizar a la hembra o al macho. Además de controlar la reproducción, y por tanto el tamaño de las poblaciones, la esterilización del macho en las diferentes especies puede tener ciertos beneficios: en perros ayuda a prevenir las patologías prostáticas y aparición de ciertos tipos de tumores, así como también disminuye el comportamiento agresivo (ver revisión: Thompson, 2000). En rumiantes, la principal ventaja es la disminución de la libido y del comportamiento agresivo, lo que podría ser un serio problema si no se controla, principalmente en toros, donde animales pre púberes expuestos a hembras en celo podrían generar desde preñeces no deseadas hasta daños a la seguridad humana (Price y Tennesson, 1981).

Los métodos de contracepción utilizados más frecuentemente son los procedimientos quirúrgicos, los que consisten en la extirpación quirúrgica de los órganos sexuales, en el caso del macho los testículos. Por lo tanto son métodos irreversibles, ya que los animales no recuperan su capacidad reproductiva. Es recomendable que el procedimiento se realice en la etapa prepuberal para disminuir el estrés, lo que tiene como desventaja que los animales no alcanzan un desarrollo prepuberal óptimo, lo que incide en las características productivas de la carne (Knight et al., 2000). A su vez pueden generar ciertas complicaciones como traumas por injuria, infecciones (bacterianas y parasitarias) y hemorragias (Amatayakul-Chantlera et al., 2013).

Por tanto, es preciso buscar métodos de contracepción alternativos que no generen dichos inconvenientes, o que al menos los minimicen. Estos métodos tienen que cumplir con los siguientes requisitos: ser aplicables a gran escala, con mínimos requerimientos técnicos (ver revisión: Kutzler y Wood, 2006), así como ser éticamente aceptables y tener por finalidad reducir la tasa de natalidad y no aumentar la tasa de mortalidad. Un método que se adapta a estas finalidades descritas es la contracepción química (ver revisión: Fagerstone et al., 2006).

La utilización de agentes hormonales es una forma posible de contracepción ya que ejerce efectos inhibitorios reversibles en la reproducción, lo que se ha aplicado con éxito en varias especies (monos: Davis-da Silva y Wallen, 1989; vacas: Rieger et al., 1989; gatas: Toydemir et al., 2012; perros: Vickery et al., 1984; perras: Vickery et al., 1985).

En los rumiantes, la utilización de la contracepción química permite mejorar las características productivas del ganado (en los productos cárnicos), pudiendo realizarse en la etapa post puberal y alcanzando un mejor desarrollo corporal (Jago et al., 1997). Esto lleva a obtener carnes más magras, mayor área de ojo de bife y disminución en el índice de conversión alimentaria, reduciendo tanto el comportamiento agresivo como la producción de olores en el macho (ver revisión: Thompson, 2000). En animales domésticos, la necesidad de utilizar la contracepción química, surge desde dos perspectivas: por un lado, la utilización de técnicas quirúrgicas en animales callejeros es poco práctica y costosa, mientras que en criaderos la importancia de la contracepción química radica en la reversibilidad de la técnica (ver revisión: Valiente et al., 2008).

Existen tres maneras diferentes de disminuir la capacidad reproductiva manipulando la acción de la GnRH en la hipófisis: 1) evitando que la GnRH llegue a sus receptores en la hipófisis, mediante inmunoneutralización, 2) ejerciendo efectos inhibitorios utilizando agonistas de la GnRH administrados de forma crónica y 3) bloqueando los receptores de GnRH por antagonistas químicos de GnRH (Fraser, 1982).

### 1.2.1. Inmunoneutralización de GnRH

La inmunoneutralización de GnRH estimula al sistema inmune a producir anticuerpos contra la GnRH (ver revisión: Thompson, 2000). Debido a que la GnRH tiene bajo peso molecular y baja capacidad inmunógena para que sea reconocida por el sistema inmune, debe unirse a una proteína portadora como la seroalbúmina para aumentar su inmunogenicidad (Jeffocate y Keeling, 1984). La inmunoneutralización de GnRH bloquea la síntesis de la LH y la FSH por parte de la hipófisis hasta lograr la quiescencia gonadal (Fraser y Gunn, 1973).

Para el desarrollo de una vacuna contraceptiva es primordial decidir qué antígeno se utiliza para estimular el sistema inmune (Skinner et al., 1996) y el número de inmunizaciones necesarias para generar una respuesta inmunológica eficaz (ver revisión: Thompson, 2000). Hasta el momento, la seroalbúmina ha sido la que genera una mayor inmunogenicidad, siendo éste el antígeno más comúnmente utilizado en animales (ver revisión: Purswell y Kolster, 2006).

Se ha demostrado que inhibir la acción de la GnRH sobre la hipófisis mediante la inmunoneutralización de GnRH induce involución testicular, que conduce a una disminución en la concentración de testosterona en sangre (conejos: Arimura et al., 1973; caninos: Ajadi y Oyeyemi, 2015; ciervos: Lincoln et al., 1982; chivos: Godfrey et al., 1996), disminución del volumen del eyaculado, aumento de la frecuencia de alteraciones morfológicas de los espermatozoides, y disminución de la motilidad espermática (caninos: Ajadi y Oyeyemi, 2015; chivos: Godfrey et al., 1996). Por lo tanto la inmunoneutralización es una alternativa viable para el control de la reproducción, tanto en animales de compañía como en rumiantes.

