



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**Alternativas para el control de la reproducción de
chivos: uso de agonistas de GnRH e inmunización
contra GnRH**

Julia Giriboni

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Uruguay

2020

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**Alternativas para el control de la reproducción de
chivos: uso de agonistas de GnRH e inmunización
contra GnRH**

Julia Giriboni

Dr. Rodolfo Ungerfeld, Ph.D.

Director de Tesis

Dr. Julián Santiago-Moreno, Ph.D.

Co - Director de Tesis

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Gustavo Gastal, Ph.D.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria –INIA La Estanzuela

Colonia, Uruguay

Presidente

Víctor Parraguez, Ph.D.

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

Santiago de Chile, Chile

Alejandra Stornelli, Ph.D.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

La Plata, Argentina

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

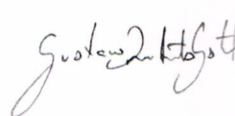
“Alternativas para el control de la reproducción de chivos: uso de agonistas de GnRH e inmunización contra GnRH”

Por: MSc. Julia GIRIBONI PINTO

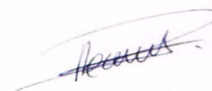
Director de Tesis: Dr. Rodolfo Ungerfeld
Codirector de Tesis: Dr. Julián Santiago-Moreno

Tribunal

Presidente: Dr. Gustavo Gastal



Segundo Miembro: Dr. Víctor Parraguez



Tercer Miembro: Dra. Alejandra Stornelli



Fallo del Tribunal: La tesis ha sido Aprobada con Mención. La revisión bibliográfica presentada en la tesis contextualiza muy bien los antecedentes para la realización de los experimentos realizados. Los resultados obtenidos son novedosos y contribuyen para el avance científico en el área. Gran parte de los datos ya están publicados en revistas internacionales. La presentación fue muy clara y bien planificada. Respondió a las preguntas del jurado con muy buena argumentación y conocimiento del tema.

Montevideo, 29 de octubre de 2020

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

AGRADECIMIENTOS

A *Unge*, por orientarme con la libertad suficiente para descubrir por mí misma qué hacer y cómo. Por su paciencia y disponibilidad infinitas. Por incentivarme a dar lo mejor de mí siempre.

A Julián Santiago-Moreno, que hizo que la distancia nunca fuera impedimento para compartir su saber. Por recibirme con tanta calidez en su laboratorio en Madrid.

A Lorena Lacuesta, quien trabajó tanto como yo en el Experimento III. Gracias por su enorme compromiso con este trabajo y su apoyo incondicional siempre.

A Florencia Beracochea que me orientó en las primeras congelaciones de semen del Experimento III y a Patricia Silveira por su colaboración en la descongelación.

A Rosalía Morales y a todas las estudiantes que participaron en el Experimento III, la mayoría hoy veterinarias: Melanie Piñeyrúa, Magdalena Machado, Carolina Vázquez, Marcela Acosta, Camila Loureiro, Leonor Sicalo y Madeleine Guerrero.

A Federico de León y Milton Pintos por su ayuda con el cuidado y manejo de los animales. A Fernando Fumagalli por su atención siempre amorosa a los chivos.

A mis compañeros de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, que me han brindado su apoyo a lo largo de todo este trayecto.

A todos los integrantes del Departamento de Reproducción de INIA Madrid. Especialmente a Cristina Castaño por enseñarme a analizar la morfometría espermática y a Rosario Vázquez por las mediciones de testosterona de los Experimentos I y II. A todos, gracias por su hospitalidad.

A Özdal Gökdal y Okan Atay, que me recibieron en la escuela de Çine para realizar los Experimentos I y II. También a Engin Yaralı, Ali Kemali Özüğür, Vadhulla Eren y Feridun Coşgun. Por su participación en los experimentos, pero sobre todo por recibirme en sus hogares y familias. A Güneş Erdoğan por realizar las ecografías del Experimento II. Muy especialmente a Leyla Saygılı Eken y Ali Göncü, que hicieron que Turquía tenga para mí un significado especial.

A CSIC que financió un proyecto para realizar el Experimento III y la pasantía en Turquía. A CIDEF que también financió parte del Experimento III. A la ANII que financió la pasantía en INIA Madrid. A la CAP que me otorgó una beca para realizar el Doctorado.

Por último, agradezco infinitamente a mis padres y mis hermanos, que son guía y sostén que me han traído hasta aquí. A mi compañero de vida y a mi hijo, que siempre me esperan pacientemente y con las sonrisas más lindas y hacen que todo el esfuerzo cobre sentido.

ESTRUCTURA DE LA TESIS Y PUBLICACIONES

Esta tesis reúne información generada en 3 experimentos que hasta el momento dieron lugar a la publicación de 3 artículos en revistas científicas internacionales. En este documento se presentan los aspectos más destacados de cada publicación. Además, se incluye información original aún no publicada (anexo IV). Las publicaciones completas se anexan al final de la Tesis y aparecen citadas en el texto con números romanos de acuerdo al siguiente orden:

- I. Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. Julia Giriboni, Özdal Gökdal, Vadullah Eren, Engin Yaralı, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. *Animal Reproduction Science* 200 (2019) 43-50. Anexo I.
- II. Short-term treatment with deslorelin implants to improve the bucks' ability to stimulate cyclic activity during the late non-breeding season. Julia Giriboni, Özdal Gokdal, Okan Atay, Ali Kemali Özüğür, Güneş Erdoğan, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. Aceptado para su publicación en *Small Ruminant Research*. Anexo II.
- III. Chronic use of a GnRH-agonist (deslorelin) or immunization against GnRH: effects on testicular function and sperm quality of bucks. Julia Giriboni, Lorena Lacuesta, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. *Domestic Animal Endocrinology* 71 (2020) 106395. Anexo III.

ÍNDICE

ESTRUCTURA DE LA TESIS Y PUBLICACIONES	1
ÍNDICE	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
1.1. <i>Regulación neuroendocrina de la reproducción en el macho</i>	<i>5</i>
1.1. <i>Control de la secreción de la GnRH, estructura y mecanismo de acción</i>	<i>7</i>
1.2. <i>Estacionalidad reproductiva en los rumiantes macho</i>	<i>8</i>
1.3. <i>Estimulación de la actividad reproductiva mediante la administración de GnRH o agonistas de GnRH en machos.....</i>	<i>10</i>
1.4. <i>Inhibición de la capacidad reproductiva mediante la administración crónica de agonistas de GnRH o inmunización contra GnRH en machos.....</i>	<i>15</i>
1.4.1. <i>Administración crónica de agonistas de GnRH.....</i>	<i>16</i>
1.4.2. <i>Inmunización activa contra GnRH.....</i>	<i>18</i>
2. FUNDAMENTACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS.....	21
3. HIPÓTESIS	23
3.1. <i>Hipótesis general.....</i>	<i>23</i>
3.2. <i>Hipótesis específicas.....</i>	<i>23</i>
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. <i>Objetivo general.....</i>	<i>24</i>
4.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>24</i>
5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	26
6. EXPERIMENTOS.....	27
6.1. <i>Experimento I</i>	<i>27</i>
6.2. <i>Experimento II.....</i>	<i>29</i>
6.3. <i>Experimento III</i>	<i>31</i>
6.3.1. <i>Anexo IV. Datos no publicados del Experimento III</i>	<i>35</i>
7. DISCUSIÓN GENERAL	44
8. CONCLUSIONES	51
9. REFERENCIAS.....	52
10. PUBLICACIONES	67

RESUMEN

La GnRH es un decapeptido que se sintetiza en el hipotálamo y se libera a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario, llegando a la adenohipófisis, donde estimula la secreción de las gonadotrofinas LH y FSH. Una forma de manipular la función reproductiva de los animales es a través de la administración de GnRH o sus análogos, modificando la sensibilidad de sus receptores, o a través de la inmunización contra GnRH. La potencia, dosis y duración de los tratamientos con agonistas de GnRH determinan si la misma hormona estimula o inhibe la reproducción. En esta Tesis se realizaron tres experimentos en chivos con el fin de estimular o de inhibir la actividad reproductiva. Los objetivos en los experimentos I y II fueron estimular la actividad reproductiva de los chivos a través de la administración de dos agonistas de GnRH (buserelina y deslorelina, respectivamente) por períodos cortos. El objetivo del experimento III fue inhibir la actividad reproductiva mediante dos tratamientos distintos: la administración crónica de un agonista de GnRH (deslorelina) y la inmunización contra GnRH. La administración de los dos agonistas de GnRH por períodos cortos fuera de la estación reproductiva aumentó la concentración de testosterona y mejoró la calidad del semen fresco (Experimento I), aunque no modificó la capacidad de los chivos de estimular cabras en anestro (Experimento II). Por otro lado, la administración crónica de un agonista de GnRH y la inmunización contra GnRH produjeron una disminución marcada de la actividad reproductiva de los chivos (Experimento III). De manera general, ambos tratamientos disminuyeron las concentraciones plasmáticas de testosterona y afectaron negativamente todas las características testiculares y espermáticas evaluadas. Sin embargo, la administración crónica de un agonista de GnRH produjo efectos más pronunciados y duraderos que la inmunización contra GnRH. En síntesis, a través de la administración de agonistas de GnRH y de la inmunización contra GnRH se estimuló o inhibió la actividad reproductiva de chivos. A partir de los resultados de esta Tesis se plantean nuevas estrategias para el control de la reproducción, tanto para mejorar la actividad reproductiva de chivos como para limitarla.

ABSTRACT

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) is a decapeptide synthesized in the hypothalamus and released into the hypothalamic-pituitary portal system to reach the adenohypophysis, where stimulates the secretion of the gonadotropins LH and FSH. The modification of the sensibility of its receptors by manipulation of GnRH itself or its analogues, or the immunization against GnRH alters the reproductive function of animals. The potency, dose and duration of treatments using GnRH agonists determine whether reproduction is stimulated or inhibited. In this Thesis, three experiments were performed in bucks, in order to stimulate or inhibit their reproductive activity. In Experiments I and II, the aims were to stimulate the reproductive activity of bucks through the administration of two GnRH agonists (buserelin and deslorelin, respectively) for short periods. In experiment III, the aim was to inhibit the reproductive activity by two different treatments: chronic treatment with GnRH and immunization against GnRH. The administration of both GnRH agonists for short periods during the non-breeding season increased the testosterone concentration and improved the quality of fresh semen (Experiment I), although it did not modify the ability of bucks to stimulate does in anestrus (Experiment II). On the other hand, chronic administration of a GnRH agonist and immunization against GnRH produced a pronounced decrease in the reproductive activity of bucks (Experiment III). In general, both treatments decreased the testosterone concentrations and negatively affected all the testicular and sperm characteristics evaluated. However, chronic administration of a GnRH agonist produced more patent and long-lasting effects than immunization against GnRH. In sum, through the administration of GnRH agonists and immunization against GnRH, the reproductive activity of bucks was stimulated or inhibited. Based on the results of this Thesis, new strategies are proposed for the control of reproduction, both to improve and to limit the reproductive activity of bucks.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La hormona liberadora de gonadotrofinas (*Gonadotrophin Releasing Hormone*: GnRH) es la hormona fundamental en la regulación nerviosa de la reproducción (Conn et al., 1987). Por lo tanto, una forma de manejar la función reproductiva es manipular farmacológicamente la GnRH o sus efectos, tanto para potenciar como para inhibir su acción, ya sea administrando esta hormona o análogos de la misma. Los tratamientos con GnRH pueden tener como objetivo estimular o inhibir la función reproductiva dependiendo de si se usa la propia hormona o análogos, y de la potencia, dosis y duración de la administración (Padula, 2005).

1.1. Regulación neuroendocrina de la reproducción en el macho

El proceso de reproducción de los mamíferos está regulado principalmente por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (eje HHG). En el nivel superior de este eje, el hipotálamo, se libera kisspeptina, que a su vez estimula la secreción pulsátil de GnRH (ver revisiones: Smith et al., 2006; Scott et al., 2019). La GnRH llega a la adenohipófisis a través del sistema porta hipofisario y allí estimula a la expresión de sus propios receptores en la superficie de las células gonadotropas (Stojilkovic et al., 1994), estimulando así la secreción de las gonadotrofinas LH (*Luteinizing Hormone*) y FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) (Amoss et al., 1971). En la mayoría de las situaciones, cada pulso de GnRH genera un pulso de LH (Levine y Duffy, 1988; Moenter et al., 1992). En cambio, la secreción de FSH está directamente relacionada con la reserva celular de esta hormona (Clarke y Parkington, 2014), y su patrón de secreción tiene un componente basal y un componente pulsátil (Padmanabhan y McNeilly, 2001). Tanto la LH como la FSH viajan por el torrente sanguíneo y actúan sobre las gónadas, donde estimulan la gametogénesis y la esteroidogénesis (ver revisión: Jeong y Kaiser, 2006). En los machos, la LH actúa directamente sobre las células de Leydig, donde estimula la producción de andrógenos, principalmente de testosterona (ver revisión: Stocco y McPhaul, 2006). Por su parte, la FSH tiene un rol central sobre el desarrollo de los testículos ya que controla la proliferación de las células de Sertoli, determinando el número y actividad de éstas (Meachem et al., 1996). Las células de Sertoli son fundamentales para la espermatogénesis porque

producen los metabolitos necesarios para las células germinales en el proceso de diferenciación (Griswold, 1998), funcionando como soporte físico y nutricional para las mismas (França et al., 2016). Además, la FSH tiene un rol directo importante sobre la espermatogénesis, ya que estimula su inicio (Arslan et al., 1993) y mantenimiento (Krishnamurthy et al., 2000). De todas formas, desde hace varios años se plantea que la espermatogénesis se puede dar normalmente en ausencia de FSH (Kumar et al., 1997).

