

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE CHIVOS LUEGO DE
LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE UN AGONISTA DE GnRH O LA
INMUNONEUTRALIZACIÓN CONTRA GnRH**

por

**Marcela Paula ACOSTA BURGUETE
Camila LOUREIRO GANDIOLI**



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

Orientación: Medicina Veterinaria



FV-33908

MODALIDAD Ensayo experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



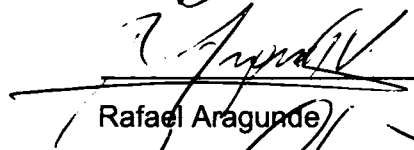
Danilo Fila

Segundo miembro (Tutor):



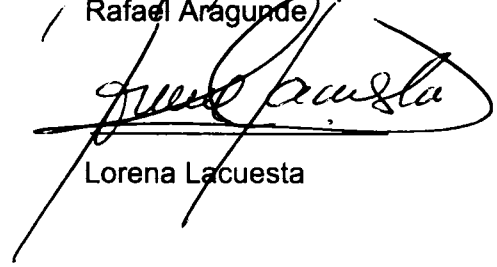
Julia Giriboni

Tercer miembro:



Rafael Aragunde

Cuarto miembro:



Lorena Lacuesta

Quinto miembro:

Rodolfo Ungerfeld

Fecha:

11/09/2019

Autor:



Marcela Paula Acosta Burguete



Camila Loureiro Gandioli

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a nuestras familias y amigos que fueron un gran soporte en todos estos años.

A nuestra tutora Julia Giriboni por su optimismo, apoyo, paciencia y dedicación durante todo el trabajo.

A nuestros co-tutores Lorena Lacuesta y Rodolfo Ungerfeld por su tiempo y sus aportes.

A Milton por su ayuda en el manejo con los animales.

A las funcionarias de bedelía y de biblioteca que siempre estuvieron muy dispuestas en ayudarnos.

TABLA DE CONTENIDO

cc

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Regulación neuroendocrina sobre la actividad reproductiva.....	10
1.2 Estacionalidad reproductiva.....	10
1.3 Modulación sobre la reproducción de la GnRH.....	11
1.3.1 Agonistas de la GnRH.....	12
1.3.2 Inhibición de la GnRH por anticuerpos.....	13
1.4. Ventajas del uso de la esterilización química reversible en relación a la esterilización quirúrgica.....	14
2. HIPÓTESIS.....	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos particulares.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 Animales, manejo y tratamientos.....	18
4.2. Circunferencia escrotal y fluido testicular.....	18
4.3. Concentración de testosterona.....	18
4.4. Colección de semen y evaluación de características seminales.....	19
4.5. Análisis estadístico.....	19
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Circunferencia escrotal.....	21
5.2. Ecografía testicular.....	22
5.3. Concentración de testosterona.....	23
5.4. Características seminales.....	24
6. DISCUSIÓN.....	27

7. CONCLUSIONES.....	30
8. BIBLIOGRAFÍA.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

FSH	Hormona Folículo Estimulante
GC	Grupo Control
GI	Grupo Implante
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropina
GV	Grupo Vacuna
HHG	Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal
HOST	Test de Incubación en un Medio Hipoosmótico
LH	Hormona Luteinizante
MM	Motilidad Masal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Circunferencia escrotal de chivos adultos tratados con uso crónico de un agonista de GnRH, chivos inmunoneutralizados contra GnRH y chivos control.....21
- Figura 2.** Intensidad del color de pixeles de ecografía de testículos de chivos tratados con uso crónico de un agonista de GnRH, chivos inmunoneutralizados y chivos control.....22
- Figura 3.** Concentración de testosterona de chivos adultos tratados con uso crónico de un agonista de GnRH, chivos inmunoneutralizados contra GnRH y chivos control.....24
- Figura 4.** Porcentaje de espermatozoides con morfología normal de chivos adultos tratados con uso crónico de un agonista de GnRH, chivos inmunoneutralizados contra GnRH y chivos control.....26

RESUMEN

Existen diversas formas de afectar negativamente la actividad reproductiva actuando sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. El objetivo de esta Tesis fue determinar cómo el uso crónico de un agonista de GnRH (administrado mediante implante de deslorelina) o la inmunoneutralización de la GnRH (a través de una vacuna anti-GnRH) afectan la actividad reproductiva de chivos adultos. Se utilizaron 23 chivos adultos de raza Gabón, a los que se separó en tres grupos: chivos tratados con un implante de deslorelina (grupo GI, n= 7), chivos inmunoneutralizados contra GnRH (grupo GV, n= 7) y chivos no tratados (grupo GC, n= 9). Durante un período de 13 meses, mensualmente se les midió la circunferencia escrotal (CE), se les realizó una ecografía testicular para comparar la cantidad de fluido testicular, y se les extrajo sangre para medir la concentración de testosterona. Además, se colectaron muestras de semen en las cuales se analizó: la motilidad masal (MM) y el porcentaje y la cantidad total de espermatozoides con: motilidad progresiva, morfología normal y membrana funcional. Los datos fueron comparados mediante ANOVA para medidas repetidas considerando como efectos principales el grupo, el tiempo y la interacción entre grupo y tiempo. La CE fue mayor en el GV que en el GC ($P= 0,009$) y que en el GI ($P= 0,04$), sin diferencias entre el GC y el GV. La intensidad del color de los pixeles y la concentración de testosterona se mantuvieron deprimidas en el GI y se vieron estimuladas en el GV sobre los últimos tres meses del experimento. La MM fue mayor en el GC que en el GV ($P= 0,001$) y que en el GI ($P= 0,0001$). El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue mayor en el GC que en el GV ($P= 0,0009$) y que en el GI ($P= 0,0003$). El porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue mayor en el GC que en el GV ($P= 0,001$) y este a su vez que en el GI ($P < 0,0001$). El total de espermatozoides con membrana funcional fue mayor en el GV que en el GC ($P= 0,01$) y que en el GI ($P= 0,01$). Se concluyó que el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de la GnRH afectaron negativamente la actividad reproductiva en los chivos adultos, pero el uso crónico de un agonista de GnRH produjo efectos negativos de mayor magnitud y de mayor duración que la inmunoneutralización de la GnRH.