### 1.2.2 Agonistas de GnRH

La administración crónica de un agonista de GnRH actúa desensibilizando la hipófisis e inhibiendo así la secreción de gonadotrofinas (Becker y Katz, 1993). El uso de agonistas de GnRH como método de contracepción es más eficaz que la administración de GnRH endógena, tanto en condiciones clínicas como experimentalmente, debido a que poseen mayor vida media en sangre, mayor resistencia a la degradación enzimática y una mayor afinidad por los receptores de GnRH (Becker y Katz, 1993). El uso de agonistas de GnRH a corto plazo induce una liberación inicial y un rápido incremento en el plasma de los valores de LH y testosterona (efecto "flare up"). Sin embargo genera solo un mínimo cambio en la concentración de FSH. El aumento de la concentración de LH comienza el primer día de tratamiento y permanece elevado durante 7 días, mientras los valores de testosterona aumentan a partir del día 7 de comenzado el tratamiento, permaneciendo así durante 10 días (ciervos: Lincoln et al., 1986). El efecto "flare up" tiene una duración aproximada de 7 a 14 días de iniciado el tratamiento, dependiendo del agonista utilizado (caninos: Wright et al., 2001).

En la actualidad uno de los agonistas de GnRH que más se utiliza es la deslorelina, un análogo sintético de la GnRH, con una potencia 7 veces superior a la hormona endógena, más estable y con mayor afinidad por los receptores celulares de la misma (por lo que se clasifica como un superagonista) (ver revisión: Padula, 2005).

La utilización de la deslorelina a largo plazo produce disminución del tamaño testicular, de la concentración de testosterona en sangre, reducción de la libido y comportamiento de macho (gatos: Goericke-Pesch et al., 2011; zorro: Melville et al., 2011), así como disminución de la producción de espermatozoides y aumento de las anomalías espermáticas (caninos: Fontaine y Mir, 2012; jabalíes: Kauffold et al., 2010). La deslorelina se administra únicamente por vía subcutánea, ya que por vía oral sería degradada por las peptidasas gastrointestinales bajando su biodisponibilidad (ver revisión: Valiente et al., 2008).

Aunque se conocen los posibles beneficios de la utilización de la inmunoneutralización de GnRH y del uso crónico de agonista de GnRH como métodos de contracepción en rumiantes, hasta el momento sólo se ha realizado un único experimento que estudia la eficacia de la inmunoneutralización de GnRH en chivos (Godfrey et al. 1996) y ninguno sobre el uso crónico de un agonista de GnRH. Por lo tanto, resulta interesante la aplicación de estos métodos en chivos Gabón y determinar su efectividad en el control de la reproducción.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

- Comparar la eficacia en el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de GnRH como métodos de contracepción química en chivos adultos de Gabón.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar si el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de GnRH en chivos adultos de Gabón produce disminución de:
  - la circunferencia escrotal
  - cantidad de fluido testicular
  - motilidad espermática de masa
  - motilidad espermática individual
  - concentración espermática
  - porcentaje de espermatozoides normales en el eyaculado
- Determinar si existen diferencias en la duración de los efectos en ambos tratamientos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Animales y su manejo

El experimento se realizó desde primavera hacia el inicio de otoño (de noviembre a marzo). Se utilizaron 25 chivos adultos de Gabón que fueron separados en tres grupos. Los animales fueron alojados en corrales de tamaño similar y alimentados de acuerdo a sus requerimientos nutricionales con fardos de alfalfa y dispusieron de agua *ad libitum*. Uno de los grupos fue tratado con una vacuna anti-GnRH (GV, n=8) y otro con implantes de agonista de GnRH (GI, n=8). El tercer grupo fue utilizado como control y no se les realizó ningún tratamiento (GC, n=9). Una vez comenzado el tratamiento los registros de las variables consideradas se realizaron 1 vez en noviembre, 3 veces en diciembre, con un intervalo de 10 días y luego mensual hasta el mes de marzo.

En cada toma de muestra se evaluaron características seminales y testiculares.

#### 3.2 Administración de implante del agonista de GnRH

En noviembre se le colocó un único implante subcutáneo conteniendo 4,7 mg de acetato de deslorelina (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NHC2H5; Suprelorin®; Virbac, Barcelona, España) a 8 chivos en la zona pre-escapular. Los implantes permanecieron colocados durante todo el experimento.

#### 3.3 Administración de vacuna anti-GnRH

En la misma fecha se administró la primer dosis de la vacuna anti-GnRH (2 mL/animal/Improvac®; Zoetis, Bruselas, Bélgica) a 8 chivos (grupo GV) y a las 4 semanas se administró la segunda inoculación (booster).

### 3.4 Evaluación testicular

La circunferencia escrotal (CE) se registró midiendo el diámetro mayor de la bolsa escrotal, utilizando una cinta apropiada para ello (Figura 1a) y se realizaron ecografías testiculares con un equipo B-mode (Wed9618V, WellD, Guangdong, China) con un transductor lineal de 7,5 MHz, conectado a un dispositivo para obtención de las imágenes en formato digital (Ungerfeld y Fila, 2011). Cada testículo fue escaneado separadamente en plano longitudinal al mediastino. En cada imagen se analizaron 4 áreas circulares de igual diámetro (Figura 1b), seleccionadas al azar, dos por encima y dos por debajo del mediastino. En cada imagen se obtuvo un valor promedio de la intensidad de píxeles (IP), es decir su ecogenicidad (en una escala de grises de imagen que varía entre 0 y 255, donde el 0 está representado por negro y el 255 está representado por blanco), mediante un software de procesamiento de imagen digital (software libre Image J, versión 1.34s). Las imágenes más oscuras indican menor ecogenicidad y menor parénquima testicular y mayor cantidad de fluido testicular, y las más claras indican mayor ecogenicidad y mayor parénquima testicular y menor cantidad de fluido testicular.