Por su parte, la testosterona tiene muchas funciones que la convierten en la principal hormona sexual de los machos. Por un lado, la testosterona es fundamental para el inicio de la espermatogénesis, pero a diferencia de la FSH, es esencial para su mantenimiento (ver revisión: McLachlan et al., 2002). Sin embargo, los niveles de testosterona necesarios para el mantenimiento de la espermatogénesis son menores que los que se requieren para su inicio (Handelsman et al., 1999). Además, la testosterona también es fundamental para la espermiación, es decir, la liberación de los espermatoцитos a la luz de los túbulos seminíferos (Beardsley y O'Donnell, 2003). Por último, la testosterona cumple otras funciones, como regular la maduración espermática (Dyson y Orgebin-Crist, 1973), la erección y eyaculación (Corona et al., 2012), y el comportamiento sexual (ver revisión: Katz, 2007).

La secreción de GnRH y de las gonadotrofinas está retrocontrolada por las hormonas testiculares. Éstas actúan directamente en el hipotálamo inhibiendo la síntesis y/o secreción de GnRH o bien pueden inhibir las acciones de GnRH a nivel de la hipófisis. La testosterona es el principal esteroide que produce una retroalimentación negativa sobre la secreción de GnRH, LH y FSH, y la inhibina, que es una glicoproteína producida por las células de Sertoli, que se secreta de manera no pulsátil, inhibe principalmente la secreción de FSH (ver revisiones: Tilbrook et al., 1992; Tilbrook y Clarke, 2001). Como las neuronas secretoras de GnRH no tienen receptores para andrógenos (Huang y Harlan, 1993), la testosterona ejerce su retroalimentación negativa sobre la secreción de GnRH disminuyendo la expresión de las neuronas secretoras de kisspeptina (Han et al., 2017).

Una vez transportada por la sangre portal, la GnRH se une a sus receptores acoplados a proteína G presentes en la superficie de células gonadotropas en la adenohipófisis. La unión de la GnRH a su receptor induce la internalización del complejo hormona-receptor, dando inicio a la activación de una cascada de segundos mensajeros, fundamentalmente inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) que promueven la activación de las vías de la protein-quinasa activada por mitógeno (MAPK) que son en definitiva las que producen los efectos posteriores de la GnRH (ver revisión: Brown y Roberson, 2017). La unión de la GnRH a los receptores en las células gonadotropas genera como respuesta fisiológica la síntesis y secreción de gonadotrofinas. La estimulación de la síntesis de las gonadotrofinas es a través de estimular expresión génica de sus subunidades proteicas α y β , mientras que la promoción de la secreción se da por cambios en la despolarización de la membrana de las células gonadotropas (Pickering y Fink, 1976). La GnRH también produce otras respuestas celulares como aumento y disminución de la cantidad de sus propios receptores (Conn et al., 1984), desensibilización de las células gonadotropas a la propia GnRH (Conn et al., 1987), y disminución de la síntesis de receptores de gonadotrofinas (Auclair et al., 1977).

1.2. Estacionalidad reproductiva en los rumiantes macho

Muchas especies de rumiantes son reproductores estacionales y su ritmo de actividad reproductiva está determinado principalmente por el fotoperiodo (ver revisiones: Chemineau et al., 2008; Dardente et al., 2016). El patrón de la estacionalidad reproductiva varía con la especie, la raza, y la localización geográfica, tanto en intensidad como en duración. Por ejemplo, existen especies de ovejas y cabras en las que las hembras ciclan solamente durante algunas semanas en el otoño y otras en las que las ovulaciones se concentran en otoño, aunque se observan ovulaciones en las otras estaciones del año (en ovejas ver revisión: Rosa y Bryant, 2003; en cabras: Khanum et al., 2006; Samir et al., 2015). Pero, de forma general, tanto en caprinos como en ovinos, la estación reproductiva comienza en verano y los partos se concentran en primavera (Chemineau et al., 1992).

En las hembras, la estación reproductiva está marcada por el período de ovulación y estro, y fuera de la estación reproductiva permanecen en anestro (Chemineau et al., 1992). En los machos, se observan variaciones estacionales en su actividad testicular, que además comienza a aumentar antes de que las hembras comiencen a ciclar (Bronson, 1989). Cuando la cantidad de horas de luz comienza a disminuir, es decir, a medida que se acerca el otoño, las concentraciones de gonadotrofinas y testosterona (Delgadillo y Chemineau, 1992), la calidad del semen (Zarazaga et al., 2009) y la intensidad del comportamiento sexual (Lincoln y Davidson, 1977) se encuentran en sus valores máximos. Fuera de este período, la testosterona ejerce retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, disminuyendo la frecuencia de pulsos de GnRH y, por ende, la concentración de gonadotrofinas y testosterona (Tilbrook y Clarke, 2001).

Como ejemplo, los chivos Gabón fueron una de las razas utilizadas en esta Tesis. En nuestro país, los machos presentan una estacionalidad reproductiva poco marcada. Sin embargo, durante el período definido como estación reproductiva, los machos presentan mayor concentración de testosterona, mayor circunferencia escrotal, mayor proporción de fluido testicular y mejor calidad espermática (Giriboni et al., 2017).

Todas estas variaciones estacionales de la actividad reproductiva están determinadas por las variaciones estacionales de la actividad del eje HHG. En el hipotálamo, el núcleo supraquiasmático recibe información proveniente de la retina sobre la cantidad de horas de luz, y determina la cantidad de horas durante las que la glándula pineal secreta melatonina (ver revisión: Malpaux, 2006). La melatonina alcanza su concentración máxima durante la oscuridad, por lo que a medida que se acortan los días y aumentan las horas de oscuridad (a medida que se acerca el otoño) aumenta la cantidad de horas en las que la concentración de melatonina es alta. Estos cambios en la secreción de melatonina son la señal que permite a los animales percibir los cambios en el fotoperiodo (ver revisión: Bartness et al, 1993). El aumento en la cantidad de las horas en que se secreta melatonina modifica la actividad de las neuronas secretoras de kisspeptina, aumentando la secreción de dicha hormona, y conduciendo a un patrón de secreción de GnRH típico de la estación reproductiva (Chalivoix et al., 2010). A su vez, fuera de la estación

reproductiva, se observa una mayor cantidad de neuronas secretoras de GnIH, que contribuyen a la disminución de la secreción de GnRH (ver revisión: Clarke y Parkinson, 2014).

1.3. Estimulación de la actividad reproductiva mediante la administración de GnRH o agonistas de GnRH en machos

En algunas situaciones resulta de interés promover la reproducción de los animales, por ejemplo, para la conservación de algunas especies o en algunos sistemas productivos. Para el caso de los sistemas productivos que involucran animales con estacionalidad reproductiva, es de especial interés estimular la actividad reproductiva tanto de machos como de hembras en los períodos en los que dicha actividad se encuentra naturalmente inhibida o disminuida.

La importancia y posibles impactos de la GnRH puede valorarse al conocer que los primeros grupos que describieron su estructura molecular hace ya casi 50 años (porcinos: Schally et al., 1971; ovinos: Amoss et al., 1971) recibieron el premio Nobel por este hallazgo. Desde ese momento el estudio de los efectos de la GnRH, sobre todo los relacionados a los efectos liberadores de LH y los inductores de la ovulación no ha cesado. En estrecho vínculo con lo anterior, el desarrollo de agonistas de GnRH más potentes que la propia GnRH y los estudios de los efectos de la administración de agonistas de GnRH aumentaron significativamente, ya que tienen aplicaciones prácticas directas sobre la infertilidad, tanto de hembras como de machos (Adams, 2005; Picard-Hagen et al., 2015; Lambalk et al., 2017).

Si bien la administración de GnRH estimula la secreción de gonadotrofinas y por ende la actividad reproductiva (ratas: Waring y Turgeon, 1980; vacas: Rodriguez y Wise, 1991), esta hormona tiene una vida media muy corta, de 2 a 10 min dependiendo de la especie (Miyachi et al., 1973; Redding et al., 1973). Por lo tanto, para producir efectos más duraderos se suelen utilizar agonistas de GnRH, que además de una vida media mayor, tienen mayor eficacia, mayor resistencia a la degradación enzimática y mayor afinidad por los receptores de GnRH que la propia GnRH (ver revisión: Chillik y Acosta, 2001). Todas estas características hacen que los efectos producidos por agonistas de GnRH además de ser más duraderos sean

más potentes. La acción agonista de los análogos de GnRH se logra gracias a la modificación de los aminoácidos 6 y 10 de la molécula de GnRH original. El reemplazo de la glicina en la posición 6 por D-aminoácidos disminuye la degradación enzimática aumentando la vida media y aumenta la afinidad por el receptor de GnRH, mientras que el reemplazo de la glicina en la posición 10 por un terminal NH₂-etilamida aumenta la potencia de la GnRH (ver revisión: Chillik y Acosta, 2001).

Actualmente existe gran variedad de agonistas de GnRH que se utilizan frecuentemente con distintas finalidades. En medicina humana y veterinaria los agonistas de GnRH se utilizan principalmente en tratamientos contra cánceres hormono-sensibles y endometriosis, así como en procedimientos de reproducción asistida (Chillik y Acosta, 2001; Adams, 2005) (Tabla 1). Los agonistas de GnRH al unirse a los receptores de GnRH con alta afinidad, mimetizan la respuesta celular inducida por la GnRH (Conn y Crowley, 1994) y promueven la síntesis y secreción de gonadotrofinas (Clayton, 1988), tanto a partir de hormonas ya sintetizadas, reservadas en las células gonadotropas (Lincoln, 1976) o a partir de síntesis *de novo* (Pickering y Fick, 1979a), alcanzando concentraciones suprafisiológicas. La respuesta hipofisaria a la GnRH está determinada por la concentración de receptores de GnRH en las células gonadotropas, que está en gran medida, determinada por la propia GnRH. De hecho, la administración pulsátil de GnRH aumenta la concentración de ARNm del receptor de GnRH mientras que el cese de la estimulación hipofisaria por GnRH la disminuye (ver revisión: Rispoli y Nett, 2005).

Tabla 1. Estructura y principales características farmacológicas de los agonistas de GnRH utilizados más frecuentemente.

Agonista de GnRH	Aminoácidos modificados en relación GnRH-I	Principales características farmacológicas	Referencia
Deslorelina	(D-Trp) ⁶ y (NH ₂ -Et) ¹⁰	Potencia 7-144 veces mayor que la GnRH Biodisponibilidad casi completa Vida media ~20 min	Ficha técnica Agencia europea para la evaluación de medicamentos, 2002 Padula, 2005
Buserelina	(Ser) ⁶ y (NH ₂ -Et) ¹⁰	Potencia 20-170 veces mayor que la GnRH	Brogden et al., 1990 Carrizo, 2001

		Biodisponibilidad alta (~70%) Vida media 50-80 min	
Nafarelina	(2Nal) ⁶ y (Gly-NH ₂) ¹⁰	Potencia 3-10 veces mayor que la GnRH Biodisponibilidad baja Vida media 2-3 h	Chrisp y Goa, 1990 Ficha técnica Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2018
Goserelina	(Ser) ⁶ y (AzaGly-NH ₂) ¹⁰	Potencia 10-20 veces mayor que la GnRH Biodisponibilidad casi completa Vida media 4-5 h	Perry y Brogden, 1996 Carrizo, 2001 Ficha técnica Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2020
Leuprorelina	(Leu) ⁶ y (NH-Et) ¹⁰	Potencia 15-50 veces mayor que la GnRH Biodisponibilidad alta (~90%) Vida media ~3 h	Ficha técnica Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2019 Carrizo, 2001
Histrelina	(D-His) ⁶ y (AzaGly-NH ₂) ¹⁰	Potencia 150-200 veces mayor que la GnRH Biodisponibilidad alta (~90%) Vida media ~4 h	Deeks, 2010 Ficha técnica Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2012
Triptorelina	(Trp) ⁶ y (Gly-NH ₂) ¹⁰	Potencia 13-100 veces mayor que la GnRH Biodisponibilidad media (~40%) Vida media 3-5 h	Ficha técnica Agencia española de medicamentos y productos sanitarios – España, 2017

Los superíndices 6 y 10 indican la posición del aminoácido modificado respecto a la GnRH-I.