SUMMARY

There are several ways to negatively affect the reproductive activity by acting on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis. In this thesis, the aim was to determine how the chronic use of a GnRH agonist (administered by deslorelin implant) or immunoneutralization against GnRH (through an anti-GnRH vaccine) affects the reproductive activity of adult bucks. We used 23 adult Gabon bucks separated into three groups: bucks treated with a deslorelin implant (group GI, n = 7), goats immunoneutralized against GnRH (group GV, n = 7) and untreated goats (group GC, n = 9). Over a period of 13 months, the scrotal circumference (SC) was measured monthly, a testicular ultrasound was performed to compare the amount of testicular fluid, and blood samples were obtained to measure testosterone concentration. In addition, semen samples were collected, and mass motility (MM) and the percentage and total amount of sperm with progressive motility, normal morphology and functional membrane were analyzed. Data was compared using ANOVA for repeated measures considering the group, the time and the interaction between group and time as main effects. The SC was greater in the GV than in the GC ($P = 0.009$) and in the GI ($P = 0.04$), without differences between the GC and the GV. Pixel color intensity and testosterone concentration remained depressed in the GI and were stimulated in the GV over the last three months of the experiment. The MM was higher in GC than in GV ($P = 0.001$) and in GI ($P = 0.0001$). The percentage of sperm with progressive motility was higher in GC than in GV ($P = 0.0009$) and than GI ($P = 0.0003$). The percentage of sperm with normal morphology was higher in the GC than in the VG ($P = 0.001$) and this in turn than in the GI ($P < 0.0001$). The total sperm with functional membrane was higher in GV than in GC ($P = 0.01$) and in GI ($P = 0.01$). It was concluded that the chronic use of a GnRH analogue and the immunoneutralization against GnRH negatively affected reproductive activity in adult bucks, but the chronic use of a GnRH agonist produced negative effects of greater magnitude and longer duration on the reproductive activity of bucks than immunoneutralization of GnRH.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Regulación neuroendocrina sobre la actividad reproductiva

La actividad reproductiva está regulada principalmente por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG) a través de la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) (Somoza, 2002). La GnRH es producida en los cuerpos celulares de las neuronas hipotalámicas y es transportada por medio del flujo axonal a los botones terminales que hacen sinapsis en los vasos del plexo capilar primario dentro de la eminencia media. Esta sangre luego viaja a través del sistema portahipofisario a los plexos capilares sinusoidales (secundarios) dentro de la adenohipófisis, donde una parte de la GnRH abandona los capilares y, por lo tanto, queda disponible para unirse a sus células blanco hipofisarias, las gonadotrofas (Thompson, 2000). La kisspeptina es un neuropéptido hipotalámico fundamental del eje HHG (Smith et al., 2014) dado que estimula la secreción de GnRH (Alvarado et al., 2015). La actividad de las neuronas que secretan GnRH es intermitente y como consecuencia, la secreción de la GnRH en la vasculatura portal es pulsátil (Adams, 2005) y cuando llega a una concentración umbral en la adenohipófisis, se liberan las gonadotrofinas LH y FSH. La concentración plasmática de la LH aparece también en forma pulsátil en la sangre periférica, la cual está siempre relacionada con los pulsos de la GnRH. En cambio, la concentración media de la FSH en la sangre periférica casi no varía, lo que se explica porque presenta una larga vida media (Bielli, 2002).

1.2. Estacionalidad reproductiva

La estacionalidad reproductiva es un mecanismo de adaptación que han desarrollado algunos mamíferos como estrategia para minimizar los impactos negativos ambientales (temperatura, humedad y disponibilidad de alimento) en la supervivencia de las crías (Lincoln y Short, 1980; Karsch et al., 1984; Malpoux et al., 1996). De esta manera, los períodos de mayor demanda energética de los animales, como el último tercio de gestación, el parto, la lactancia y el destete, ocurrirán

durante la temporada más favorable, que es generalmente cuando los recursos naturales necesarios para cubrir estas altas demandas energéticas son más abundantes (Favre et al., 2013; Goldman, 1999).

En Uruguay las cabras de la raza Gabón no presentan una estacionalidad reproductiva muy marcada, presentando un aumento en la actividad reproductiva en los meses de noviembre a abril (Giriboni, 2014). En cuanto a los machos, se observa una variación importante en el comportamiento y en la espermatogénesis (Chemineau et al., 1988). La disminución de la actividad espermatogénica en los meses de otoño-invierno provoca disminución del tamaño testicular, y en la actividad de las glándulas accesorias. La concentración de testosterona sérica también varía a lo largo del año, alcanzando niveles máximos desde comienzos del otoño hasta finales de primavera (Favre et al., 2013).

El inicio y la duración de la estación reproductiva depende de diferentes factores ambientales y fisiológicos como la latitud y el clima, la disponibilidad de alimento, la raza, la presencia de individuos del mismo sexo o del opuesto, los sistemas de reproducción y sobre todo del fotoperíodo (Fatet et al., 2011). El principal factor ambiental que afecta a la estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes es la duración del día (Fatet et al., 2011; Favre et al., 2013). La glándula pineal y su producto de secreción, la melatonina, están estrechamente relacionados con el fotoperíodo (Fatet et al., 2011; Favre et al., 2013; Goldman, 1999). A nivel ocular, la cantidad de horas luz es percibida con la consiguiente secreción de melatonina en las horas de ausencia lumínica, regulando así la secreción pulsátil de GnRH desde el hipotálamo (Fatet et al., 2011; Favre et al., 2013). Una de las consecuencias de estas variaciones en la secreción de GnRH es que dará lugar a un aumento en la secreción de LH y FSH (Favre et al., 2013). La función de estas gonadotropinas es mantener tanto la espermatogénesis como la esteroidogénesis en los testículos (Young y Nelson, 2001).

1.3. Modulación sobre la reproducción de la GnRH

Cuando se comenzaron a utilizar los análogos de GnRH, se observó que tuvieron un éxito limitado en el tratamiento de la infertilidad (Rippel y Johnson, 1976; Hsueh y Erickson, 1979). Más adelante, se observó que era más útil en protocolos de sincronización de celos y como método anticonceptivo, entre otros usos. Mediante la manipulación de la GnRH, es posible interferir en la fertilidad de las siguientes maneras: mediante el uso de los agonistas de GnRH se pueden ejercer efectos inhibidores cuando se administran crónicamente; y se puede evitar que la GnRH llegue a sus receptores hipofisarios mediante la neutralización de la misma en la sangre portal hipofisaria por medio de anticuerpos (Fraser, 1982).

1.3.1. Agonistas de GnRH

Existe una interacción entre la potencia del agonista, la dosis y la duración del tratamiento que determinan en gran medida si se inducen efectos pro o anti-fertilidad (Lincoln, 1986). La GnRH y sus análogos son utilizados frecuentemente en los sistemas de producción de los animales domésticos, ya sea para modular la fertilidad, el comportamiento y la productividad de los animales (Adams, 2005).

Los agonistas de GnRH, inicialmente, provocan un incremento en la liberación de LH y FSH desde la hipófisis y un aumento en el número de receptores de GnRH en la misma (Moraga et al., 2003). La exposición sostenida de gonadotrofos hipofisarios a alta concentración de GnRH endógena o exógena reduce la respuesta de las células a la estimulación posterior con GnRH, disminuyendo el número de sitios de unión de ésta a su receptor. Este proceso, denominado desensibilización homóloga, conduce a la supresión de la secreción de gonadotrofinas y es el mecanismo principal de la acción sostenida del agonista de la GnRH. Esta desensibilización puede ser mantenida a largo plazo (Ortmann et al., 2002).