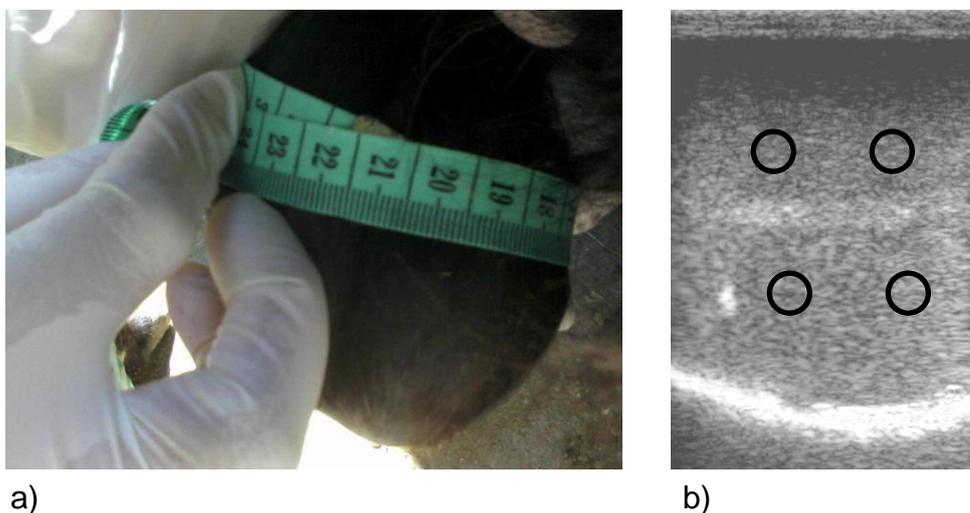


Figura1. La imagen de la izquierda corresponde a una medición de la circunferencia escrotal (a) y la imagen de la derecha corresponde a una ecografía testicular, con cuatro áreas circulares de análisis de la imagen (b).

### *3.5 Colección y evaluación seminal*

El semen se extrajo 1 vez en noviembre, 3 veces en diciembre, con un intervalo de 10 días y luego mensual hasta el mes de marzo, utilizando un electroeyaculador (Fuhijira Industry, Tokyo, Japón; equipado con un vástago de 30 x 1,5 cm con 4 electrodos circulares de 1 cm de ancho), aplicando un estímulo cada 3 s (intensidad de 5 V) separados por períodos de igual duración.

En cada momento de colección seminal se realizó un registro de todos los animales a los que se les pudo coleccionar semen.

Se evaluó el semen fresco y se determinó: volumen ( $\mu\text{L}$ ), motilidad espermática de masa (MM, escala de 0 a 5) y motilidad espermática individual (MI, %). Luego se fijó una alícuota de semen fresco en formol citrato y se determinó la concentración espermática (espermatozoides/mL) y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal.

### *3.6 Análisis estadístico*

Todas las variables se compararon mediante ANOVA para medidas repetidas, considerando como efectos principales el grupo, el tiempo, y la interacción entre grupo y tiempo.

En el modelo se incluyó como co-variable los valores iniciales (promedio de tres muestreos semanales previos al inicio del tratamiento) en la intensidad de pixeles, motilidad espermática de masa, motilidad espermática individual, concentración espermática, así como también en el porcentaje de espermatozoides normales en el eyaculado.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características testiculares

#### 4.1.1 Circunferencia escrotal

La CE no fue diferente entre grupos pero varió durante el tratamiento ( $P= 0,004$ ): la menor CE se observó en febrero ( $P < 0,0001$ ) en comparación con el resto del año. También se observó una interacción entre grupo y tiempo ( $P= 0,007$ ): desde enero a marzo, el GC tuvo mayor CE que el GV y GI. No se encontraron diferencias significativas en la CE entre GV y GI en ningún tiempo (Figura 2).

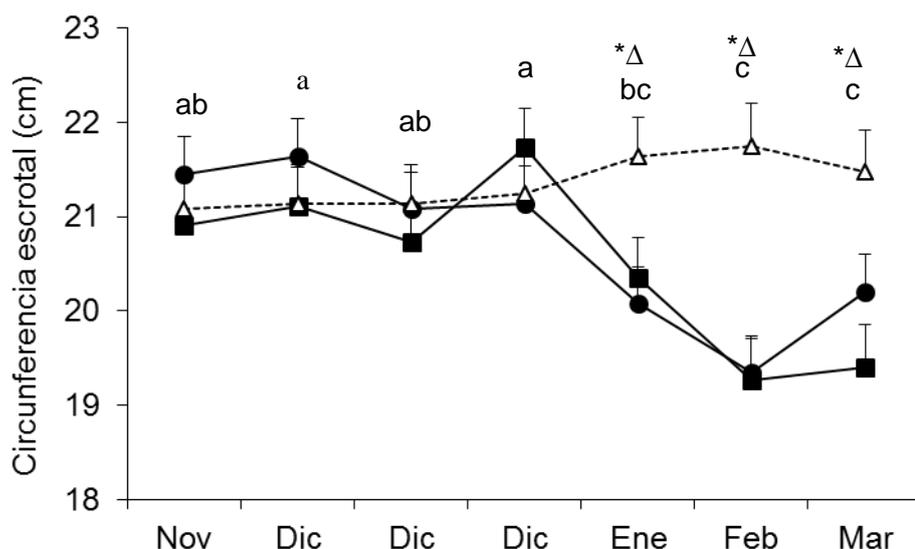


Figura 2. Circunferencia escrotal (cm) en chivos tratados con vacuna anti-GnRH (GV, --●--, n=8), chivos tratados con implante de agonista de GnRH (GI, --■--, n=8) y chivos no tratados (GC, --△--, n=9). Diferentes letras indican diferencias en el tiempo independientes de los tratamientos. Diferencias significativas entre grupos para un mismo tiempo se indican como:  $\Delta$ : GC vs GV y \*: GC vs GI.

#### 4.1.2 Ecogenicidad testicular

La IP fue mayor en el GC ( $131,5 \pm 2,5$ ) que en el GV ( $115 \pm 1,9$ ) y que en el GI ( $112 \pm 1,5$ ) ( $P < 0,0001$  en ambos casos). La IP varió durante el tratamiento ( $P = 0,0003$ ): fue menor a finales de diciembre y en febrero. Se observó interacción entre grupo y tiempo ( $P = 0,02$ ): a principio y a finales de diciembre y febrero el GC tuvo mayor IP que el GV y en todos los meses el GC tuvo mayor IP que el GI. Al inicio de diciembre el GC tuvo mayor IP que el GV ( $P < 0,0001$ ) y el GI ( $P < 0,0001$ ) (Figura 3).