Los agonistas de GnRH son ampliamente utilizados en biotecnologías reproductivas en las hembras. Por ejemplo, se utilizan en protocolos de sincronización de la ovulación en vacas y cabras (Day, 2018; Hashem y Sallam, 2020), en tratamientos de superovulación y transferencia de embriones en ovejas (Menchaca et al., 2009), y en el manejo de folículos quísticos en vacas y vaquillonas (Thatcher et al., 1993). Aunque la GnRH y sus agonistas son utilizados más comúnmente para controlar la fertilidad y los eventos reproductivos en hembras, se utilizan cada vez más para

modular la fertilidad, el comportamiento y la productividad de los machos. Sin embargo, en muchos casos los resultados de la administración de agonistas de GnRH en machos son inconsistentes y varían en gran medida según el agonista de GnRH utilizado, las dosis aplicadas y también con la duración de los tratamientos (Tabla 2). En un estudio antiguo en carneros se demostró que la administración de pequeñas dosis diarias de un agonista de GnRH (10 µg de buserelina) durante 8 días indujo un rápido aumento en la secreción de LH, FSH y testosterona. Sin embargo, un día antes de finalizar el tratamiento se observó un cambio en el patrón de secreción de LH, sugiriendo que se había producido una refractariedad de la hipófisis a la administración del agonista de GnRH. Además, los testículos disminuyeron la secreción de testosterona, probablemente por una desensibilización de las células de Leydig a la LH (Fraser y Lincoln, 1980). También en carneros, se demostró que la administración de un análogo de GnRH (50 µg de buserelina) durante 21 días indujo un aumento inicial en la secreción de gonadotrofinas y testosterona. Sin embargo, esta respuesta no fue sostenida ya que a los 10 días de iniciado el tratamiento, los valores de LH, FSH y testosterona se encontraban bajos, y al final del mismo se observó una desensibilización de la hipófisis a la GnRH pese a que los testículos sí respondían a la administración de LH (Lincoln et al., 1986). En el mismo sentido, el tratamiento agudo con buserelina (9 dosis de 7 ng separadas por una hora) aumentó el contenido de líquido testicular en carneros (Ungerfeld y Fila, 2011). En camellos, la administración de tres dosis de otro agonista de GnRH (100 µg de gonadorelina separadas por 2 días) aumentó muy rápidamente la concentración de testosterona, disminuyó el tiempo del procedimiento de colecta de semen y aumentó la concentración espermática (Monaco et al., 2015). Por último, la administración de una única dosis de otro agonista de GnRH (100 µg de fertilerina) aumentó la concentración de testosterona y el volumen y flujo sanguíneo testicular en chivos (Samir et al., 2015). Aunque los efectos positivos de la administración de GnRH o agonistas sobre la actividad reproductiva suelen obtenerse tras tratamientos agudos, existen reportes de tratamientos crónicos en los que la administración diaria de GnRH (dos dosis al día de 50 µg de GnRH) a carneros durante 7 semanas aumentó la concentración de testosterona, el tamaño testicular y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en el eyaculado durante todo el tratamiento (Schanbacher y Lunstra,

1977). En el mismo sentido, el tratamiento con un agonista de GnRH (dos dosis diarias de 50 µg de acetato de buserelina) durante 6 semanas indujo un mayor despliegue del comportamiento sexual y mejoró la calidad del semen congelado fuera de la estación reproductiva en caballos (Sieme et al., 2004). Por último, parece que la respuesta en la secreción de testosterona y gonadotrofinas es dependiente de la dosis del análogo de GnRH. Por ejemplo, en perros, la administración puntual de dosis crecientes de un análogo de GnRH (0,01, 0,1, 10 y 100 µg de gonadorelina) indujo aumentos marcados en las concentraciones plasmáticas de LH y testosterona que fueron dependientes de la dosis (Knol et al., 1993).

Tabla 2. Usos de diferentes agonistas de GnRH en distintas especies para estimular la capacidad reproductiva de los machos.

Agonista de GnRH	Especie	Momento/estado fisiológico	Efecto positivo sobre la capacidad reproductiva	Referencia
Buserelina	Ovinos (<i>Ovis aries</i>)	Estación reproductiva	↑ LH y FSH	Fraser y Lincoln 1980
		Capacidad reproductiva	↑ Testosterona	Lincoln et al. 1986
		Capacidad reproductiva máxima (estimulación lumínica previa)	↑ LH y FSH	Lincoln et al. 1986
		Estación reproductiva	↑ Testosterona	Lincoln et al. 1986
	Equinos (<i>Equus ferus caballus</i>)	Estación no reproductiva	↑ Contenido de fluido testicular	Ungerfeld y Fila 2011
		Estación no reproductiva	Estimulación del comportamiento sexual Mejora de la calidad del semen congelado/descongelado	Sieme et al. 2004
Gonadorelina	Camélidos (<i>Camelus dromedarius</i>)	Fin de la estación reproductiva	↑ Testosterona	Monaco et al. 2015
		Fin de la estación reproductiva	↓ Disminución en el tiempo del procedimiento de colecta de semen ↑ Concentración espermática	Monaco et al. 2015

	Caninos (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Adulthood	↑ LH ↑ Testosterona	Knol et al. 1993
Fertilizer	Caprinos (<i>Capra hircus</i>)	Post-puberty (seasonal breed)	↑ Testosterona ↑ Testicular volume ↑ Testicular fluid volume	Samir et al. 2015

Con todo lo expuesto anteriormente y como se desarrollará en la próxima sección, la administración de GnRH o de agonistas de la misma puede estimular transitoriamente la actividad reproductiva de los machos, pero también es posible que si la administración de estos fármacos es sostenida en el tiempo, la secreción de gonadotrofinas y testosterona puede disminuir o incluso inhibirse totalmente (Fraser y Lincoln, 1980; Xue et al., 1994; Junaidi et al., 2007). Por lo tanto, parece que la efectividad de la administración de GnRH o sus agonistas para mejorar la actividad reproductiva está relacionada con el fármaco y el protocolo de administración seleccionado.

1.4. Inhibición de la capacidad reproductiva mediante la administración crónica de agonistas de GnRH o inmunización contra GnRH en machos

Existen diversas situaciones en las que es necesario controlar la actividad reproductiva de los animales. Por ejemplo, para limitar el tamaño de las poblaciones, tanto de especies silvestres como de animales de compañía, así como en diferentes sistemas productivos. En los sistemas productivos es frecuente castrar a los machos para evitar la reproducción no deseada, disminuir los problemas generados por la libido y el comportamiento agresivo, y también como un recurso para mejorar la calidad de la carne y las características de la canal. La castración quirúrgica es el método de castración más utilizado (Stafford y Mellor, 2005), aunque actualmente se están buscando alternativas que apuntan a ser menos invasivas y dolorosas, sencillas de realizar, y que sean mejor aceptadas por la sociedad. Además, en muchos países actualmente no se acepta la castración quirúrgica en forma rutinaria por exigencias de bienestar animal. En este sentido, la contracepción química surge

como una alternativa que cumple con todos los requisitos mencionados anteriormente.

Algunas de las estrategias farmacológicas más estudiadas para inhibir la función reproductiva son el uso crónico de agonistas de GnRH para desensibilizar sus receptores, y la inmunización contra GnRH, que impiden la unión de la GnRH a su receptor, ya que sus efectos suelen ser reversibles (ver revisión: Adams, 2005). A pesar de que los efectos anti fertilidad del uso crónico de agonistas de GnRH se estudiaron ampliamente en animales de compañía (ver revisión: Goericke-Pesch, 2016) y los de la inmunización contra GnRH en cerdos (Dunshea et al., 2011), la información sobre sus efectos en la reproducción de pequeños rumiantes y particularmente sobre la producción de semen es muy escasa.

1.4.1. Administración crónica de agonistas de GnRH

Aunque la administración de pequeñas dosis de GnRH o sus agonistas produce efectos estimulatorios sobre la capacidad reproductiva, la administración crónica de agonistas de GnRH tiene efectos anti fertilidad porque desensibiliza la hipófisis a la acción de la GnRH endógena, lo que determina que no se estimule la secreción de gonadotrofinas, y por tanto de andrógenos (Fraser y Lincoln, 1980; Lincoln et al., 1986). Esta desensibilización de la hipófisis a la acción de la GnRH probablemente esté mediada por cambios en su composición celular (Smith et al., 2012), al disminuir la expresión génica del receptor de GnRH (Lerrant et al., 1995), por la internalización de estos receptores (Smith et al., 2012) y/o mediante el desacople del receptor de GnRH de algunas de las vías de segundos mensajeros (McArdle et al., 2002). Una vez desensibilizados, los receptores de GnRH son internalizados por las células gonadotropas (Goodman et al., 1996) y degradados por los lisosomas o reciclados a la membrana plasmática (Hazum et al., 1985), por lo que no solo se desensibilizan, sino que disminuye la cantidad de receptores de GnRH (Nett et al., 1981). Además, la misma desensibilización de la hipófisis a la GnRH también induce una disminución en la capacidad de unión de la GnRH a sus receptores en las células gonadotropas (Srkalovic et al., 1990). Por otro lado, la disminución en la secreción de testosterona inducida por la administración crónica de agonistas de GnRH

produce un aumento inicial en la frecuencia de pulsos de LH (Fraser y Lincoln, 1980), que luego lleva también a una desensibilización de las células de Leydig a la LH, reforzando la disminución de la secreción de testosterona. Además de la desensibilización hipofisaria a la GnRH, la administración continua de GnRH o agonistas de GnRH disminuye tanto la cantidad de ARNm como el número de receptores de GnRH. Esto parece ocurrir como consecuencia de una rápida internalización y degradación de los receptores de GnRH (ver revisión: Rispoli y Nett, 2005).

Junto con la disminución de la concentración de testosterona, la administración crónica de agonistas de GnRH determina la involución de los testículos, las vesículas seminales y la próstata, y la disminución en la cantidad de receptores testiculares de LH en carneros (Auclair et al., 1977). Además, el tratamiento prolongado con agonistas de GnRH produce signos de degeneración a nivel de los túbulos seminíferos, con una ausencia casi total de células germinales a excepción de células de Sertoli en ratas (Pelletier et al., 1978) y azoospermia completa en gatos (Nuñez Favre et al., 2018). En carneros, el tratamiento continuo con agonistas de GnRH retarda el desarrollo del comportamiento sexual y de los testículos en animales pre púberes (Tilbrook et al., 1993), mientras que en adultos lleva a la disminución de la secreción de LH, FSH y testosterona (Fraser y Lincoln, 1980; Lincoln et al., 1986; Jimenez-Severiano et al., 2007) e induce un estado de refractariedad de los testículos a la administración de LH (Lincoln et al., 1986).

La administración crónica de agonistas de GnRH se puede lograr a través de implantes impregnados con distintos fármacos, que permiten una liberación lenta, homogénea, continua y prolongada del principio activo. Actualmente, en el mercado existen implantes subcutáneos de deslorelina, que son utilizados en el control de la actividad reproductiva de varias especies (roedores: Edwards et al., 2013; caninos: Junaidi et al., 2003; Trigg et al., 2006; felinos: Nuñez Favre et al., 2018; bovinos: Bergfeld et al., 1996). Una vez colocado el implante de deslorelina se produce un efecto bifásico: en primer lugar, se observa una acción estimulante sobre la hipófisis que induce una marcada liberación de LH y FSH que da como resultado un aumento en la concentración de testosterona en los machos (Padula, 2005). Este efecto estimulante es denominado efecto "*flare up*" y se continúa posteriormente con la

disminución de la sensibilidad de los receptores hipofisarios a la GnRH (Aspden et al., 1996), y la disminución de las concentraciones de LH, FSH y testosterona (Adams, 2005; Padula, 2005). Por lo tanto, los efectos del uso crónico de agonistas de GnRH son primero estimulatorios (efectos agudos), y luego una desensibilización hipofisaria (efectos crónicos), conduciendo a un patrón bifásico en la síntesis de gonadotrofinas y testosterona en los machos adultos (Adams, 2005). Es interesante que esta supresión de la actividad reproductiva que produce el uso prolongado de un agonista de GnRH es reversible luego del cese de su administración (Trigg et al., 2001; Edwards et al., 2013; Nuñez Favre et al., 2018), por lo que puede utilizarse como una forma de anticoncepción transitoria.