Estos agonistas se unen al receptor de GnRH con alta afinidad e imitan la respuesta celular inducida por la propia GnRH. Esta respuesta conducirá a un aumento de la síntesis, la secreción de LH y FSH (efecto flare up), la internalización acelerada y la posterior degradación del receptor de GnRH. En el momento en que se administra GnRH de una forma continua o un agonista de vida larga, se inhibe la síntesis y

secreción de LH y FSH ya que al haber un aumento de esta GnRH sin un aumento compensatorio de la síntesis de sus receptores, se acelera el proceso de internalización y degradación de los mismos (Adams, 2005).

Existe comercialmente, un superagonista con una potencia tal vez 100 veces mayor que la de la GnRH endógena, el acetato de deslorelina (Lincoln, 1986). Este agonista de GnRH, se administra a una dosis baja y continua, inhibiendo la función del eje HHG, lo que provoca una incapacidad en los animales tratados para sintetizar y/o liberar FSH y LH. Esta dosis baja y continua reduce la funcionalidad de los órganos reproductores masculinos, la libido y la espermatogénesis y disminuye los niveles séricos de testosterona, a partir de las 4-6 semanas de la implantación. Enseguida de la implantación, se produce un aumento transitorio de corta duración, de unas 4 semanas, en el nivel sérico de testosterona. Se ha demostrado que el efecto farmacológico persiste en la circulación durante al menos seis meses tras la administración del medicamento (Anexo I a). Esta droga se utiliza en perros y hurones con el fin de inducir esterilidad transitoria. No hay datos reportados de su utilización en chivos.

1.3.2. Inhibición de la acción de la GnRH por anticuerpos

Una de las maneras de evitar que la GnRH llegue a sus receptores hipofisarios es mediante la neutralización de la misma por medio de anticuerpos (Fraser, 1982). La corta distancia y el tiempo que la GnRH viaja en estos vasos es donde es vulnerable al ataque de los anticuerpos. Si hay suficientes anticuerpos específicos en la sangre en circulación que entra en la eminencia media, entonces prácticamente toda la GnRH secretada en el plexo primario está estrechamente unida al anticuerpo. La unión al anticuerpo neutraliza la GnRH ya sea evitando que se difunda a través de las paredes capilares debido al tamaño del complejo o al enmascarar el sitio de unión del receptor en la molécula de GnRH (Thompson, 2000). Una inyección intravenosa de un anticuerpo de alta afinidad de alto título para GnRH es probablemente la forma más efectiva y claramente definida de inducir la inhibición selectiva inmediata de GnRH (Fraser, 1980) .

Existe una variación individual importante ante una inmunoneutralización activa existiendo respuestas variables en el sistema inmune de cada animal (Fraser, 1980), pudiendo diferir entre especies, razas y entre individuos de la misma raza (Aponte, 2017). A los 2 o 3 meses siguientes a la inmunoneutralización, algunos animales presentarán altos títulos de anticuerpos que se mantendrán durante varios meses, mientras que otros animales tendrán estos títulos con un período de vida corto y de baja producción (Fraser, 1980). Los animales que tengan una mayor respuesta inmune, tendrán niveles de gonadotrofinas no detectables o bajos en la sangre con una reducción de la secreción de testosterona y la involución de los testículos (Fraser, 1980; Turkstra, 2006) por un período prolongado. Por otro lado, los animales con pobre respuesta inmune mostrarán un efecto menos marcado con respecto a los niveles hormonales y la función testicular. Esta variabilidad puede reducirse mediante inmunotrazaciones de refuerzo, de modo que todos los animales puedan alcanzar los títulos necesarios de anticuerpos para lograr una inhibición exitosa de GnRH (Fraser, 1980).

Existe en el mercado un conjugado de proteína análogo sintético de la GnRH que produce supresión inmunológica de la función testicular temporal. Como muchas otras vacunas, es necesario un curso completo de inmunoneutralización que consiste en una dosis inicial seguida de una segunda dosis a las 4 semanas. La dosis inicial prepara las células de memoria inmunológica del animal pero no estimula los títulos efectivos de anticuerpos anti-GnRH. La segunda dosis, produce altos títulos de anticuerpos específicos anti-GnRH. Estos anticuerpos se unen y neutralizan a la GnRH endógena, lo que detiene temporalmente la estimulación de la hipófisis llevando a una disminución en los niveles de FSH y LH, inhibiendo la función testicular (Anexo I b). Esta droga es de uso en cerdos para control del olor sexual antes del sacrificio. No está probada para el uso en chivos.

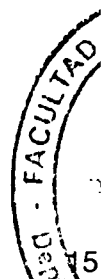
1.4. Ventajas del uso de la esterilización química reversible en relación a la esterilización quirúrgica

En los animales de producción, como es el caso de los cerdos, una de las ventajas que la esterilización química presenta frente a la quirúrgica es que afecta menos la

calidad de la carcasa y genera menores costos de alimentación, ya que la conversión de alimento es más eficiente (Turkstra, 2006). Otra de las ventajas de la esterilización química es que este método es más sencillo, no doloroso, aplicable a mamíferos de ambos sexos y reversible con el tiempo en animales prepúberes y adultos. Además, es aplicable para prevenir la preñez en terneras y vacas en el período previo al sacrificio, para evitar la aparición del olor característico que presenta la carne de cerdo y para suprimir la actividad ovárica y la conducta sexual durante la época reproductiva en las yeguas (Basulto et al., 2003). Por otro lado, en muchas especies, como es el caso de los chivos, existen individuos dominantes y subordinados. Si se agrupan chivos desconocidos, existirá agresividad que afectará el bienestar, la salud y la producción, debido a que pelearán por sus posiciones de dominancia. Esta reorganización de las jerarquías sociales es estresante, por lo que habrá aumento en la secreción de cortisol (Sánchez-Dávila et al., 2018). La esterilización química ofrece una solución frente a estos problemas de agresividad, sin que sea un método de esterilización permanente.

En este trabajo, la administración de deslorelina y del conjugado de proteína análogo sintético del GnRH, son los tratamientos que se utilizaron. Estos inhiben la secreción de GnRH y por lo tanto de LH y FSH, lo que afectará negativamente a la espermatogénesis. Por lo tanto, es esperable que los siguientes parámetros se afecten negativamente: circunferencia escrotal, cantidad de fluido testicular, concentración de testosterona, motilidad masal, y cantidad total de espermatozoides con motilidad progresiva, con morfología normal, y con membrana funcional.

Hasta el momento no hay datos reportados de cómo afectan estas dos drogas a los chivos adultos, siendo una especie que presenta un gran crecimiento poblacional en el país y en el mundo.