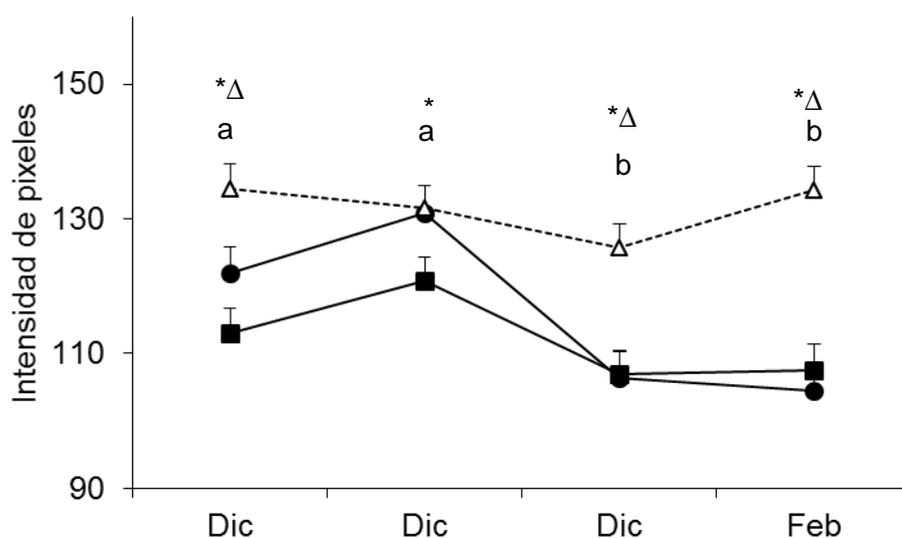


Figura 3. Intensidad de pixeles en imágenes de ecografías testiculares en chivos tratados con vacuna anti-GnRH (GV, --●--, n=8), chivos tratados con implante de agonista de GnRH (GI, --■--, n=8) y chivos no tratados (GC, --Δ--, n=9). Diferencias significativas durante el tratamiento se indican con letras diferentes. Diferencias significativas entre grupos para un mismo tiempo se indican como: Δ: GC vs GV y \*: GC vs GI.

## 4.2 Características seminales

### 4.2.1 Concentración espermática

La concentración espermática fue diferente entre los tres grupos: GV ( $187 \times 10^6 \pm 222 \times 10^5$  espermatozoides / mL) GI ( $105 \times 10^6 \pm 227 \times 10^5$  espermatozoides / mL) y GC ( $200 \times 10^6 \pm 196 \times 10^5$  espermatozoides / mL) ( $P < 0,0001$ ). La concentración espermática no varió durante el tratamiento y no se observó interacción entre grupo y tiempo (Figura 4).

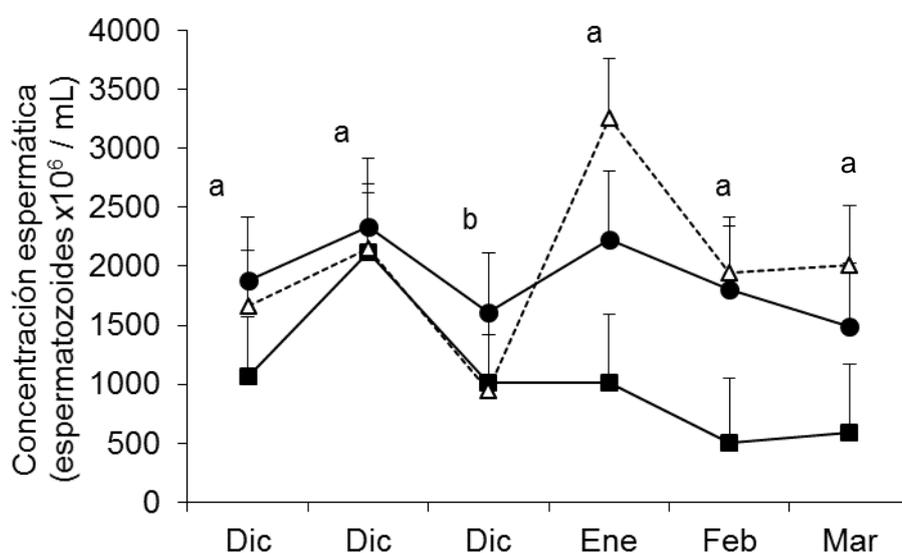


Figura 4. La concentración espermática en chivos tratados con vacuna anti-GnRH (GV, --●--, n=8), chivos tratados con implante de agonista de GnRH (GI, --△--, n=8) y chivos no tratados (GC, --■--, n=9).

#### 4.2.2 Motilidad espermática de masa

La MM fue diferente entre los tres grupos GC ( $3,3 \pm 0,2$ ), GV ( $2,2 \pm 0,2$ ) y GI ( $1,7 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,0001$ ). La MM no varió durante el tratamiento y no se observó interacción entre grupo y tiempo (Figura 5).