1.4.2. Inmunización activa contra GnRH

La inmunización activa contra GnRH implica estimular una respuesta inmune con altos títulos de anticuerpos contra GnRH. La unión de los anticuerpos neutraliza a la GnRH, ya sea evitando que difunda a través de las paredes de los capilares debido al tamaño del complejo hormona-anticuerpo o enmascarando el sitio de unión del receptor en la molécula de GnRH (D'Occhio, 1993). La inmunización contra GnRH disminuye la síntesis y secreción de GnRH hipotalámica (Han et al., 2017), y reduce drásticamente la concentración de receptores de GnRH en la hipófisis (Sakurai et al., 1997). Como resultado, se interrumpe el funcionamiento normal del eje HHG, determinando la disminución de la secreción de LH, FSH. En consecuencia, se observa atrofia testicular, disminución en la concentración de testosterona y detención de la espermatogénesis (conejos: Arimura et al., 1973; perros: Ajadi y Oyeyemi, 2015; ciervos: Lincoln et al., 1982), disminución del volumen del eyaculado junto con un aumento de anomalías morfológicas de los espermatozoides y disminución de la motilidad espermática (perros: Ajadi y Oyeyemi, 2015; gatos: Nuñez Favre et al., 2018). En terneros inmunizados también disminuye el tamaño testicular y la producción de testosterona (Jeffcoate et al., 1982), la libido y la producción espermática (Robertson et al., 1982). Específicamente en pequeños rumiantes, la inmunización contra GnRH disminuye la concentración de testosterona y suprime el desarrollo testicular y de las glándulas accesorias en chivos (Ülker et al., 2009), mientras que en carneros disminuye del

diámetro de los túbulos seminíferos, y se observan eyaculados sin espermatozoides maduros (Ülker et al. 2005), así como disminución de la frecuencia de montas y eyaculaciones (Kiyima et al., 2000). Además, en chivos, la inmunización contra GnRH impide el aumento estacional de la secreción de LH, FSH y testosterona y disminuye el tamaño testicular, el olor característico de los machos y la producción espermática (Godfrey et al., 1996), induciendo incluso azoospermia (Pereira Lents et al., 2018).

Debido al bajo peso molecular de la GnRH, el sistema inmune es bastante ineficiente para reconocerla como inmunógena. Por ello, las vacunas anti-GnRH suelen utilizar como coadyuvante proteínas portadoras que aumentan la inmunogenicidad de la GnRH. Hasta el momento, la seroalbúmina es la que genera una mayor inmunogenicidad, por lo que es el antígeno más utilizado en animales (ver revisión: Purswell y Kolster, 2006). Existen diferentes vacunas anti GnRH que han sido utilizadas en toros (Huxsoll et al., 1998; Janett et al., 2012), carneros (Brown et al., 1994; Kiyima et al., 2000) y chivos (Godfrey et al., 1996) con resultados muy variables, probablemente porque la respuesta reproductiva puede diferir entre especies (Aponte et al., 2017). Hasta el momento, Improvac® (Zoetis, Bélgica) parece ser la vacuna anti-GnRH más efectiva. Originalmente se desarrolló con fines productivos para su uso en cerdos ya que disminuye el olor característico de la carne de animales enteros (Hennessy, 2008). Además, suprime el desarrollo testicular y disminuye la secreción de testosterona por al menos 22 semanas (Einarsson et al., 2011), por lo que los machos permanecen como si fuesen enteros durante más tiempo en su vida productiva y tienen mayor crecimiento corporal, a la vez que mejoran las características de la canal (Einarsson, 2006). Además, la disminución de la concentración de testosterona inducida por la inmunización contra GnRH afecta negativamente el número y tamaño de las células de Leydig, llevando a una menor concentración de testosterona en el fluido testicular y afectando la maduración espermática (Einarsson et al., 2009; 2011). En carneros, el uso de Improvac también inhibe el crecimiento corporal y el desarrollo testicular (Needham et al., 2016), y en chivos los resultados fueron similares a los obtenidos en carneros y se mantuvieron por al menos 2 meses (Bishop et al., 2016). Como las vacunas anti GnRH se utilizan fundamentalmente en contextos productivos, en la mayoría de los trabajos citados no se evaluó la duración de sus efectos, sino que los experimentos culminaron con

el sacrificio de los animales. Por lo tanto, si bien las vacunas anti-GnRH proporcionan alternativas viables y valiosas a los métodos actualmente disponibles de anticoncepción, no es clara ni la duración de sus efectos, ni que éstos sean reversibles.

En síntesis, la manipulación de la secreción de GnRH o de la expresión de sus receptores, a través de la administración de GnRH o agonistas, así como la neutralización de sus efectos a través de la inmunización contra GnRH modifican la capacidad reproductiva de los animales, ya sea potenciándola o inhibiéndola.

2. FUNDAMENTACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS

El control de la reproducción animal tiene varias aristas: por un lado, existen situaciones en las que se desea estimular la capacidad reproductiva, como ocurre frecuentemente en animales de interés productivo. Por otro lado, disminuir la capacidad reproductiva, o incluso inhibirla totalmente puede ser de interés en otros contextos en los que no se desea su reproducción y en los que se desea disminuir el tamaño de las poblaciones. La GnRH es una hormona clave en el control de la reproducción por lo que a través de la manipulación de su secreción y acción es posible estimular o inhibir la función reproductiva. Al mismo tiempo, utilizando distintas estrategias de manipulación de la GnRH o de sus acciones es posible entender algunos de los mecanismos fisiológicos subyacentes al proceso de reproducción.

A nivel mundial existe una demanda creciente de productos animales, por lo que muchos esfuerzos de investigación se centran en mejorar la capacidad reproductiva de distintas especies. En este sentido, los pequeños rumiantes son uno de los grupos animales más explotados. En general los objetivos de los distintos manejos productivos se relacionan con el desarrollo de estrategias que permitan obtener mayor cantidad de crías y de subproductos (por ejemplo: carne, leche y lana), así como extender los períodos del año en los que es posible ofrecerlos al mercado.

En otro sentido, el desarrollo de técnicas para limitar o inhibir la reproducción animal es fundamental para el control de las poblaciones. En nuestro país, los problemas de conservación son de distinta índole y los casos de dos especies de rumiantes que actualmente se encuentran en condiciones de sobrepoblación son de especial interés. Una de ellas es el ciervo axis (*Axis axis*), especie introducida y que se encuentra ampliamente distribuida en el país. La otra especie de interés son los chivos Gabón (*Capra hircus*), que se encuentran en gran número en varios zoológicos y reservas de fauna del país. Estos problemas de conservación afectan la estructura de las comunidades y tienen impacto negativo sobre la biodiversidad. En estos casos la contracepción química resulta una estrategia útil para el control del tamaño de las poblaciones, ya que sería altamente trabajoso aplicar manejos que eviten o disminuyan la cantidad de montas indeseadas, o evitar que las hembras

queden preñadas. Por otro lado, la castración de los machos es una práctica de manejo muy extendida en muchos sistemas productivos. En estos casos, la contracepción química es una alternativa mejor en relación al bienestar animal y a la posible reversibilidad del tratamiento.

En esta Tesis se plantearon tres experimentos en los que se manipuló farmacológicamente a la GnRH para estimular o inhibir la actividad reproductiva, utilizando agonistas de GnRH y una vacuna anti-GnRH. Todos los experimentos se realizaron en chivos porque son un modelo experimental accesible, de fácil manejo, y en el que existe bastante información científica sobre su fisiología reproductiva. En particular los chivos Gabón son una raza en la que se cuenta con información científica local sobre su patrón estacional, son animales bastante dóciles y de tamaño corporal pequeño. Además, como ya se mencionó, los chivos Gabón se encuentran en sobrepoblación en los zoológicos de nuestro país, por lo que la información generada en esta Tesis puede ser utilizada por los zoológicos y centros de fauna para contribuir al control de las poblaciones. Por último, puede ser considerado como un modelo tanto de un animal productivo, como de uno silvestre.

3. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis general

Los tratamientos farmacológicos con agonistas de GnRH y la inmunización contra GnRH se pueden utilizar para estimular o inhibir la actividad reproductiva de chivos adultos.

3.2. Hipótesis específicas

- La administración por un período corto de pequeñas dosis de un agonista de GnRH aumenta la concentración de testosterona y la circunferencia escrotal y mejora la calidad espermática de chivos fuera de la estación reproductiva.
- La colocación de implantes de deslorelina durante el periodo de *flare up* potencia la capacidad de chivos de estimular la actividad reproductiva de cabras en anestro.
- El uso crónico de un agonista de GnRH inhibe transitoriamente la función reproductiva de chivos con efectos más tardíos y duraderos que los inducidos por la inmunización contra GnRH.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo general*

Determinar los efectos de la administración de agonistas de GnRH a corto y largo plazo, y de la inmunización contra GnRH sobre la actividad reproductiva de chivos.

4.2. *Objetivos específicos*

- Determinar si la administración de bajas dosis de un agonista de GnRH por un período corto fuera de la estación reproductiva aumenta la concentración de testosterona y la circunferencia escrotal, y si mejora la calidad seminal de chivos.
- Determinar si la administración de un agonista de GnRH por un período acotado fuera de la estación reproductiva potencia la capacidad de chivos de estimular la actividad reproductiva de hembras en anestro.
- Determinar si el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunización contra GnRH en chivos produce disminución de:
 - la concentración de testosterona
 - la circunferencia escrotal
 - la calidad seminal
 - la proporción de fluido testicular
 - la intensidad del olor característico de los machos
- Determinar si el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunización contra GnRH en chivos afecta la secreción de testosterona en respuesta a la administración de un agonista de GnRH.
- Comparar la eficacia y determinar la duración de los efectos del uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunoneutralización de la GnRH para inhibir la actividad reproductiva de chivos.

- Determinar si el tratamiento de larga duración con un agonista de GnRH y la inmunización contra GnRH en chivos afecta la crioresistencia del semen y la morfometría de la cabeza de los espermatozoides.

5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

En esta Tesis se realizaron tres experimentos en los que se estudió el rol de la GnRH sobre la reproducción de los chivos a través de manipulaciones farmacológicas de la misma. En primer lugar, se realizaron dos experimentos para abordar el estudio de los efectos de la administración a corto plazo de agonistas de GnRH. En el primero de ellos se estudió el efecto de la administración de buserelina por un período corto sobre la concentración de testosterona y la calidad espermática (Experimento I), y en el otro se estudiaron los efectos de un pre-tratamiento de corta duración con implantes de deslorelina sobre la concentración de testosterona y la capacidad de los machos de estimular la actividad reproductiva de hembras en anestro (Experimento II). En segundo lugar, se realizó un experimento para estudiar si el tratamiento de larga duración con deslorelina y la inmunización contra GnRH inhiben la actividad reproductiva de chivos, y se comparó la eficacia entre los tratamientos tanto en intensidad de los efectos como en duración (Experimento III).

Los dos primeros experimentos apuntaron a mejorar la actividad reproductiva de chivos, y se realizaron en Turquía, en colaboración con un grupo de investigación en ciencia animal de la Universidad Aydın Adnan Menderes. En el tercer experimento se abordaron dos estrategias diferentes para inhibir la actividad reproductiva de chivos. Todos los procedimientos experimentales del Experimento III se realizaron enteramente en la unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria y se utilizaron chivos Gabón.

6. EXPERIMENTOS

6.1. Experimento I

Administración diaria de un agonista de GnRH aumenta la concentración de testosterona y mejora la calidad espermática de chivos durante la estación no reproductiva

Anexo I: artículo I. Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. Julia Giriboni, Özdal Gökdağ, Vadullah Eren, Engin Yaralı, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. Animal Reproduction Science 200 (2019) 43-50.

Objetivo general

Determinar si la administración diaria de un agonista de GnRH, durante 10 días, aumenta la concentración de testosterona y la circunferencia escrotal y si mejora la calidad espermática de chivos adultos fuera de la estación reproductiva.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en la estación experimental de la Çine Vocational School de la Universidad Adnan Menderes en Aydın, Turquía, durante la estación no reproductiva (junio, final de la primavera). Se utilizaron 10 chivos adultos separados en dos grupos homogéneos en raza, edad y peso corporal. A 5 animales se les administró de forma diaria una dosis de un agonista de GnRH (4,2 µg/animal de acetato de buserelina vía i.v (Buserin, Alke, Estambul, Turquía) durante 10 días (grupo BUS), comenzando el Día 0. Los 5 chivos restantes fueron utilizados como control, por lo que no recibieron ningún tratamiento (grupo CON1). En los Días -7 y -4 y desde el Día 0 hasta el Día 10 se colectaron muestras sanguíneas dos veces al día (en la mañana y en la tarde, con 12 h de diferencia) para determinar la concentración de testosterona. Adicionalmente, en los Días 0 y 10, se colectaron

muestras sanguíneas para la determinación de testosterona cada 30 min durante 7 h comenzando inmediatamente antes de la administración de buserelina. En los Días -7, -4, 1, 4 y 7 se determinó la CE y se colectaron muestras de semen para realizar el espermograma básico de todos los animales.