2. HIPÓTESIS

La administración de deslorelina y del conjugado de proteína análogo sintético de la GnRH causan esterilidad reversible en chivos adultos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de la inhibición de la GnRH mediante la administración crónica de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización por anticuerpos de la GnRH sobre la actividad reproductiva en chivos adultos.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los efectos de la inhibición de la GnRH mediante la administración crónica de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de la GnRH por anticuerpos sobre los siguientes parámetros:

- circunferencia escrotal
- cantidad de fluido testicular
- concentración de testosterona
- características seminales (motilidad masal, total de espermatozoides con motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides con morfología normal y total de espermatozoides con membrana funcional)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales, manejo y tratamientos

Se utilizaron 23 chivos de raza Gabón de entre 5 y 7 años, los cuales fueron alimentados con alfalfa cubriendo los requerimientos nutricionales y agua *ad libitum*. Parte de ellos permanecieron en el Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, Libertad, San José y la otra parte en las instalaciones de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, Montevideo. A los animales se los separó en 3 grupos; a uno de los grupos se los trató con un implante subcutáneo de un agonista de GnRH conteniendo 4,7 mg de acetato de deslorelina (Virbac, Barcelona, España) (GI, n= 7), el otro grupo fué inoculado con una vacuna anti-GnRH (300 µg de un análogo incompleto de GnRH diluido en 2 mL s/c, Improvac, Zoetis, Montevideo, Uruguay; booster a las 4 semanas) (GV, n= 7). Los restantes chivos fueron el grupo control (GC, n= 9), a los cuales no se les administró ningún tratamiento. Los procedimientos mencionados fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria. Se aplicaron los tratamientos al inicio de la estación reproductiva. A partir del cuarto mes de aplicados y durante 13 meses se realizaron muestreos mensuales de variables testiculares, concentración de testosterona y variables seminales.

4.2. Circunferencia escrotal y fluido testicular

La circunferencia escrotal (CE) se midió utilizando un escrotímetro y se realizaron ecografías testiculares con un equipo B-mode (Wed9618V, Wellid, 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). Se analizó la intensidad del color de los píxeles de las imágenes en una escala de grises que varía entre 0 y 255 (0 = negro; 255 = blanco) utilizando un software apropiado (ImageProplus 3.01, Media Cybernetics, Los Ángeles, EEUU).

4.3. Concentración de testosterona

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas en horario matutino, por venopunción yugular, y posteriormente fueron centrifugadas para la obtención de suero. La concentración de testosterona se determinó a través de la técnica de radioinmunoanálisis utilizando un kit comercial de fase sólida (TESTO-CT2, CisbioBioassays, Codolet, France), que se realizó en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Montevideo.

4.4. Colección de semen y evaluación de características seminales

El semen se colectó mediante un electroeyaculador (Fuhijira Industry, Tokyo, Japón) que cuenta con un vástago de 30 x 1,5 cm con 4 electrodos circulares de 1 cm de ancho. Previo a la colección del semen, se extrajo manualmente la materia fecal del recto para un mejor contacto del vástago con la mucosa rectal. Se introdujo el vástago en el recto y se aplicaron estímulos eléctricos y crecientes en intensidad. Se inició con una serie de 2 pulsos de 3 V cada 5 s y luego se fue incrementando la frecuencia y la intensidad hasta alcanzar pulsos de 5 V cada 3 s hasta la eyaculación. El pene se ubicó dentro de una copa de vidrio previamente mantenida a 37 °C para obtener el eyaculado. Luego de colectada la muestra, el semen se analizó según Giriboni et al. (2019). Brevemente, el semen fresco se evaluó en un microscopio de luz con contraste de fase con una platina térmica a 37 °C. En primer lugar, se evaluó la motilidad masal (MM), que se valoró en una escala subjetiva de 0 a 5 (siendo 0 cuando no se observó ningún movimiento y 5 cuando se observaron ondas amplias y rápidas). Luego se tomó una alícuota de semen y se diluyó en leche descremada UHT para determinar el porcentaje de espermatozoides con motilidad individual progresiva. Luego se fijó una alícuota de semen fresco en formol citrato que se refrigeró para una posterior evaluación del porcentaje de espermatozoides con morfología normal y se determinó la concentración espermática. Otra alícuota de semen fue colocada en un medio hipoosmótico para evaluar la integridad funcional de la membrana del espermatozoide (HOST). Luego se determinó el volumen del eyaculado y se calculó la cantidad total de espermatozoides, la cantidad total de espermatozoides motiles progresivos, con

morfología normal, también se determinó el porcentaje y la cantidad total de espermatozoides con membrana funcional.

4.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron comparados mediante ANOVA para medidas repetidas mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis Software, University Edition) considerándose como efectos principales el grupo, el tiempo y la interacción entre grupo y tiempo. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

5. RESULTADOS

5.1. Circunferencia escrotal

La CE fue menor en el GI ($19,6 \pm 0,4$ cm) que en el GC ($20,8 \pm 0,3$ cm, $P= 0,04$) y que en el GV ($21,3 \pm 0,4$ cm, $P= 0,009$); no se observaron diferencias entre el GC y el GV. Se observó una interacción entre grupo y tiempo ($P < 0,0001$). En el mes 4 después del tratamiento, la circunferencia escrotal fue mayor en el GC ($21,6 \pm 0,5$ cm) que en el GI ($19,6 \pm 0,6$ cm, $P= 0,02$). En los meses 10, 15, 16 y 17 después del tratamiento, la circunferencia escrotal fue mayor en el GV ($21,8 \pm 0,6$ cm; $22,8 \pm 0,7$ cm; $22,8 \pm 0,7$ cm, y $22,2 \pm 0,7$ cm) que en el GC ($21,3 \pm 0,5$ cm, $P= 0,003$; $21,3 \pm 0,5$ cm, $P= 0,0003$; $21,2 \pm 0,6$ cm, $P= 0,0004$; y $22,2 \pm 0,6$ cm, $P= 0,05$, respectivamente) y que en el GI ($19,0 \pm 0,6$ cm, $P= 0,007$; $19,4 \pm 0,7$ cm, $P= 0,03$; $19,5 \pm 0,7$ cm, $P= 0,04$; y $20,3 \pm 0,7$ cm, $P= 0,03$, respectivamente) (Figura 1).