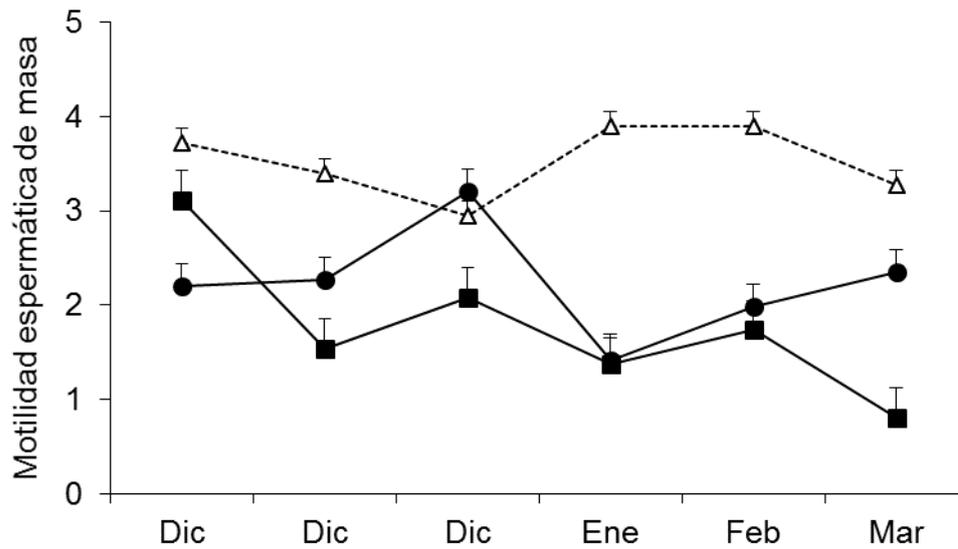


Figura 5. Motilidad espermática de masa en chivos tratados con vacuna anti-GnRH (GV, --●--, n=8), chivos tratados con implante de agonista de GnRH (GI, --■--, n=8) y chivos no tratados (GC, --△--, n=9).

#### 4.2.3 Motilidad espermática individual

La MI fue mayor en el GC ( $64,7 \pm 2,8$  %) que en el GV ( $51,3 \pm 3,1$  %) y en el GI ( $51,9 \pm 3,1$  %) ( $P < 0,0001$ ). La motilidad espermática individual no varió durante el tratamiento y no se observó interacción entre grupo y tiempo (Figura 6).

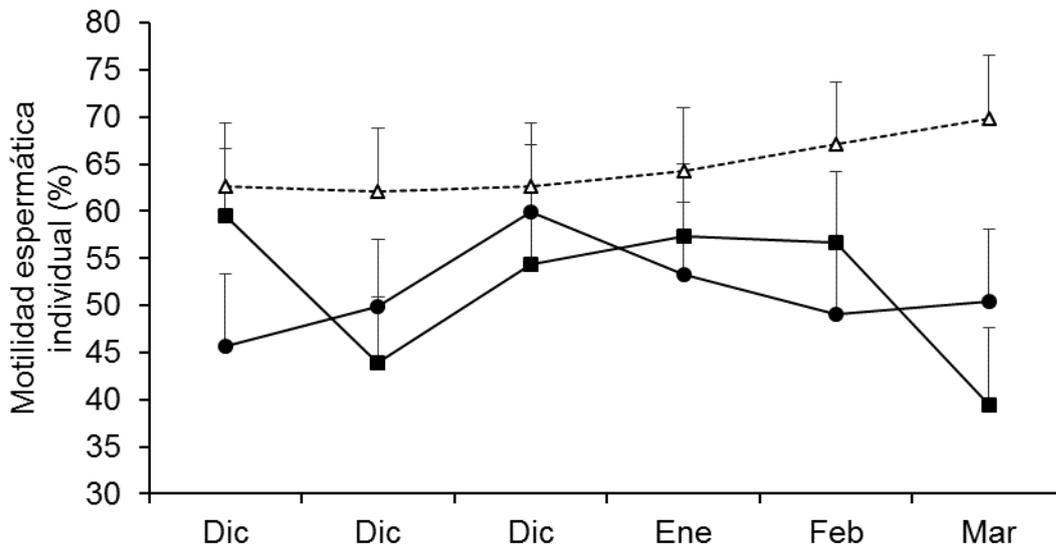


Figura 6. Motilidad individual en chivos tratados con vacuna anti-GnRH (GV, --●--, n=8), chivos tratados con implante de agonista de GnRH (GI, --■--, n=8) y chivos no tratados (GC, --△--, n=9).

#### 4.2.4 Espermatozoides normales

El porcentaje de espermatozoides normales fue diferente entre los tres grupos GV ( $54,7 \pm 2,5$ ), GI ( $54,4 \pm 2,6$ ) y GC ( $71,5 \pm 2,3$ ) ( $P < 0,0001$ ) y varió durante el tratamiento ( $P < 0,0001$ ): siendo menor en marzo que el resto del año. Se observó interacción entre grupo y tiempo ( $P = 0,0007$ ): a mediados de diciembre el GI tuvo menor porcentaje de espermatozoides que el GV y GC. En marzo el GC tuvo mayor porcentaje de espermatozoides normales ( $60,9 \pm 6,02$ ,  $P < 0,0001$ ) que el GV ( $18,5 \pm 6,4$ ,  $P = 0,005$ ) y GI ( $20,3 \pm 6,9$ ,  $P = 0,004$ ) (Figura 7).