Resultados

A continuación, se presentan los resultados más relevantes de este experimento.

La concentración de testosterona fue mayor el Día 0 que el Día 10 en los chivos tratados con buserelina, mientras que en el grupo control no hubo diferencias. Además, la concentración de testosterona fue mayor en los chivos tratados con buserelina que en los controles en el Día 0, pero en el Día 10 no fue diferente entre los grupos.

El porcentaje de espermatozoides con morfología normal tendió a ser mayor en los chivos tratados con buserelina que en los controles. Además, el tratamiento con buserelina disminuyó el porcentaje de espermatozoides con defecto de la pieza media y con la cola doblada. Por otro lado, en el Día 4 tanto la motilidad espermática de masa como el porcentaje de espermatozoides con motilidad fueron mayores en los chivos tratados con buserelina que en los controles.

6.2. Experimento II

Tratamiento de corta duración con implantes de un agonista de GnRH para mejorar la efectividad de chivos en el efecto macho

Anexo II: artículo II. Short-term treatment with deslorelin implants to improve the bucks' ability to stimulate cyclic activity during the late non-breeding season. Julia Giriboni, Özdal Gokdal, Okan Atay, Ali Kemali Özüğür, Güneş Erdoğan, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. Aceptado para su publicación en Small Ruminant Research.

Objetivo general

Determinar si pre-tratar a chivos con implantes de deslorelina durante un período corto potencia la capacidad de los machos para estimular la actividad reproductiva de cabras en anestro.

Objetivos específicos

- Comparar la concentración de testosterona de chivos tratados con un pre-tratamiento de corta duración con implantes de deslorelina y de chivos no tratados.
- Comparar la respuesta reproductiva de cabras en anestro a la exposición de chivos tratados con un pre-tratamiento de corta duración con implantes de deslorelina o chivos no tratados en:
 - porcentaje de hembras en estro
 - porcentaje de hembras que presentan ciclo estral corto
 - cantidad de cuerpos lúteos por hembra
 - porcentaje de hembras preñadas
 - tamaño de camada

Materiales y métodos

Se utilizaron 10 grupos de animales compuestos por un macho y 8 hembras cada uno. Cinco de los machos fueron tratados con un implante subcutáneo conteniendo 4,7 mg de deslorelina (grupo DES) y los 5 restantes no fueron tratados y se utilizaron como control (CON2). Los implantes de deslorelina se colocaron en el Día -6 y en el Día 0 los machos fueron introducidos por primera vez a los grupos de hembras. Los machos permanecieron en contacto con las cabras 1 h al día dos veces por día durante 10 días (Día 0 a 9). Del Día 0 al 9 se realizó la detección de celos mientras los machos estaban en contacto con las hembras. En los Días 22 y 27, se realizaron ecografías ováricas a las hembras y a los 49 días de la introducción de los machos, se realizaron ecografías para el diagnóstico de preñez. En cada grupo se determinó el porcentaje de hembras en celo y el porcentaje de hembras que presentaron ciclos cortos, la cantidad de cuerpos lúteos por animal, la tasa ovulatoria, la tasa de preñez y el tamaño de la camada. En los machos, se tomaron muestras de sangre dos veces al día para determinar la concentración de testosterona en los Días -11 a -9, desde el Día -6 al -1 e inmediatamente después de cada de detección de celos (desde el Día 0 al 9).

Resultados

Considerando el experimento en su globalidad, la concentración de testosterona no fue diferente entre los grupos, pero 12 h antes del primer contacto entre sexos, los chivos del grupo DES tuvieron mayor concentración de testosterona que los controles ($P = 0,04$). Luego de este momento, la concentración de testosterona no fue diferente entre los chivos DES y CON2. No se encontraron diferencias en la respuesta de las hembras al efecto macho en ninguna de las variables estudiadas. En total, a lo largo de todo el experimento, el 66,3% de las hembras presentaron estro.

6.3. Experimento III

Uso crónico de un agonista de GnRH o inmunización contra GnRH como métodos reversibles de contracepción

Anexo III: artículo III. Chronic use of a GnRH-agonist (deslorelin) or immunization against GnRH: effects on testicular function and sperm quality of bucks. Julia Giriboni, Lorena Lacuesta, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. Domestic Animal Endocrinology 71 (2020) 106395.

Objetivo general

Comparar la intensidad y duración de los efectos del uso crónico de un agonista de GnRH y de la inmunización contra GnRH sobre la función testicular y la producción espermática de chivos.

Objetivos específicos

- Determinar si el uso prolongado de un agonista de GnRH y la inmunización contra GnRH en chivos disminuye:
 - la circunferencia escrotal (CE)
 - la calidad espermática
 - la concentración sérica de testosterona
 - la proporción de fluido testicular
 - la intensidad del olor característico de los machos
- Determinar si el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunización contra GnRH en chivos afecta secreción de testosterona en respuesta a la administración de un agonista de GnRH.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en la Facultad de Veterinaria durante 18 meses utilizando 23 chivos adultos agrupados por edad y peso corporal (5–6 años, $34,8 \pm 5.7$ kg al inicio del estudio). Siete chivos recibieron un único implante subcutáneo de deslorelina (Suprelorin; Virbac, Barcelona, España), un agonista de GnRH que se libera en forma continua (grupo AGO), y otros 7 chivos recibieron una vacuna contra GnRH (Improvac; Zoetis, Bruselas, Bélgica) (grupo INM). La primera dosis de la vacuna se administró el mismo día en que se colocaron los implantes y la segunda dosis (*booster*) se administró 4 semanas después. Los restantes 9 chivos fueron utilizados como control y no se les realizó ningún tratamiento (grupo CON3). Los tratamientos se aplicaron en noviembre, en la Semana 0 (cerca del inicio de la estación reproductiva). Desde la Semana -4 a la 3, se realizaron evaluaciones de forma semanal de las características testiculares (CE y ecografía testicular para determinar diferencias en proporción de fluido testicular) y espermáticas (motilidad espermática de masa, porcentajes de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, con morfología normal y con membrana íntegra funcional y cantidad total de espermatozoides en el eyaculado), se determinó el olor característico de los machos y se tomaron muestras sanguíneas para la determinación de las concentraciones plasmáticas de testosterona. A partir de enero (Mes 2) y hasta abril del año siguiente (Mes 17) se realizaron los mismos registros de forma mensual. En los Meses 5 y 17 (abril del primer y segundo año, respectivamente) se realizó un desafío con un agonista de GnRH y se determinó la respuesta en la secreción de testosterona.

Resultados

A continuación, se presentan los resultados más relevantes del Experimento I. Durante el primer mes del experimento, la CE no fue diferente entre tratamientos. Sin embargo, la intensidad del color de los píxeles (ICP) fue mayor en el grupo CON3 que en el INM ($P= 0,0001$), y en este último que en el AGO ($P= 0,04$). Esto indica que los chivos tratados tuvieron una mayor proporción de fluido testicular que los no tratados, y que además fue mayor en los AGO que en los INM. Cuando se analizó el experimento en su globalidad, la CE de los chivos AGO no cambió en el tiempo y fue

menor que la de los animales CON3 ($P= 0,0002$) e INM ($P< 0,0001$). En cambio, la CE de los chivos CON3 e INM comenzó a aumentar ($P< 0,0001$) en el Meses 7 (junio) y 10 (setiembre) y al final del experimento, en los Meses 15 (febrero) y 16 (marzo) la CE de los INM fue mayor que la de los CON3. En relación a la ICP, cuando se analizó el experimento en su globalidad no se encontraron diferencias entre grupos. Sin embargo, la ICP comenzó a disminuir ($P< 0,0001$) desde el Mes 10 (setiembre) en todos los grupos y al final del experimento, en el Mes 17 (abril) fue menor en los chivos INM que en los CON3 y en los AGO, indicando que la proporción de fluido testicular fue mayor.

Durante el primer mes del experimento, la intensidad del olor característico de los machos no fue diferente entre grupos. Cuando el experimento fue analizado en su globalidad la intensidad del olor característico de los machos fue mayor en los chivos CON3 que en los INM ($P= 0,004$), que a su vez fue mayor que en los AGO ($P= 0,02$). Además, se observó una interacción entre grupo y tiempo ($P< 0,0001$): la intensidad del olor característico de los machos fue mayor en los chivos AGO que en los CON3 e INM en el Mes 2 (enero), mayor en los chivos CON3 que en los AGO e INM en los Meses 3 (febrero), 4 (marzo) y 6 (mayo) y mayor en los chivos INM que en los CON3 en los Meses 16 (marzo) y 17 (abril).

La concentración de testosterona fue mayor en los chivos AGO que en los CON3 e INM en los Meses 1 (diciembre) y 2 (enero) del experimento ($P< 0,05$ para todas las comparaciones). Cuando el experimento fue analizado en su globalidad no se encontraron diferencias en la concentración de testosterona entre grupos, pero sí una interacción entre tratamiento y tiempo ($P< 0,001$). En los Meses 3 (febrero) y 4 (marzo) la concentración de testosterona fue mayor en los chivos no tratados que en los tratados. Hacia el final del experimento, en los Meses 15 (febrero) y 16 (marzo) la concentración de testosterona fue mayor en los chivos CON3 e INM que en los AGO, y en el Mes 17 (abril), fue mayor en los INM que en los CON3 y AGO.

La respuesta en la concentración de testosterona a la administración de un agonista de GnRH fue diferente en cada desafío. En el primer desafío (Mes 5, abril) la concentración de testosterona en respuesta a la administración de un agonista de

GnRH aumentó en los chivos CON3 e INM desde los 30 hasta los 150 y 180 min respectivamente, mientras que en los AGO no se modificó a lo largo del tiempo. En el segundo desafío (Mes 17, abril) la concentración de testosterona en respuesta a la administración de un agonista de GnRH fue mayor en los chivos INM que en los CON3 y AGO y en todos los grupos aumentó desde los 30 hasta los 300 min ($P < 0,05$ para todas las comparaciones).

Las muestras de semen se pudieron colectar de todos los chivos CON3 en todos los muestreos, excepto en el Mes 9 (agosto, estación no reproductiva), cuando se colectó en 8 de 9 animales. De los chivos AGO sólo fue posible colectar semen de todos los animales en 6 de 17 meses y de los INM en 10 de 17 meses. En algunos chivos AGO e INM no fue posible colectar semen en varios muestreos consecutivos: en un animal AGO desde el Mes 9 (agosto) al 12 (noviembre) y en otro desde el Mes 9 (agosto) al 13 (diciembre). En un chivo INM no fue posible colectar semen desde el Mes 7 (junio) al 10 (setiembre).

En el primer mes del experimento (diciembre) los tratamientos afectaron negativamente la cantidad total de espermatozoides en el eyaculado, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y con membrana íntegra funcional ($P < 0,05$ para todas las comparaciones). En la globalidad del experimento, los tratamientos afectaron negativamente todas las variables espermáticas consideradas ($P < 0,05$ para todas las comparaciones).

6.3.1. Anexo IV. Datos no publicados del Experimento III

Morfometría de la cabeza de los espermatozoides y crioresistencia espermática de chivos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH o inmunizados contra GnRH

Objetivo general

Determinar si el uso crónico de un agonista de GnRH y la inmunización contra GnRH en chivos adultos afecta la morfometría de la cabeza de los espermatozoides y la crioresistencia del semen.

Metodología general

Se utilizaron los mismos animales y metodología general que en el Experimento III.

En 7 momentos de colección (un mes antes del inicio de los tratamientos y en los Meses 1, 2, 6, 9, 12 y 16) se evaluaron las características del semen fresco (etapa 1), se congelaron y descongelaron las muestras de semen y se evaluaron inmediatamente (T0, etapa 2) y 30 min después (T30, etapa 3) de la descongelación. Para congelar el semen se siguió un protocolo de congelación de rutina utilizado en nuestro laboratorio (Beracochea et al., 2018). Se utilizó un diluyente comercial (Andromed, Minitube, Tienfenbach, Alemania), acondicionando el semen en pajuelas de 0,5 mL con un total de 100 millones de espermatozoides en cada una. Las muestras de semen diluidas se colocaron en un recipiente con agua a 20 °C y se llevaron a heladera hasta alcanzar los 5 °C. Luego, las muestras de semen acondicionadas en las pajuelas se colocaron en vapor de nitrógeno (5 cm por encima de la superficie de nitrógeno en una caja de almacenamiento criogénico, aproximadamente -120 °C) durante 10 min antes de sumergirlas en el nitrógeno líquido (-196 °C), donde se mantuvieron almacenadas hasta su descongelación. Para la descongelación de las muestras de semen, las pajuelas se retiraron del nitrógeno líquido y se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 s. Luego se sumergieron en solución fisiológica en baño maría a 37 °C durante 40 s. Por último, se retiró la muestra de semen contenida en las pajuelas para su evaluación inmediatamente

luego de la descongelación (T0) y a los 30 min (T30). En el semen fresco se evaluó el porcentaje de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva en forma subjetiva y en las muestras de semen descongelado se evaluaron las mismas características utilizando el módulo de motilidad del ISAS (*Integrated Semen Analysis System*, Valencia, España). En todas las etapas se determinó la calidad de la motilidad en una escala subjetiva del 0 al 5 (0: sin movimiento de espermatozoides; 5: el movimiento de los espermatozoides es muy rápido) y se fijaron alícuotas de semen para determinar el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional mediante HOST (Jeyendran et al., 1984) (excepto en marzo, Mes 16) y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal. Se calculó La crioresistencia de la calidad de la motilidad, la morfología espermática normal y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides al momento de la descongelación (CR T0) y a los 30 minutos de la descongelación (CR T30) como: (valor semen descongelado/semen fresco) x100. No se congelaron muestras de semen fresco con calidad de la motilidad <3. Por lo tanto, los porcentajes de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva al T0 y T30 y todos los datos de crioresistencia corresponden únicamente a muestras colectadas con calidad aceptable para ser congeladas.