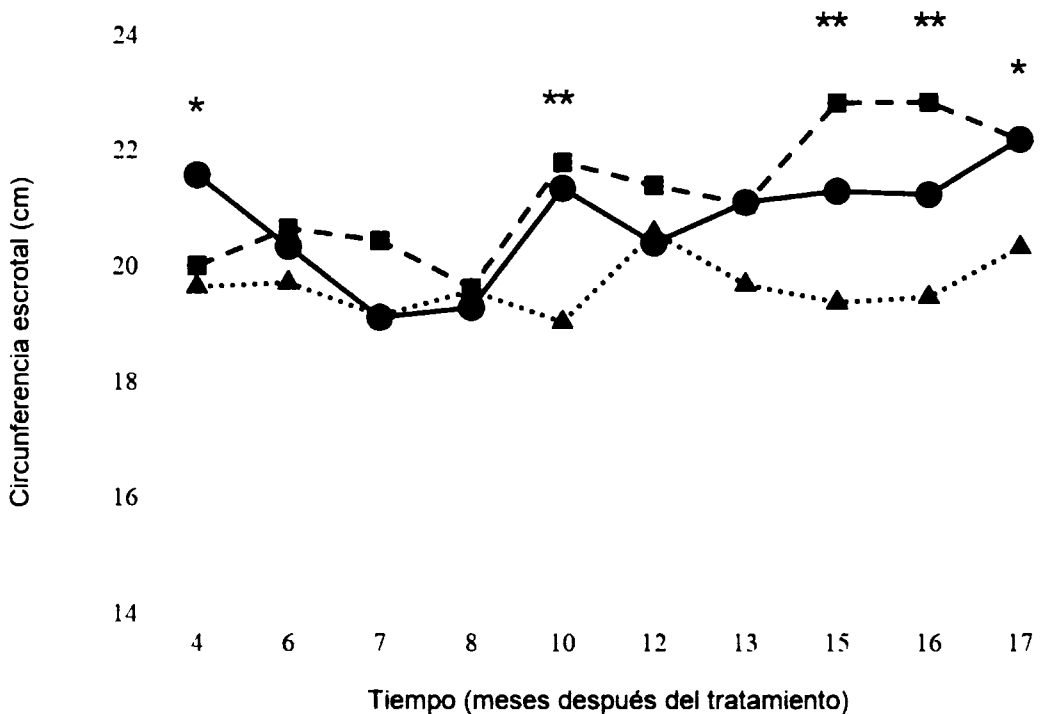


Figura 1. Circunferencia escrotal de chivos adultos tratados con uso crónico de un agonista de GnRH ($-\blacktriangle-$, $n= 7$) o inmunoneutralización de GnRH ($-\square-$, $n= 7$) y

chivos control (—○—, n= 9). El asterisco (*) indica diferencias entre grupos para un mismo tiempo. *P≤ 0,05. **P≤ 0,01.

5.2. Ecografía testicular

La intensidad del color de los pixeles no fue diferente entre grupos. Se observó una interacción entre grupo y tiempo (P< 0,0001). En el mes 7 después del tratamiento, la intensidad de pixeles fue mayor en el GV (132,1 ± 4,4) que en el GI (126,6 ± 4,4, P< 0,0001) y que en el GC (105,8 ± 4,1, P= 0,0007); no se observaron diferencias entre el GI y el GV. En el mes 9 después del tratamiento, la intensidad de pixeles fue mayor en el GC (127,1 ± 4,4) que en el GI (113,3 ± 4,7, P= 0,03); no se observaron diferencias entre los demás grupos. En el mes 17 después del tratamiento, la intensidad de pixeles fue mayor en el GI (103,4 ± 5,2) que en el GC (100,5 ± 4,7, P= 0,008) y que en el GV (83,6 ± 5,2, P= 0,02); no se observaron diferencias entre el GC y el GI (Figura 2).

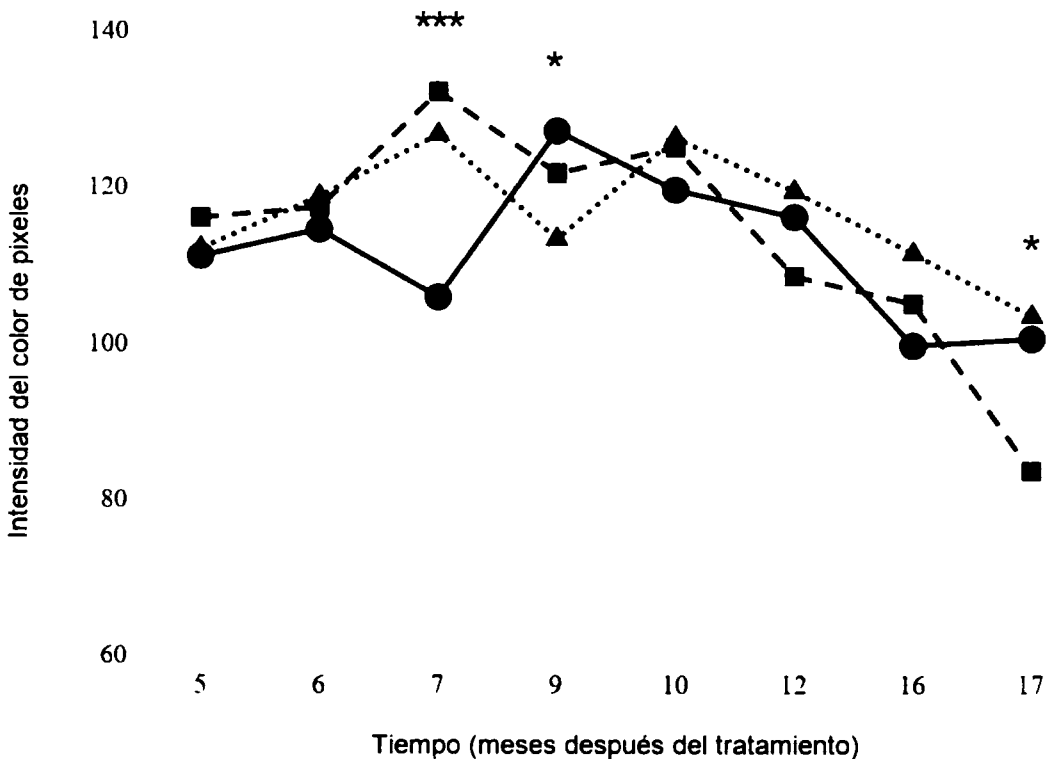


Figura 2. Intensidad del color de pixeles de ecografías de chivos adultos tratados con uso crónico de un agonista de GnRH (-▲-, n= 7) o inmunoneutralización de GnRH (-□-, n= 7) y chivos control (-o-, n= 9). El asterisco (*) indica diferencias entre grupos para un mismo tiempo. *P ≤0,05. **P≤ 0,01. P***<0.0001

5.3. Concentración de testosterona

La concentración de testosterona no fue diferente entre grupos. Se observó una interacción entre grupo y tiempo (P< 0,0001). En el mes 4 después del tratamiento, la concentración de testosterona fue mayor en el GC ($19,3 \pm 3,0$ nmol/L) que en el GI ($7,4 \pm 3,4$ nmol/L, P= 0,01) y que en el GV ($7,1 \pm 3,4$ nmol/L, P= 0,008). En los meses 15 y 16 después del tratamiento, la concentración de testosterona fue mayor en el GV ($29,1 \pm 3,8$ nmol/L; $23,2 \pm 3,8$ nmol/L) que en el GC ($25,5 \pm 3,6$ nmol/L, P= 0,0007; $19,4 \pm 3,0$ nmol/L, P= 0,003, respectivamente) y que en el GI ($10,6 \pm 3,8$ nmol/L, P= 0,005; $6,9 \pm 3,8$ nmol/L, P= 0,01, respectivamente). En el mes 17 después del tratamiento, la concentración de testosterona fue mayor en el GV ($33,3 \pm 3,8$ nmol/L) que en el GC ($16,4 \pm 3,2$ nmol/L, P= 0,0007) y que en el GI ($8,6 \pm 3,8$ nmol/L, P <0,0001) (Figura 3).