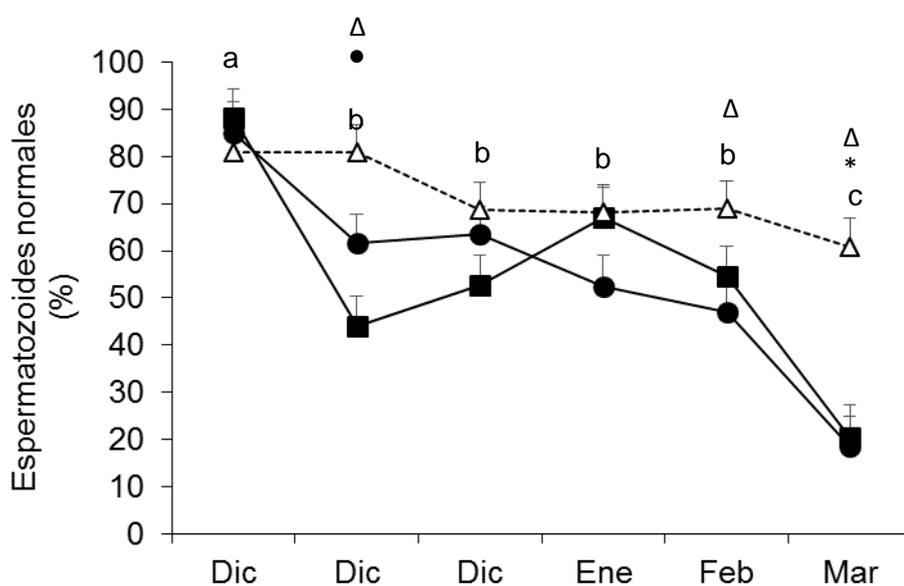


Figura 7. Espermatozoides normales (%) durante el experimento de chivos tratados con vacuna anti-GnRH (GV, --●--, n=8), chivos tratados con implante de agonista de GnRH (GI, --■--, n=8) y chivos no tratados (GC, --Δ--, n=9). Diferencias significativas a lo largo del tiempo se indican con letras diferentes. Diferencias significativas entre grupos para un mismo tiempo se indican como: Δ: GC vs GV; \*: GC vs GI y •: GI vs GV.

#### 4.3 Cantidad de animales a los que se les pudo colectar semen

En el GV y en el GC se les pudo colectar semen a todos los animales en todos los tiempos, mientras que en GI solamente a 3 animales en diferentes momentos del trabajo experimental no se les pudo colectar semen.

## 5. DISCUSIÓN

En este experimento se pudo demostrar que el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de GnRH afectaron negativamente las características testiculares y seminales, con una eficacia similar durante el periodo experimental.

Aunque no se observaron diferencias en la duración de los efectos de ambos tratamientos se podría especular con que los efectos de la inmunoneutralización contra GnRH podrían tener una menor duración, ya que su eficacia depende del mantenimiento de la producción de los anticuerpos (ver revisión: Purswell y Kolster, 2006). Sin embargo, la eficacia del uso crónico de un agonista de GnRH depende directamente de su acción sobre la hipófisis (ver revisión: Padula, 2005), por lo que esta podría ser más duradera que la de la inmunoneutralización contra la GnRH. Debido a que el trabajo experimental se realizó hasta el final de la estación reproductiva (marzo), el tiempo podría haber sido insuficiente para evidenciar posibles diferencias en la duración de los efectos de los tratamientos.

La disminución en la calidad espermática observada en ambos tratamientos probablemente se deba a que la GnRH no es capaz de alcanzar la hipófisis, ya sea por su desensibilización (agonista de GnRH), o por bloqueo de GnRH por anticuerpos (inmunoneutralización), generando así una insuficiente liberación de las gonadotropinas LH y FSH. La FSH es fundamental para que las células de Sertoli funcionen correctamente y promuevan la diferenciación de espermátidas en espermatozoides (Griswold, 1998). Además, una insuficiente estimulación a las células de Sertoli por parte de la FSH también lleva a una disminución cualitativa del epitelio germinal de los túbulos seminíferos, lugar donde se lleva a cabo la espermatogénesis (Mehl et al., 2016), obteniendo así una disminución de la concentración espermática y en el porcentaje de espermatozoides normales. Bustamante y Dustacheu (1991) demostraron que el tamaño testicular se relaciona positivamente con la producción total de espermatozoides. Por lo tanto, la menor producción de espermatozoides así como la disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos observada en los animales tratados en comparación con el grupo control, podría vincularse

con una disminución en el tamaño testicular y a su vez con una disminución en la circunferencia escrotal.

Aunque en este trabajo no fue posible medir la concentración de testosterona, hay que tener en cuenta que una insuficiente liberación de LH y FSH produce una disminución de su secreción. La testosterona es la principal hormona secretada por los testículos, su secreción está bajo control de la LH ya que ésta estimula a las células de Leydig a producirla (Griswold y McLean, 2006). Por otro lado la FSH estimula a las células de Sertoli a producir proteína ligadora de andrógenos, que mantiene alta las concentraciones de testosterona que existen en los túbulos seminíferos (Bielli, 2002). Tanto la inmunoneutralización de GnRH como el uso crónico de un agonista de GnRH conducen a la disminución de la secreción de LH (Fraser y Gunn, 1973; Becker y Katz, 1993) y por lo tanto de testosterona. Por lo tanto, la disminución en la concentración de espermatozoides y del porcentaje de espermatozoides motiles y normales en los animales tratados puede estar asociado a una posible disminución en la concentración de testosterona.

Si bien no se evaluó la composición del plasma seminal, la variación de sus componentes bioquímicos podría afectar negativamente la morfología y la motilidad espermática, la reacción acrosomal y la fertilidad (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Ya que se ha demostrado que sus componentes tienen diversas funciones entre las que se encuentran la de proveer energía a los espermatozoides (Soengas et al., 1993), estabilizar el balance osmótico y estimular la esteroidogénesis en las células de Leydig (Henricks, 1991), se podría asumir que la disminución en la motilidad espermática de masa, la motilidad espermática individual y del porcentaje de espermatozoides normales pueda deberse a cambios en la composición del plasma seminal. Por lo tanto, la administración crónica de un agonista de GnRH, así como la inmunoneutralización de GnRH podrían afectar negativamente al plasma seminal, generando un medio poco favorable para la motilidad de los espermatozoides y posiblemente también para la viabilidad espermática.

La disminución de la ecogenicidad testicular observada en los chivos tratados podría relacionarse con una disminución en la proporción de parénquima testicular con respecto a la cantidad de fluido testicular. Por lo tanto es posible especular con que la menor ecogenicidad testicular se relacione con una disminución en el diámetro y la luz de los túbulos seminíferos (Chandolia et al., 1997) y por lo tanto con una menor concentración de espermatozoides (Brito et al., 2012).