En otros 4 momentos de colección a lo largo del experimento (1 mes antes del inicio de los tratamientos y 3, 7 y 15 meses después) se estudió la morfometría de la cabeza de los espermatozoides. Para ello se realizaron extendidos con 5 µL de semen sin diluir, se secaron al aire y luego se sumergieron en alcohol metílico (metanol para análisis ACS, Dorwil Química Analítica, Buenos Aires, Argentina) cinco veces durante 1 s. Los frotis se tiñeron con Hemacolor y se montaron permanentemente para realizar el análisis morfométrico de los espermatozoides mediante ASMA (*Automated Sperm Morphology Analysis*) utilizando el módulo de morfometría del sistema computarizado CASA (*Computer-Aided Sperm Analysis system*, Sperm-Class Analyser, v. 5.3, Microptic, Barcelona, España) acoplado a un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse modelo 50i; contraste negativo, Labophot-2, Tokio, Japón). En este anexo sólo se presentan resultados del área de la cabeza de los espermatozoides, como una variable representativa de las demás variables morfométricas analizadas (largo, ancho y perímetro de la cabeza).

En los mismos momentos en que se evaluó la CR espermática y la morfometría de la cabeza de los espermatozoides se colectaron muestras sanguíneas para determinar las concentraciones plasmáticas de testosterona. Se utilizaron las mismas muestras sanguíneas que fueron colectadas y analizadas en el artículo III y se realizaron dos análisis independientes, con el objetivo de determinar si existe asociación entre la concentración de testosterona y la CR espermática y la morfometría de la cabeza de los espermatozoides.

Análisis estadístico

La CR T0 y CR T30 para cada variable se calculó para cada grupo en cada momento de colección y se compararon mediante ANOVA simple en el que se incluyó en el modelo el tratamiento como efecto principal y el animal como efecto aleatorio. Como los porcentajes de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva se evaluaron de manera subjetiva en el semen fresco y mediante ISAS en el descongelado, no se calculó la CR para las variables cinéticas y solamente se comparó los valores para cada etapa (T0 y T30) entre grupos para cada momento de colección mediante ANOVA simple. Las concentraciones de testosterona colectadas en los Meses -1, 1, 2, 6, 9, 12 y 16, y las colectadas en los Meses -1, 2, 7 y 15 se compararon entre grupos en dos análisis independientes. Para ello se realizó ANOVA para medidas repetidas, en el que se incluyó en el modelo el tratamiento como efecto principal y el animal como efecto aleatorio. Para los porcentajes de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva al T0 y T30, para el área de la cabeza de los espermatozoides y para las concentraciones plasmáticas de testosterona, los datos obtenidos antes de los tratamientos (Mes -1) se utilizaron como valor pre-tratamiento y se incluyeron en los modelos como co-variable.

Resultados preliminares

Semen congelado-descongelado y concentración de testosterona

En los Meses 9 (agosto) y 12 (noviembre) ninguna de las muestras de semen colectadas tuvo calidad de la motilidad igual o mayor a 3, por lo que no se congelaron.

Los resultados de los porcentajes de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva inmediatamente luego de la descongelación (T0) y 30 min después se presentan en la Tabla 3. Brevemente, el porcentaje de espermatozoides motiles al T0 y T30 no difirió entre grupos en ninguno de los momentos de colección. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva al T0 fue diferente entre grupos en el Mes 3 (enero) ($P= 0,03$) y tendió a ser diferente entre grupos en el Mes 6 (mayo) ($P= 0,1$) mientras que el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva al T30 fue diferente entre grupos en el Mes 3 (enero) ($P= 0,02$) y tendió a ser diferente entre grupos en el Mes 16 (marzo) ($P= 0,09$).

Tabla 3. Espermatozoides motiles y con motilidad progresiva (%) de muestras de semen inmediatamente luego de la descongelación (T0) y 30 min después (T30) de chivos no tratados (CON3), tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (AGO) o inmunizados contra GnRH (INM).

		Meses desde el inicio de los tratamientos			
		1	2	6	16
Espermatozoides motiles (%)					
T0	CON3	14,0 ± 4,2	9,0 ± 6,1	19,4 ± 4,6	13,5 ± 2,0
	AGO	16,4 ± 6,8	19,0 ± 7,8	12,3 ± 7,8	10,5 ± 3,4
	INM	15,4 ± 5,2	19,0 ± 4,8	22,2 ± 7,6	12,8 ± 2,6
T30	CON3	16,3 ± 3,5	4,0 ± 7,0	10,4 ± 4,3	9,3 ± 1,9
	AGO	11,0 ± 6,4	7,0 ± 8,9	3,2 ± 6,3	8,5 ± 4,0
	INM	20,8 ± 4,7	19,4 ± 5,5	12,1 ± 6,3	3,5 ± 2,8
Espermatozoides con motilidad progresiva al (%)					

T0	CON3	31,5 ± 14,5	0,0 ± 7,0 ^a	11,7 ± 4,0 ^{a†}	10,2 ± 11,4
	AGO	36,4 ± 17,9	33,1 ± 7,5 ^b	29,0 ± 6,3 ^{b†}	10,3 ± 14,6
	INM	30,0 ± 12,8	4,5 ± 4,4 ^a	14,6 ± 6,2 ^{a†}	15,6 ± 11,3
T30	CON3	12,3 ± 5,3	0,0 ± 1,2 ^a	1,1 ± 0,9	4,2 ± 1,0 ^{a†}
	AGO	0,0 ± 6,4	0,2 ± ,21 ^a	1,4 ± 1,2	0,0 ± 1,4 ^{b†}
	INM	0,0 ± 4,6	7,4 ± 1,2 ^b	1,0 ± 1,1	0,0 ± 1,0 ^{b†}

Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre grupos ($P \leq 0,5$). Las tendencias estadísticas se indican con † luego de las letras ($0,1 \leq P < 0,5$).

Las diferencias entre grupos en las diferentes variables de CR para cada momento de colección se muestran en la Tabla 4. En el Mes 2 (enero) la CR T0 de la calidad de la motilidad fue mayor en el grupo AGO que en el grupo INM ($P = 0,006$) y tendió a ser mayor que en el grupo CON3 ($P = 0,06$), aunque no fue diferente entre los dos últimos (Figura 2A). Además, también en el Mes 2, tanto la CR T0 como CR T30 del porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra fue mayor en el grupo INM que en el CON3 ($P = 0,001$ y $P = 0,0002$, respectivamente) (Figura 2B). Además, la CR T30 del porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra fue mayor en el grupo INM que en el AGO ($P = 0,008$), que a su vez fue mayor que en el CON3 ($P = 0,04$) (Figura 2C). Por último, en el Mes 6 (mayo) la CR T30 del porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra fue mayor en el grupo INM que en el AGO ($P = 0,05$) y el CON3 ($0,02$), sin diferencias entre los últimos grupos (Figura 4).

Tabla 4. Diferencias entre grupos en la crioresistencia de la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y membrana íntegra de muestras de semen inmediatamente después de la descongelación (T0) y 30 min después (T30) en distintos momentos de colección de chivos no tratados, tratados con el uso sostenido de un agonista de GnRH o inmunizados contra GnRH.

Meses desde el inicio de los tratamientos					
Crioresistencia	-1	1	2	6	16
Calidad de la motilidad					
T0	P= 0,02	ns	P= 0,02	ns	ns

T30	ns	ns	ns	ns	ns
Espermatozoides con morfología normal					
T0	ns	ns	ns	ns	ns
T30	ns	ns	ns	ns	ns
Espermatozoides con membrana íntegra					
T0	ns	ns	P= 0,003	ns	ns
T30	ns	ns	P= 0,007	P= 0,005	ns

ns: no significativo

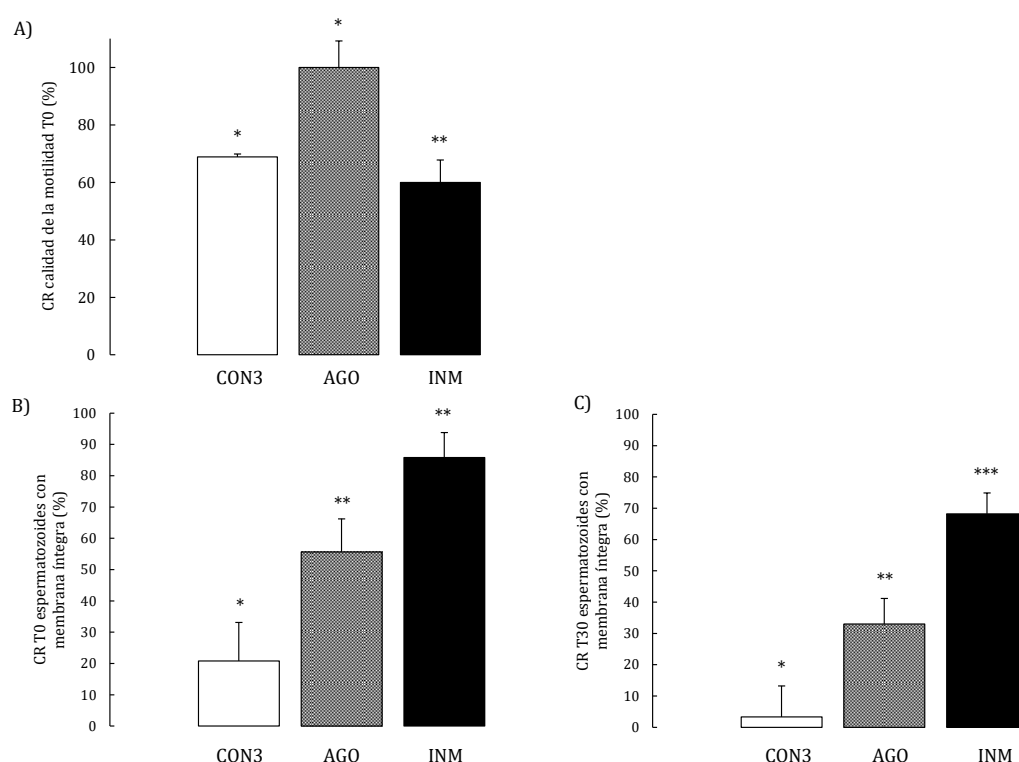


Figura 2. Crio-resistencia (%) de la calidad de la motilidad (A) y del porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra (B) de muestras de semen inmediatamente luego de la descongelación (T0) y del porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra 30 min después de la descongelación (T30) de chivos no tratados (CON3), tratados con el uso sostenido de un agonista de GnRH (AGO) e inmunizados contra GnRH (INM) dos meses después de iniciados los tratamientos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos.

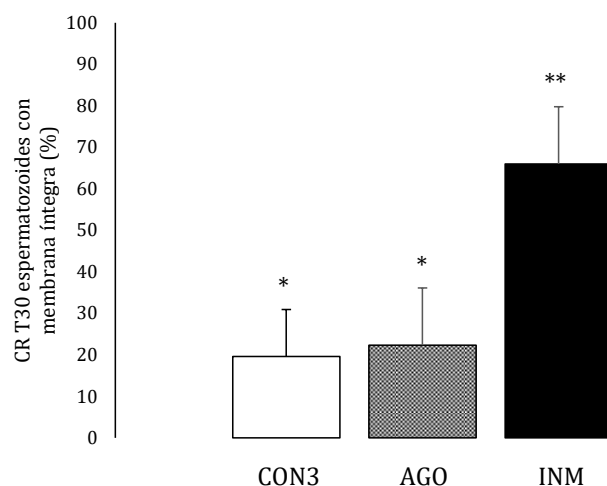


Figura 3. Crioresistencia (%) del porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra de muestras de semen inmediatamente 30 min después de la descongelación (T30) de chivos no tratados (CON3), tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (AGO) e inmunizados contra GnRH (INM) seis meses después de iniciados los tratamientos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos.