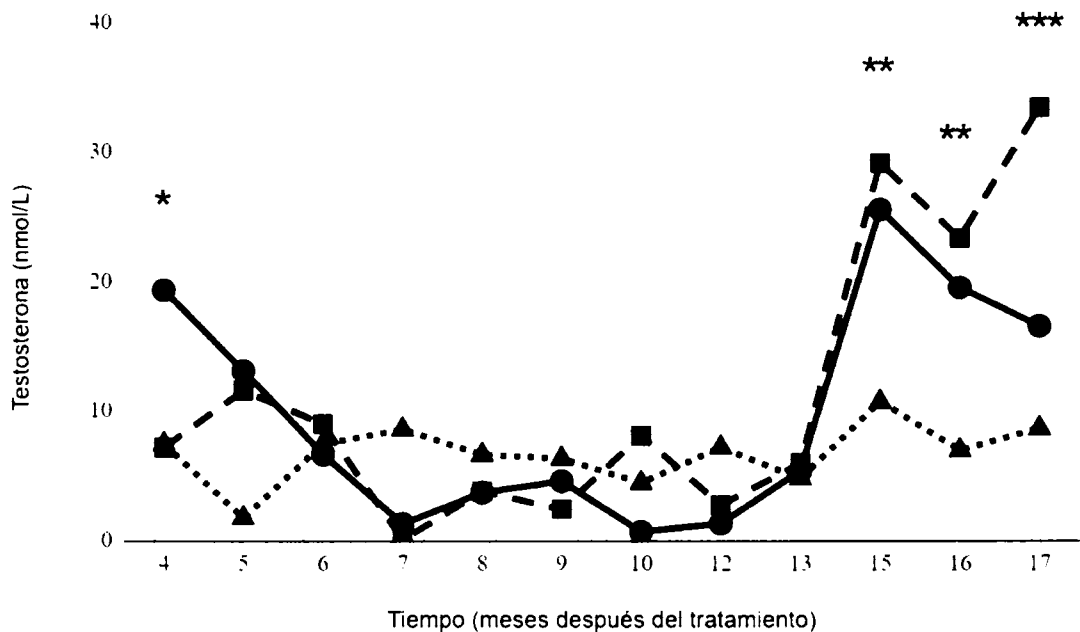


Figura 3. Concentración de testosterona de chivos adultos tratados con uso crónico de un agonista de GnRH (-▲-, n= 7) o inmunoneutralización de GnRH (-◻-, n= 7) y chivos control (-o-, n= 9). El asterisco (*) indica diferencias entre grupos para un mismo tiempo. *P≤0,05. **P≤ 0,01. P***<0.0001

5.4. Características seminales

La MM fue mayor en el GC ($2,2 \pm 0,2$) que en el GV ($1,3 \pm 0,2$, $P= 0,001$) y que en el GI ($1,1 \pm 0,2$, $P= 0,0001$); no se observaron diferencias entre el GI y el GV. No se observó interacción entre grupo y tiempo.

El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue mayor en el GC ($55,5 \pm 3,0 \%$) que en el GV ($35,7 \pm 3,4 \%$, $P= 0,0009$) y que en el GI ($37,9 \pm 3,4 \%$, $P= 0,0003$) y no se observaron diferencias entre el GI y el GV. Hubo una interacción entre grupo y tiempo ($P= 0,008$). En los meses 4 y 13 después del tratamiento, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue mayor en el GC ($70,6 \pm 7,6 \%$ y $69,6 \pm 8,0 \%$) que en el GI ($41,0 \pm 9,2 \%$, $P= 0,01$ y $41,2 \pm 9,2 \%$, $P= 0,02$). En los meses 5 y 8 después del tratamiento, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue mayor en el GC ($61,7 \pm 7,6 \%$ y $56,0 \pm 8,5 \%$) que en el GV

($23,1 \pm 10,1$ %, $P= 0,003$ y $27,1 \pm 8,6$ %, $P= 0,02$). En los meses 7, 10 y 11 después del tratamiento, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue mayor en el GC ($57,7 \pm 8,0$ %; $67,7 \pm 8,0$ % y $44,7 \pm 9,2$ %) que en el GV ($29,3 \pm 8,6$ %, $P= 0,02$; $23,9 \pm 9,2$ %, $P= 0,0004$ y $18,9 \pm 9,2$ %, $P= 0,05$) y que en el GI ($15,3 \pm 9,2$ %, $P= 0,0007$; $22,0 \pm 9,2$ %, $P= 0,0003$ y $9,5 \pm 9,2$ %, $P= 0,008$). Sin embargo, el total de espermatozoides con motilidad progresiva no fue diferente entre grupos y no se observó interacción entre grupo y tiempo.

El porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue mayor en el GC ($56,0 \pm 2,2$ %) que en el GV ($43,5 \pm 2,5$ %, $P= 0,001$) y este a su vez que en el GI ($33,6 \pm 2,5$ %, $P< 0,0001$). Se observó una interacción entre grupo y tiempo ($P< 0,0001$). En el mes 4 después del tratamiento, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue mayor en el GC ($60,6 \pm 6,7$ %) que en el GI ($20,8 \pm 7,7$ %, $P= 0,0001$) y que en el GV ($18,8 \pm 7,1$ %, $P< 0,0001$). En los meses 7, 12 y 13 después del tratamiento, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue mayor en el GV ($36,4 \pm 7,1$ %; $52,6 \pm 7,7$ %, y $44,4 \pm 7,7$ %) que en el grupo control ($54,5 \pm 6,7$ %, $P= 0,04$; $70,7 \pm 7,1$ %, $P= 0,002$ y $50,8 \pm 7,1$ %, $P= 0,03$, respectivamente) y que en el GI ($14,6 \pm 7,7$ %, $P= 0,0001$; $17,7 \pm 7,7$ %, $P< 0,0001$ y $19,8 \pm 7,7$ %, $P= 0,004$, respectivamente). En el mes 10 después del tratamiento, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue mayor en el GC ($47,2 \pm 6,7$ %) que en el GI ($25,2 \pm 7,7$ %, $P= 0,03$) (Figura 4). Sin embargo, el total de espermatozoides con morfología normal no fue diferente entre grupos ni se observó interacción entre grupo y tiempo.