El trabajo experimental se inició en noviembre, al inicio de la estación reproductiva de los chivos Gabón (Giriboni, 2014). Durante este periodo (noviembre-abril), las características reproductivas evaluadas deberían comenzar a presentar valores máximos, siguiendo un patrón estacional normal como se observa en los animales no tratados. Sin embargo, en los animales tratados no solo las características seminales y testiculares evaluadas no se encontraron en valores cercanos al máximo, sino que se encontraron en valores mucho menores que los esperados para ese momento del año, como respuesta a los tratamientos aplicados. Por lo tanto, y teniendo en cuenta además que este es el primer trabajo que compara el uso crónico de un agonista de GnRH con la inmunoneutralización de GnRH en rumiantes, sería interesante evaluar el efecto de los mismos tratamientos en otros momentos del año. Por ejemplo, una vez comenzada la estación reproductiva, para así poder evaluar la eficacia de estos tratamientos cuando las características reproductivas ya se encuentran en sus valores máximos.

En síntesis, tanto el uso crónico de un agonista de GnRH como la inmunoneutralización de GnRH tuvieron la misma eficacia en cuanto a la magnitud y duración de los efectos. Ambos tratamientos provocaron una disminución de la calidad seminal y de las características testiculares en los chivos tratados. Esto probablemente pueda atribuirse a una insuficiente liberación de LH y FSH debido a que la GnRH no alcanzaría la hipófisis, afectando así el proceso neuroendócrino de la reproducción.

## **6. CONCLUSIONES**

- Tanto el uso crónico de un agonista de GnRH como la inmunoneutralización de GnRH produjeron una disminución de la calidad seminal y de las características testiculares evaluadas.
- Tanto el uso crónico de un agonista de GnRH como la inmunoneutralización de GnRH lograron una eficacia y duración de los efectos similares hasta el final de la estación reproductiva.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ajadi, T. A., Oyeyemi, M. O. (2015). Short- term effects of a single dose of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) vaccine on testicular and ejaculate characteristics of dogs. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18: 123-131.
2. Aman, R. P., Schanbacher, B. D. (1983). Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, 57: 380- 403.
3. Amatayakul-Chantlera, S., Hoeb, F., Jackson, J. A., Rocad, R. O., Stegnerc, J. E., Kingc, V., Howarda, R., Lopeza, E., Walkera, J. (2013). Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine Bopriva or surgical castration of *Bos indicus* bulls raised on pasture in Brazil. *Meat Science*, 95:78-84.
4. American Zoological Association (AZA). (2001). Contraceptive Research Program. Disponible en: [www.stlzoo.org/conserv.asp](http://www.stlzoo.org/conserv.asp). Fecha de consulta 21 de enero 2016.
5. Arimura, A., Sato, H., Kumasaka, T., Worobec, R. B., Debeljuk, L., Dunn, J., Schally, A. V. (1973). Production of antiserum to LH-releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbit: development of radioimmunoassays for LH-RH. *Endocrinology* 93: 1092-1103.
6. Becker, S. E., Kats, L. S. (1993). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs or active immunization against GnRH to control fertility in wildlife. USDA national wildlife research center symposia. Disponible en: <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1003&context=nwr> ccontraception. Fecha de consulta: 5 de febrero 2016.
7. Bielli, A. (2002). Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho. En: Ungerfeld, R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea Editores, V. 1, 79-92.

8. Brito, L. F. C., Kastelic, J. P. (2012). Ultrasonography for Monitoring Reproductive Function in the Bull. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 45-51.
9. Brusoni, C., Dezzotti, A., Fernandez, J., Lara, J. (2007). Tamaño y estructura de la población canina de San Martín de los Andes (Neuquén). *Analecta Veterinaria*, 27:11-23.
10. Bustamante, G., Duchateau, A. (1991). Examen de la salud reproductiva del macho. *Reproducción de animales domésticos*. México, Limusa, 169-175.
11. Chandiola, R. K., Honaramozz, A., Omekpp, B.C., Pierson, R., Beard, A. P., Rawlings, N. C. (1997). Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*, 48: 119-132.
12. Cunningham, J. G., Klein, B. G. (2014). Fisiología reproductora del macho. En: Cunningham, J. G., Klein, B. G. *Fisiología veterinaria*. España, Elsevier, V. 5, p.456-457.
13. Davis-da Silva, M., Wallen, K. (1989). Suppression of male rhesus testicular function and sexual behavior by gonadotropin-releasing-hormone agonist. *Physiological Behavior*, 45: 963-968.
14. Downes, M., Canty, M. J., More, S. J. (2009). Demography of the pet dog and cat population on the island of Ireland and human factors influencing pet ownership. *Preventive Veterinary Medicine*, 92: 140-149.
15. Fagerstone, K. A., Miller, L. A., Bynum, K. S., Eisemann, J. D., Yoder, C. (2006). Where and for what wildlife species will contraception be a useful management approach? *Proc 22<sup>o</sup> Verteb. Pest. Conf. University of California, Davis*, p.45-54(abstract). Disponible en: <http://naldc.nal.usda.gov/download/38983/PDF>. Fecha de consulta: 7 de Noviembre 2015
16. Fontaine, E., Mir, F. (2012). Agonistas de la GnRH como alternativa a la esterilización quirúrgica. *Argos, Portal Veterinaria*.