La concentración plasmática de testosterona en los momentos en que se evaluó la CR espermática fue mayor en el grupo AGO ($P = 12,1 \pm 1,2$ nmol/L) que en el CON3 ($P = 8,0 \pm 0,9$ nmol/L, $P = 0,02$) y que en el INM ($7,5 \pm 1,1$ nmol/L, $P = 0,02$). Además, en los Meses 1 y 2 del tratamiento, la concentración plasmática de testosterona fue mayor en el grupo AGO que en el CON3 ($P = 0,005$ y $P < 0,0001$, respectivamente) e INM ($P = 0,0006$ y $P < 0,0001$, respectivamente) (Figura 4). Por último, en el Mes 16 del tratamiento, la concentración plasmática de testosterona fue menor en el grupo AGO que en el CON3 ($P = 0,0009$) y en el INM ($P = 0,0001$).

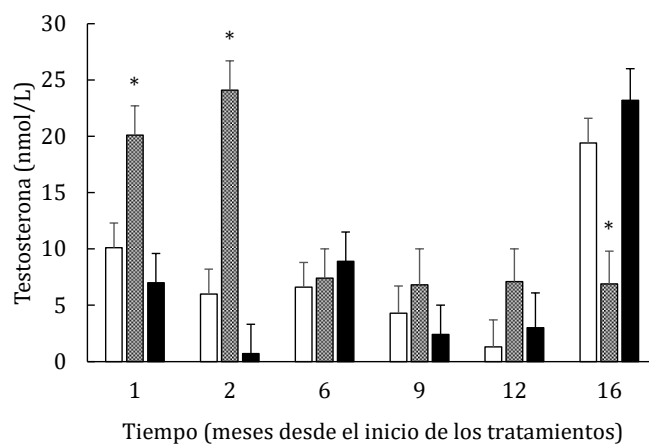


Figura 4. Concentración de testosterona de chivos no tratados (barras blancas), chivos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (barras punteadas) e inmunizados contra GnRH (barras

negras) en los momentos en que se evaluó la crioresistencia espermática. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos para cada tiempo.

Morfometría de la cabeza de los espermatozoides y concentración de testosterona

El área de la cabeza de los espermatozoides del grupo CON3 fue mayor que el de los AGO e INM ($30,3 \pm 0,2$ vs $29,6 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$ y $28,1 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$, respectivamente), y a su vez fue mayor en los AGO que los INM ($P < 0,0001$). Además, el área de la cabeza de los espermatozoides varió a lo largo del tiempo ($P < 0,0001$): el área más pequeña de la cabeza de los espermatozoides se observó en el Mes 7 del tratamiento (junio) y hubo interacción entre grupo y tiempo ($P = 0,02$) (Tabla 5).

Tabla 5. Área de la cabeza de los espermatozoides (μm^2) de chivos no tratados (CON3), tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (AGO) o inmunizados (INM) contra GnRH.

	Meses desde el inicio de los tratamientos		
	3	7	15
CON3	$31,4 \pm 0,5^a$	$29,0 \pm 0,6^{ab}$	$30,6 \pm 0,6$
AGO	$29,3 \pm 0,5^b$	$29,8 \pm 0,8^a$	$29,7 \pm 0,6$
INM	$26,8 \pm 0,5^c$	$27,7 \pm 0,6^b$	$29,8 \pm 0,5$

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias entre grupos.

La concentración plasmática de testosterona en los momentos en que se evaluó la morfometría de la cabeza de los espermatozoides tendió a ser diferente entre grupos (CON3: $20,0 \pm 3,0$ nmol/L; AGO: $10,2 \pm 3,2$ nmol/L; INM $12,1 \pm 3,2$ nmol/L, $P = 0,1$). Además, en el Mes 3 del tratamiento, la concentración plasmática de testosterona fue mayor en el grupo CON3 que en el AGO ($P = 0,005$) y el INM ($P = 0,001$), sin diferencias entre estos dos (Figura 2). Por último, en el Mes 15 del tratamiento, la concentración plasmática de testosterona fue menor en el grupo AGO que en el CON3 ($P = 0,08$) y el INM ($P = 0,04$), sin diferencias entre los últimos dos grupos (Figura 5).

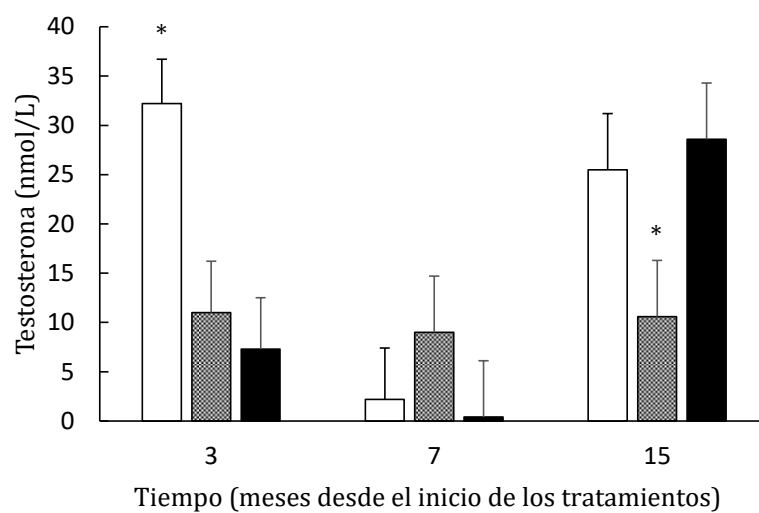


Figura 5. Concentración de testosterona de chivos no tratados (barras blancas), chivos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH (barras punteadas) e inmunizados contra GnRH (barras negras) en los momentos en que se evaluó la morfometría de la cabeza de los espermatozoides. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos para cada tiempo.

7. DISCUSIÓN GENERAL

En esta Tesis se abordó el estudio del rol de la GnRH en el control de la reproducción de chivos utilizando estrategias diferentes y complementarias, que además de contribuir al entendimiento de la fisiología reproductiva de la especie, aporta al desarrollo de nuevas estrategias para el control de la reproducción de esta y otras especies. Una forma de alterar la función reproductiva es a través de la manipulación de la GnRH, potenciando o inhibiendo su función (Padula, 2005). La mayoría de los estudios centrados en promover la capacidad reproductiva de los pequeños rumiantes se han realizado en las hembras (Adams, 2005), mientras que en los machos, la información es escasa y con resultados bastante dispersos. A partir de los experimentos I y II de esta Tesis se abren nuevas posibilidades de tratamientos para mejorar la actividad reproductiva de chivos utilizando agonistas de GnRH. Considerando que estos fármacos son fáciles de administrar, se encuentran disponibles en el mercado y su costo es bajo, la administración a corto plazo de agonistas de GnRH en chivos puede ser una alternativa atractiva para mejorar su actividad reproductiva. Además, permitiría extender los momentos del año en los que los machos pueden ser usados como reproductores o en los que es posible colectar semen de buena calidad y utilizarlo en diferentes tecnologías reproductivas como la inseminación artificial. Por el contrario, cuando el objetivo es limitar la reproducción, la forma más frecuente de lograrlo es a través de la esterilización quirúrgica (Stafford y Mellor, 2005). Sin embargo, ésta es difícil de llevar a cabo en condiciones de campo y es irreversible. En el experimento III se estudiaron dos posibles alternativas para producir contracepción química y reversible en chivos, mediante la administración crónica de un agonista de GnRH y la inmunización contra GnRH. Si bien ninguno de los tratamientos produjo infertilidad completa y por lo tanto no se podrían utilizar cuando es imprescindible inhibir completamente la reproducción, es importante contribuir al desarrollo de nuevas estrategias contraceptivas para generar alternativas prácticas y efectivas para el control de la reproducción.

A partir de los resultados obtenidos se demostró que la administración puntual de bajas dosis de agonistas de GnRH estimuló la secreción de testosterona en chivos adultos fuera de la estación reproductiva (Experimentos I y II) y mejoró la calidad

seminal (Experimento I). Sin embargo, cuando la administración de un agonista de GnRH se realizó en forma sostenida, la concentración de testosterona disminuyó significativamente y la calidad del semen se vio negativamente afectada, junto con otros cambios reproductivos importantes que reflejaron una inhibición marcada de la función reproductiva de los chivos (Experimento III). Además, la inmunización contra GnRH llevó a cambios similares a los observados con el uso crónico de un agonista de GnRH, aunque sus efectos fueron más inmediatos, algo menos intensos y de menor duración. De lo anterior es posible deducir que tanto el agonista utilizado y su potencia, así como la dosis y duración del tratamiento determinan si se estimula o inhibe la reproducción y por lo tanto si inducen efectos a favor o en contra de la fertilidad.

La administración a corto plazo de pequeñas dosis de un agonista de GnRH fuera de la estación reproductiva indujo un aumento inmediato en la concentración de testosterona durante el primer día del experimento que fue seguido en los días consecutivos y hasta el final por aumentos menos importantes. Esta disminución en la secreción de testosterona en respuesta al agonista de GnRH probablemente se deba a la retroalimentación negativa de la propia testosterona sobre el hipotálamo y la hipófisis, inhibiendo así la secreción de GnRH y por ende de LH (Tilbrook y Clarke, 2001). Además, es interesante considerar que aunque la administración del agonista de GnRH se realizó durante un período acotado (10 días), es posible que a nivel de la hipófisis haya ocurrido una regulación negativa de los receptores de GnRH, y que por lo tanto hubiese disminuido la sensibilidad de la misma a la GnRH (Junaidi et al., 2007). Además, se observó una mejora rápida y transitoria de la calidad espermática, específicamente en la motilidad y la morfología espermática. Debido a la inmediatez de los cambios, es probable que la administración de un agonista de GnRH haya producido modificaciones a nivel del epidídimo y del plasma seminal, influyendo positivamente sobre las características espermáticas antes mencionadas (Duan y Goldberg, 2003; Shore et al., 2003), y no sobre los túbulos seminíferos y la espermatogénesis, ya que de ser así, los cambios se hubiesen observado mucho después. Por otro lado, la colocación de implantes de liberación continua de deslorelina por un período corto (5 días) en chivos fue efectivo para inducir un aumento rápido en la concentración plasmática de testosterona que se mantuvo hasta 12 h antes del primer contacto de estos machos con cabras en

anestro. Sin embargo, al momento del primer contacto entre machos y hembras las diferencias en la concentración plasmática de testosterona entre ambos grupos de chivos desaparecieron, lo que se asoció con la eficiencia similar para estimular la actividad reproductiva de las cabras. Esta falta de diferencias en la respuesta reproductiva de cabras estimuladas por chivos tratados y no tratados probablemente se deba a que ambos grupos de chivos indujeron una secreción de LH similar en las hembras, llevando a que el porcentaje de hembras en celo, la tasa ovulatoria y el porcentaje de preñez, entre otras variables analizadas, no fueran diferentes. Por lo tanto, la administración a corto plazo de agonistas de GnRH a chivos fuera de la estación reproductiva puede ser una buena herramienta para estimular su actividad reproductiva. Teniendo en cuenta que los agonistas de GnRH son fácilmente accesibles y de bajo costo, la administración de éstos durante la estación no reproductiva puede ser una buena técnica para estimular la actividad reproductiva de los machos. Encontrar tratamientos que permitan modificar la fertilidad de los machos permite ampliar los momentos del año en los que es posible que sean utilizados como reproductores. Por ello, es importante continuar estudiando cómo se pueden generar estos efectos positivos, por ejemplo, estudiando otros agonistas, dosis y frecuencia de administración para lograr efectos más duraderos y evitar la desensibilización de la hipófisis a la GnRH.

La administración crónica de un agonista de GnRH luego de producir el denominado efecto *flare up* llevó a la inhibición del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. El efecto *flare up* consistió en un aumento marcado y sostenido de la concentración plasmática de testosterona y en un aumento de la intensidad del olor característico de los machos y de la proporción de fluido testicular que se mantuvo por dos meses, un período considerablemente más prolongado que el reportado en la mayoría de las especies (3 días en perros: Junaidi et al., 2009; 10 días en carneros: Lincoln et al., 1986). La inhibición posterior del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal implicó una disminución marcada de la concentración plasmática de testosterona que no se recuperó en el transcurso del experimento. Además, los chivos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH no respondieron a un desafío con otro agonista de GnRH. Esta falta de respuesta en la secreción de testosterona a la administración de GnRH pone de manifiesto la desensibilización de la hipófisis a la GnRH, que llevaría una disminución en la secreción de LH, explicando así la menor secreción de

testosterona (Junaidi et al., 2007). El uso crónico de un agonista de GnRH también generó efectos negativos sobre la producción y la calidad del semen. En esta Tesis, durante varios meses a lo largo del estudio fue imposible coleccionar muestras seminales de todos los animales y todas las características analizadas se afectaron negativamente. En coincidencia, en cerdos se observó que el tratamiento con deslorelina produjo alteraciones morfológicas y funcionales en el epidídimo, deteriorando el microambiente necesario para la maduración y almacenamiento de los espermatozoides, llevando a la falta de células dentro de la luz del órgano (Kopera et al., 2009). De manera general, el uso crónico de un agonista de GnRH afectó negativamente la reproducción de chivos y sus efectos se mantuvieron por al menos 17 meses.