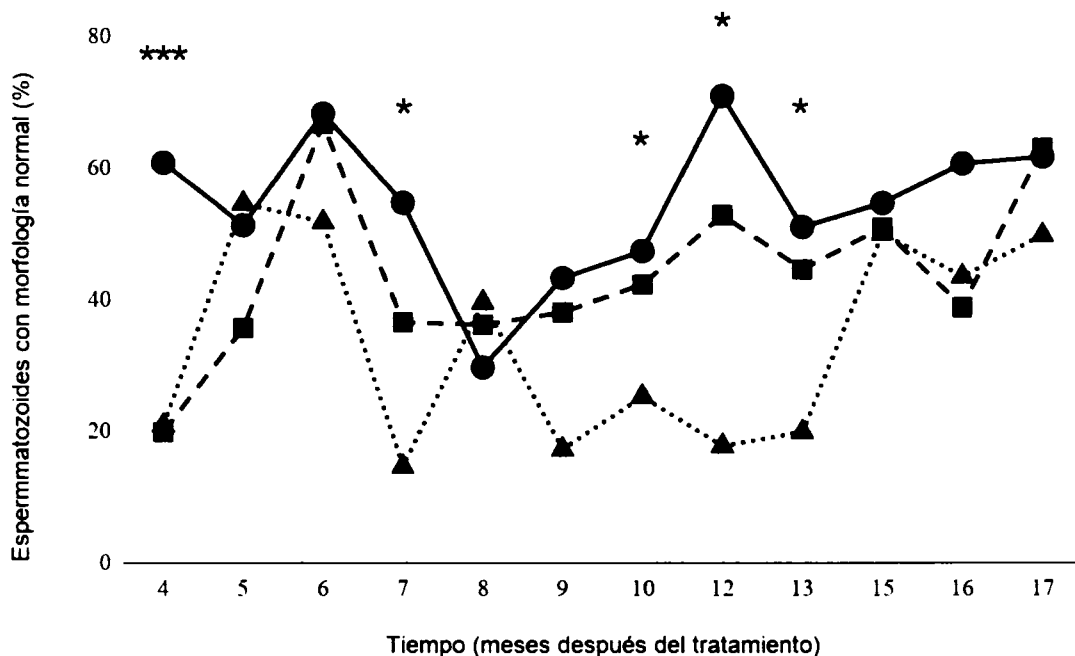


Figura 4. Porcentaje de espermatozoides con morfología normal de chivos adultos tratados con uso crónico de un agonista de GnRH (—▲—, n= 7) o inmunoneutralización de GnRH (—◻—, n= 7) y chivos control (—●—, n= 9). El asterisco (*) indica diferencias entre grupos para un mismo tiempo. *P≤ 0,05 y ***P≤ 0,0001.

El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fue mayor en el GC ($67,4 \pm 3,5$ %) que en el GI ($51,8 \pm 4,0$ %) y que en el GV ($50,0 \pm 4,0$ %) y no se observaron diferencias entre el GI y el GV. No hubo interacción entre grupo y tiempo.

El total de espermatozoides con membrana funcional fue mayor en el GV ($3,7 \pm 0,6 \times 10^9$) que en el GC ($1,5 \pm 0,5 \times 10^9$, P= 0,01) y que en el GI ($1,4 \pm 0,6 \times 10^9$, P= 0,01); no se observaron diferencias entre el GC y el GI. No se observó interacción entre grupo y tiempo.

6. DISCUSIÓN

Ambos tratamientos, el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización anti-GnRH, afectaron de manera negativa la reproducción en los chivos. Estos tratamientos actuaron de forma diferente en cuanto a los parámetros afectados, a la duración de sus efectos y a su magnitud. Con respecto a las características seminales, se observó que el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y la cantidad total de espermatozoides con membrana funcional se afectaron negativamente en los primeros meses, pero hacia el final del tratamiento los chivos que fueron inmunoneutralizados perdieron el efecto de supresión y apareció un efecto sobre-estimulador.

Los tratamientos podrían haber afectado de manera diferente la composición del semen. Una posible explicación podría ser que la concentración de testosterona fue mayor en los chivos inmunoneutralizados que en los tratados con un agonista de GnRH (Marina, 2003). Mientras que en los animales inmunoneutralizados se observó un notorio aumento en la concentración de testosterona e inclusive una sobreestimulación hacia el final del tratamiento, los animales tratados con el agonista de GnRH mantuvieron una baja secreción de testosterona durante todo el experimento y no llegaron a recuperarse. Otra explicación posible podría ser que algunos componentes del plasma seminal podrían estar afectando de distinta forma ciertas características seminales, como la morfología normal y la funcionalidad de la membrana funcional. En cuanto a las características seminales, éstas se mantuvieron afectadas durante más tiempo en los chivos tratados con el uso crónico del agonista de GnRH que en los inmunoneutralizados. Por lo tanto, el efecto negativo de los tratamientos se observó durante un período más prolongado en los animales tratados con el uso crónico del agonista de GnRH que en los inmunoneutralizados. Posiblemente esto es debido a que el implante colocado continuaría liberando droga que actúa sobre los receptores y de esta manera cumpliría su objetivo de supresión de la actividad reproductiva (Anexo Ia). En cambio, para mantener el efecto supresor sobre la actividad reproductiva de la inmunoneutralización, sería necesario revacunar para mantener un título de

anticuerpos suficiente ya que estos tienden a disminuir en el transcurso de los meses (Anexo Ib).

Durante la estación reproductiva y hacia el final del experimento (correspondiente a los meses 15, 16 y 17), la concentración de testosterona, la circunferencia escrotal y la cantidad de fluido testicular en los animales tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH se mantuvieron deprimidas, mientras que en el grupo de los animales inmunoneutralizados se vieron estimuladas, presentando valores aún mayores que en los animales no tratados. Los animales tratados con agonistas de GnRH tuvieron una caída en los niveles de testosterona a concentraciones basales debido a la disminución en el soporte gonadotrófico (Maenhoudt et al., 2014), es decir, que tendrían una disminución en las concentraciones de LH y FSH, a causa de la desensibilización hacia la GnRH por parte del eje HHG. También podrían ser causados por cambios en la capacidad de respuesta o desensibilización de las células de Leydig a la LH. Estos cambios hormonales en conjunto podrían explicar la disminución progresiva en la motilidad espermática y la marcada reducción de la circunferencia escrotal (Lucas, 2014). La espermatogénesis, que se desarrolla en el túbulo seminífero, principalmente en el compartimento luminal, requiere entre otros factores una alta concentración de testosterona. Este proceso, y sobre todo la meiosis, es testosterona dependiente (Marina, 2003). La disminución de la testosterona que se observó en los grupos tratados podría justificar un efecto negativo en la motilidad espermática y en la circunferencia escrotal. Por otro lado, la administración del conjugado de proteína análogo sintético del GnRH, lo que causaría la generación de anticuerpos que actuarían uniéndose a la GnRH evitando que difundan por los capilares debido al tamaño del complejo o enmascarando el sitio de unión del receptor a la molécula de GnRH (Thompson, 2000). Probablemente, la inmunoneutralización contra GnRH generó una supresión endógena de la secreción de GnRH llevando a una inhibición temporal de la función testicular y a la disminución de la secreción de LH y FSH (Zamaratskaia et al., 2008). En este trabajo, después de unos meses de administrada la vacuna y su booster, se observó que contrario a la inhibición de la función testicular, la circunferencia escrotal, la concentración de testosterona y el fluido testicular

aumentaron con valores aún mayores que los animales que no recibieron ningún tratamiento, lo que se podría llamar "efecto rebote". Se podría especular que este efecto se debe a que como el eje HHG estuvo tanto tiempo suprimido, cuando comienza a reactivarse la actividad normal, este eje se encuentra más sensible, provocándose una sobreestimulación del mismo frente a la GnRH.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede aseverar que ninguno de los tratamientos causó infertilidad completa en todos los chivos. Sin embargo, el tratamiento con el uso crónico del agonista de GnRH logró una supresión de la actividad reproductiva durante más tiempo que la inmunoneutralización. Debido a esto, si se quisiera lograr una supresión de esta actividad a corto plazo, por ejemplo durante una estación reproductiva, se recomendaría el uso de la inmunoneutralización. En cambio, si se quisiera un efecto de más largo plazo, durante más de una estación reproductiva, se debería considerar que el uso del agonista de GnRH, podría afectar al semen durante más de un año, por lo que se recomendaría el uso de esta opción.