17. Fraser, H. M., Gunn, A. (1973). Effects of antibodies to luteinizing hormone-releasing hormone in the male rabbit and on the rat oestrous cycle. *Nature*, 244: 160-161.
18. Fraser, H. M. (1982). Antifertility effects of GnRH. *Journal of Reproduction and Fertility*, 64: 503-515.
19. Giriboni, J. (2014). Estimulo con hembras en celo y estacionalidad reproductiva de chivos adultos Gabón. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Montevideo, Uruguay. 76 p.
20. Godfrey, S. I., Walkden-Brown, S. W., Martin, G. B., Speijers, E. J. (1996). Immunization of goat bucks against GnRH to prevent seasonal reproductive and agonistic behaviour. *Animal Reproduction Science*, 44: 41- 54.
21. Goericke-Pesch, S., Georgiev, P., Antonov, A., Albouy, M. (2011). Clinical efficacy of a GnRH- agonist implant containing 4.7 mg deslorelin, suprelorin, regarding suppression of reproductive function in tomcats. *Theriogenology*, 75: 803-810.
22. Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9: 411: 416.
23. Griswold, M. D., McLean, D. (2006). The sertoli cell. En: Neill, JD, Plant, TM. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3a ed. St Louis, Elsevier, V. 1, p.949-976.
24. Henricks, D. M. (1991). Biochemistry and Physiology of the Gonadal Hormones. En: Perry T. Cupps. *Reproduction in Domestic Animals*. New York, Elsevier, p. 81-118.
25. Jago, J. G., Cox, N. R., Bass, J. J., Matthews, L. R. (1997). The effect of prepubertal immunization against gonadotropin-releasing hormone on the development of sexual and social behavior of bulls. *Journal of Animal Science*, 75: 2609-2619.

26. Jeffcoate, I. A., Keeling, B. J. (1984). Active immunization against LH-RH in the female. En: Crigthon, D.B., ed. Immunological aspect of reproduction in mammals. London: Butterworths, p. 363-377.
27. 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.
28. Knight, T. W., Cosgrove, G. P., Death, A. F., Anderson, C. B., Fisher, A. D. (2000). Effect of method of castration bulls on their growth rate and live weight. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 43: 187-192.
29. Kutzler, M., Wood, A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66: 514-525.
30. Laudat, A., Guechot, J., Palluel, A. M. (1998). Seminal androgen concentrations and residual sperm cytoplasm. *Clinica Chimica Acta*, 276: 11-18.
31. Lincoln, G. A., Fraser, H. M., Fletcher, T. J. (1982). Antler growth in male red deer (*Cervus elaphus*) after active immunization against LH-RH. *Journal of Reproduction and Fertility*, 66: 703-8.
32. Lincoln, G. A., Fraser, H. M., Abbott, M. P. (1986). Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77(2): 587-597.
33. Mann, T., Lutwak-Mann, C. (1981). *Male Reproductive Function and Semen*. Berlin: Springer-Verlag, 495 p.
34. Mehl, N. S., Khalid, M., Srisuwatanasagul, S., Swangchan-uthai, T., Sirivaidyapong, S. (2016). GnRH- agonist implantation of prepubertal male cats affects their reproductive performance and testicular LH receptor and FSH receptor expression. *Theriogenology*, 85: 841-848.
35. Melville, D. F., O'Brien, G. M., Crichton, E. G., Theilemann, P., Mckinnon, A., Johnston, S. D. (2011). Reproductive seasonality and the effect of the

- GnRH agonist deslorelin as a contraceptive in captive male black flying-foxes (*Pteropus alecto*). *Theriogenology*, 77: 652- 661.
- 36.Ortega, P. A. (2001). La sobrepoblación canina: un problema con repercusiones potenciales para la salud humana. *Revista Biomedical*, 12: 290-291.
- 37.Padula, A. M. (2005). GnRH analogues—agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science*, 88: 115-126.
- 38.Price, M.A., Tennesson, T. (1981). Pre-slaughter management and dark cutting in the carcasses of young bulls. *Canadian Journal of Animal Science*, 61: 205-208.
- 39.Purswell, B. J., Kolster, K. A. (2006). Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology*, 66: 510-3.
- 40.Rieger, D., Roberge, S., Coy, D. H., Rawlings, N. C. (1989). Effects of an LHRH antagonist on gonadotrophin and oestradiol secretion, follicular development, oestrus and ovulation in Holstein heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86: 157-164.
- 41.Rodríguez, L. V., Rohrer, M. V. (2014). Relevamiento de mamíferos presentes en zoológicos del Uruguay. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 64p.
- 42.Skinner, S. M., Prasad, S. V., Ndolo, T. M., Dunbar, B. S. (1996). Zona pellucida antigens: targets for contraceptive vaccines. *American Journal of Reproductive Immunology*, 35:163–74.
- 43.Soengas, J. L., Sanmartin, B., Barciella, P., Aldegunde, M., Rozas, G. (1993). Changes in carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* related to spermatogenesis. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 105: 665-671.
- 44.Thompson, D. L. (2000). Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Animal Reproduction Science*, 60-61:459-469.

45. Toydemir, T. S. F., Kiliçarslan, M. R., Olgaç, V. (2012). Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. *Theriogenology*, 77: 662-674.
46. Ungerfeld, R. (2002). *Reproducción en animales domésticos*. Montevideo, Ed. Melibea. V. I.
47. Ungerfeld, R., Fila, D. (2011). Testicular fluid content evaluated by ultrasound image computer assisted analysis increases with small-dose multiple GnRH injections in rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 46: 720–723.
48. Valiente, C., Garcia, R. G., Gobello, C. (2008). Uso de análogos de GnRH en el control de la reproducción indeseada canina. *Analecta Veterinaria*, 28: 45-51.
49. Vickery, B. H., McRae, G. I., Briones, W., Worden, A., Seidenberg, R., Shanbacher, B. D., Falvo, R. (1984). Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs. *Journal of Andrology*, 5: 28-42.
50. Vickery, B. H., McRae, G. I., Roberts, B. B., Worden, A. C., Bajka, A. (1985). Estrus suppression in the bitch with potent LHRH agonist analogs: a new approach for pet contraception. *Biology of Reproduction*, 32: 106-110.
51. Wright, P. J., Verstegen, J. P., Onclin, K. (2001). The suppression by progestin of oestrus responses of the bitch to the GnRH analogue deslorelin. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57: 263-8.