7. CONCLUSIONES

- La inmunoneutralización de la GnRH y el agonista de GnRH afectaron negativamente la actividad reproductiva en los chivos adultos.
- El uso crónico de un agonista de GnRH produjo efectos negativos de mayor magnitud y de mayor duración sobre la actividad reproductiva de los chivos que la inmunoneutralización de la GnRH, especialmente sobre la concentración sérica de testosterona y la morfología espermática
- Ni la inmunoneutralización de la GnRH ni el agonista de GnRH causó infertilidad completa en todos los chivos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, T. E. (2005). Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 88: 127–139.
2. Alvarado, M. V., Carrillo, M., Felip, A. (2015). Melatonin-induced changes in kiss/gnrh gene expression patterns in the brain of male sea bass during spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 185: 69–79.
3. Anexo I a. Ficha técnica o resumen de las características del producto. Disponible en: https://vet.es.virbac.com/files/live/sites/es-vet/files/contributed/PDF/Folletos%20en%20PDF/Suprelorin/SPC/Suprelorin_SPC-1.pdf Fecha de consulta: 27/11/2018
4. Anexo I b. Ficha técnica o resumen de las características del producto. Disponible en: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140410128216/anx_128216_es.pdf Fecha de consulta: 20/11/2018
5. Aponte, P. M. (2017). Active immunization against GnRH in pre-pubertal domestic mammals : testicular morphometry, histopathology and endocrine responses in rabbits, guinea pigs and ram lambs. *Animal*, 1–10.
6. Basulto, R., Milanes, C., Rojas, A., Fuentes, F., Izquierdo, N., Bertot, J. A., Junco, J. (2003). Efectos de la inmunización contra GnRH sobre la estructura y función testicular en perros adultos. *Biotecnología Aplicada*, 20: 20–24.
7. Bielli A. (2002). Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho. En: Ungerfeld R (Ed.). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea, p. 81-94.
8. Chemineau, P., Pelletier, J., Guerin, Y., Colas, G., Ravault, J. P., Toure, G., Ortavant, R. (1988). Photoperiodic and melatonin treatments for the control of

- seasonal reproduction in sheep and goats. *Reproduction Nutrition and Development*, 28: 409–422.
9. Fatet, A., Pellicer-Rubio, M. T., Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, 124: 211–219.
 10. Favre, R. N., Bonaura, M. C., Mitaceck, M. C. G., Stornelli, M. C. (2013). Estacionalidad reproductiva en animales domésticos. Nuevas perspectivas en el gato (*Felis silvestris catus*) seasonality of reproduction in domestic animals : new perspectives in domestic cats (*Felissilvestriscatus*). *Analecta Veterinary*, 33: 42–49.
 11. Fraser, H. M. (1982). Antifertility effects of GnRH. *Journal of Reproduction and Fertility*, 64: 503–515.
 12. Fraser H.M. (1980) Inhibition of Reproductive Function by Antibodies to Luteinizing Hormone Releasing Hormone. En: Hearn J.P. (eds) *Immunological Aspects of Reproduction and Fertility Control*. Springer, Dordrecht, 143-167.
 13. Giriboni, J. (2014). Estímulo con hembras en celo y estacionalidad reproductiva de chivos adultos de Gabón. Tesis de maestría PEDECIBA, Udelar, 76 p.
 14. Giriboni, J., Lacuesta, L., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R. (2019). Chronic use of a GnRH-agonist (deslorelin) or immunization against GnRH: effects on testicular function and sperm quality of bucks. *Domestic Animal Endocrinology*, 106395. En prensa.
 15. Goldman, B. D. (1999). The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids*, 64: 679–685.
 16. Hsueh, A.J.W. Erickson, G.F. (1979) Extra-pituitary inhibition of testicular function by luteinizing hormone releasing hormone. *Nature, Lond.* 281, 66-67.
 17. Karsch, F.J., Bittman, L.E., Foster, L.D., Goodman, L.R., Legan, J.S., Robinson, E.J. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*. 40: 185- 231.
 18. Lincoln, G.A., Short, R.V. (1980). Seasonal breeding: Nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*. 36: 1-52.

19. Lincoln GA, Fraser HM, Abbott MP. (1986). Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *J Reprod Fertil*, 77(2): 587-597.
20. Lucas, X. (2014). Clinical Use of Deslorelin (GnRH agonist) in Companion Animals : A Review Deslorelin Use in Male Dogs. *Reproduction in Domestic Animal*, 49: 64–71.
21. Maenhoudt, C., Santos, N. R., Fontbonne, A. (2014). Suppression of Fertility in Adult Dogs. *Reproduction in Domestic Animal*, 49: 58–63.
22. Malpaux, B., Vigié, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Pelletier, J., Chemineau, P. (1996). Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, 42: 109-117.
23. Marina, S. (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*, 20: 213–225.
24. Moraga R., Saucedo E., García-Gimeno T., Rodenas JJ., Monzó A., Romeu A. (2003). Estudio comparativo entre dos protocolos de supresión hipofisaria en hiperestimulación ovárica controlada para fecundación in vitro. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 20: 283-289.
25. Ortmann, O., Weiss, J. M., Diedrich, K. (2002). Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. *Reproductive Biomedicine Online*, 5 : 1–7.
26. Rippel, R.H., Johnson, E.S. (1976) Inhibition of hCG-induced ovarian and uterine weight augmentation in the immature rat by analogs of GnRH. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 152, 432-436.
27. Sánchez-Dávila, F., Barragán, H. B., del Bosque-González, A. S., Ungerfeld, R. (2018). Social dominance affects the development of sexual behaviour but not semen output in yearling bucks. *Theriogenology*, 110: 168–174.
28. Smith, J. T., Hawken, P. A. R., Lehman, M. N., Martin, G. B. (2014). The role of kisspeptin in reproductive function in the ewe. En: *Reproduction in domestic ruminants VIII*. Juengel J. L., Miyamoto A., Price C., Reynolds L. P.,

- Smith M. F., Webb R. (Eds). *Reproduction in Domestic Ruminants*. Leicestershire. Context Products. V.8, p. 105-116.
29. Somoza G. (2002). Eje hipotálamo-hipofisario. Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). En: Ungerfeld R (Ed.). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea, p. 17-23.
 30. Thompson, J. (2000). Immunization against GnRH in male species (comparative aspects), *Animal Reproduction Science*, 60-61: 459–469.
 31. Turkstra, J. (2006). Active immunization against gonadotropin-releasing hormone, an effective tool to block the fertility axis in mammals. Tesis de doctorado, Universidad de Utrecht, Países Bajos, p. 53-68.
 32. 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.
 33. Young, K. A., Nelson, R. J. (2001). Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction*, 122: 677–685.
 34. Zamaratskaia, G., Rydhmer, L., Andersson, H. K., Lundstr, K. (2008). Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac TM, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Animal Reproduction Science*, 108: 37–48.