La inmunización contra GnRH produjo efectos similares sobre la reproducción que el uso crónico de un agonista de GnRH, pero con algunas diferencias en el tiempo en que se evidenciaron y su duración. Al segundo mes del estudio, tanto la concentración plasmática de testosterona como varias de las características testiculares y seminales se afectaron negativamente y fueron recuperándose a lo largo del experimento. Sin embargo, al final del estudio los chivos inmunizados contra GnRH tuvieron mayor concentración plasmática de testosterona, mayor circunferencia escrotal y mayor proporción de fluido testicular que los animales no tratados. Esta pérdida de efectividad y el “efecto rebote” se observaron pese a que la vacuna anti GnRH se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante para otras especies (Hennessy, 2008). Como se mencionó anteriormente (ver sección 1.4.2) esta vacuna anti-GnRH fue desarrollada originalmente para su uso en cerdos (Hennessy, 2008), y si bien ha sido utilizada previamente en chivos (Bishop et al., 2016), de acuerdo a nuestro conocimiento no existe información sobre sus efectos en la producción y calidad del semen. Según estos resultados, es posible que el tratamiento deba repetirse con frecuencia para mantener la inhibición de la actividad reproductiva en los chivos. Por otra parte, este tratamiento abre posibilidades interesantes para prolongar su efectividad con la repetición, o recuperar la capacidad reproductiva de los animales en menor tiempo si esto fuera de interés. En este sentido, si bien puede ser más trabajoso, permitiría una mayor flexibilidad de ajustar los manejos reproductivos de acuerdo a las necesidades del momento en que se usen.

A diferencia de lo que ocurrió con los chivos tratados con el uso crónico de un agonista de GnRH los animales inmunizados contra GnRH sí respondieron a la administración de un agonista de GnRH secretando testosterona. En el primer desafío contra GnRH (cerca del inicio del experimento), los animales inmunizados contra GnRH aumentaron su secreción de testosterona en magnitudes similares a los animales no tratados. Sin embargo, en el segundo desafío contra un agonista de GnRH (al final del experimento), los animales inmunizados respondieron con una secreción de testosterona mayor a la de los chivos no tratados. Es posible que la inmunización contra GnRH haya mantenido a los receptores de GnRH inactivos durante un tiempo prolongado y se hayan producido cambios en su expresión o en la afinidad a la hormona, conduciendo así a una mayor sensibilidad al agonista de GnRH (efecto “rebote”) que podría explicar la mayor secreción de testosterona que los animales no inmunizados.

Las diferencias en la duración de los efectos entre ambos tratamientos pueden explicarse al menos parcialmente por sus diferentes mecanismos de acción. Los efectos supresores de uso crónico de un agonista de GnRH implican una pérdida progresiva de la respuesta hipofisaria a la GnRH y una desensibilización de las células de Leydig a la LH, que se mantiene mientras ocurre la liberación del fármaco (Junaidi et al., 2007). Por el contrario, la inmunización contra GnRH requiere la producción continua de anticuerpos contra GnRH y, por lo tanto, la función reproductiva mejora inmediatamente después de la disminución del título de anticuerpos (Brown et al., 1994; Claus et al., 2008).

Por otra parte, ambos tratamientos afectaron la crioresistencia espermática y la morfometría de la cabeza de los espermatozoides. La congelación-descongelación produce daños en los espermatozoides en distintos niveles, tanto estructurales (Bóveda et al., 2018) como bioquímicos y funcionales (ver revisión: Bailey et al., 2003), y en este trabajo no es posible determinar en qué momento del proceso se produjeron los cambios. Además, debido a los propios efectos inducidos por los tratamientos, la cantidad de muestras seminales que fueron congeladas fue baja, por lo que limita el alcance de la discusión de los resultados obtenidos. La testosterona es uno de los factores que influyen sobre la resistencia de los espermatozoides a la congelación-descongelación, ya que modifica la fluidez de la membrana plasmática

(Shivaji y Jagannadham, 1992) y los hace más susceptibles a ser dañados durante este proceso. En íbices (*Capra pyrenaica*) se encontró que las bajas concentraciones plasmáticas de testosterona al final de la estación reproductiva determinan espermatozoides con mayor crioresistencia que las altas concentraciones de testosterona al principio y en medio de la estación reproductiva (Coloma et al., 2010; 2011). En el mismo sentido, en chivos y en carneros, la disminución de la concentración plasmática de testosterona mejoró las variables cinéticas de los espermatozoides luego de la congelación-descongelación (Flores-Gil et al., 2020). Por otro lado, las variaciones estacionales en el tamaño de la cabeza de los espermatozoides también se relacionan con su resistencia a la congelación-descongelación (Esteso et al., 2006; Bravo et al., 2014), siendo los espermatozoides pequeños más resistentes al daño criogénico (Pradiee et al., 2016). Además, es posible que la testosterona influya en el tamaño de la cabeza de los espermatozoides. Por ejemplo, en chivos, la disminución de la concentración plasmática de testosterona aumenta el área de la cabeza de los espermatozoides luego de la congelación-descongelación (Flores-Gil et al., 2020). Por lo tanto, es posible que los cambios en la crioresistencia espermática y en la morfometría de la cabeza de los espermatozoides se deban a las variaciones en las concentraciones plasmáticas de testosterona inducidas por los tratamientos. Si bien con los resultados obtenidos en esta Tesis es posible establecer algunas asociaciones o coincidencias entre las concentraciones plasmáticas de testosterona y algunas variables de crioresistencia espermática y de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides, las mismas van en diferentes sentidos a lo largo del experimento. Además, es importante considerar que los valores de crioresistencia que se presentan corresponden solamente a muestras de semen que al momento de la colecta tuvieron calidad de la motilidad aceptable. El efecto más claro sobre la crioresistencia parece haber sido sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, que se vio menos afectada en los animales inmunizados contra GnRH en los primeros meses del experimento, coincidente con una menor área de la cabeza de los espermatozoides.

Es importante destacar que aunque tanto el uso crónico de un agonista de GnRH como la inmunización contra GnRH afectaron negativamente la reproducción de los chivos, ninguno de los dos tratamientos produjo infertilidad absoluta, por lo que su

uso como método de control de la reproducción depende de los objetivos con los que se apliquen. Por ejemplo, pueden ser útiles cuando lo que se desea es disminuir la tasa de reproducción, pero no cuando el objetivo es suprimirla totalmente, o cuando se busque disminuir la agresividad de los machos. Además, se deberá considerar la inmediatez con la que se desean los resultados y la duración de su efectividad.

En síntesis, la administración a corto plazo de buserelina, un agonista de GnRH, aumentó la concentración de testosterona y mejoró la calidad espermática de chivos. Sin embargo, la administración a corto plazo de otro agonista de GnRH, deslorelina, aunque aumentó la concentración plasmática de testosterona, no mejoró la capacidad de los chivos de estimular la actividad reproductiva de cabras en anestro. Por último, la administración sostenida de deslorelina produjo inhibición marcada de la capacidad reproductiva de chivos, que además fue de mayor intensidad y duración que la producida por la inmunización contra GnRH.

8. CONCLUSIONES

- La manipulación farmacológica de la GnRH es útil para el desarrollo de estrategias de control de la reproducción en chivos adultos.
- La administración de dosis bajas de buserelina durante un período acotado fuera de la estación reproductiva aumentó la concentración de testosterona y mejoró algunas características espermáticas de los chivos.
- La administración deslorelina por un período acotado fuera de la estación reproductiva aumentó la concentración de testosterona de los chivos, pero no mejoró su capacidad para estimular hembras en anestro.
- La administración crónica de deslorelina y la inmunización contra GnRH inhibieron la función reproductiva de chivos adultos.
- La administración sostenida de deslorelina produjo una inhibición más marcada y duradera de la función reproductiva que la inmunización contra GnRH en chivos.
- La inmunización contra GnRH mejoró la crioresistencia espermática de chivos.

9. REFERENCIAS

1. Adams TE (2005). Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 88: 127-139.
2. Ajadi T, Oyeyemi M (2015). Short-term effects of a single dose of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) vaccine on testicular and ejaculate characteristics of dogs. *Bulg J Vet Med* 18: 123-131.
3. Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R (1971). Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Com* 44: 205-210.
4. Aponte PM, Gutierrez-Reinoso MA, Sanchez-Cepeda EG, Garcia-Herreros M (2018). Active immunization against GnRH in pre-pubertal domestic mammals: testicular morphometry, histopathology and endocrine responses in rabbits, guinea pigs and ram lambs. *Animal* 12: 784-793.
5. Arimura A, Sato H, Kumasaka T, Worobec RB, Debeljuk L, Dunn J, Schally AV (1973). Production of antiserum to LH-releasing hormone LH-RH associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH. *Endocrinology* 93: 1092-1103.
6. Arslan M, Weinbauer GF, Schlatt S, Shahab M, Nieschlag E (1993). FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in a juvenile non-human primate (*Macaca mulatta*). *J Endocrinol* 136: 235-243.
7. Aspden WJ, Rao A, Scott PT, Clarke IJ, Trigg TE, Walsh J, D'Occhio MJ (1996). Direct actions of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist, deslorelin, on anterior pituitary contents of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), LH and FSH subunit messenger ribonucleic acid, and plasma concentrations of LH and FSH in castrated male cattle. *Biol Reprod* 55: 386-392.
8. Auclair C, Kelly PA, Labrie F, Coy DH, Schally AV (1977). Inhibition of testicular LH/hCG receptor level by treatment with a potent LHRH agonist or hCG. *Biochem Biophys Res Com*, 76: 855-862.

9. Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL, Goldman BD (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: What has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* 15: 161-190.
10. Bailey J, Morrier A, Cormier N (2003). Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci* 83: 393-401.
11. Beardsley A, O'Donnell L (2003). Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats. *Biol Reprod* 68: 1299-1307.
12. Beracochea F, Viera MN, Acevedo L, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R (2018). Equine chorionic gonadotropin (eCG) improves bucks' semen quality during the nonbreeding season. *Reprod Domest Anim*: 1–7.
13. Bergfeld EGM, D'Occhio MJ, Kinder JE (1996). Pituitary function, ovarian follicular growth, and plasma concentrations of 17 β -estradiol and progesterone in prepubertal heifers during and after treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone agonist deslorelin. *Biol Reprod* 54: 776-782.
14. Bishop CC, Fleming PA, Barnes AL, Collins T, Miller DW (2016). Immunisation against gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) reduces agonistic behaviours in male rangeland goats. *Anim Prod Sci* 56: 1882-1887.
15. Bóveda P, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Muñiz A, Prieto P, Mejía O, Ungerfeld R, Santiago-Moreno J (2018). Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*) epididymal sperm. *Anim Reprod Sci* 192: 193-199.
16. Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ (2014). Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Rumin Res* 119: 114-119.
17. Brogden RN, Buckley MMT, Ward A (1990). Buserelin. *Drugs* 39: 399-437.
18. Bronson FH (1989). *Mammalian reproductive biology*. The University of Chicago Press, Chicago. 324 pp.
19. Brown BW, Mattner PE, Carroll PA, Holland EJ, Paull DR, Hoskinson RM, Rigby, RDG (1994). Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in rams. *Reproduction* 101: 15-21.

20. Brown JL, Roberson M (2017). Novel insights into gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary gonadotrope. *Semin Reprod Med* 35: 130-138.
21. Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan MW, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R (1972). Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc Natl Acad Sci USA* 69:278.
22. Carrizo FE (2001). Hormonoterapia del cáncer de próstata. *Farmacología clínica. Revista Médica del Uruguay* 17: 10-16.
23. Chalivoix S, Bagnolini A, Caraty A, Cognié J, Malpaux B, Dufourny L (2010). Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J Neuroendocrinol* 22:110-118.
24. Chemineau P, Daveau A, Maurice F, Delgadillo JA (1992). Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Ruminant Res* 8: 299-312.
25. Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpaux B (2008). Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim* 43: 40-47.
26. Chillik CF, Acosta AA (2001). The role of LHRH agonists and antagonists. *Reprod Biomed Online* 2: 120-128.
27. Clarke IJ, Parkington HC (2014). Gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) as a regulator of gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 385: 36-44.
28. Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT (2009). Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* 30: 371-378.
29. Claus R, Rottner S, Rueckert C (2008). Individual return to Leydig cell function after GnRH-immunization of boars. *Vaccine* 26: 4571-4578.
30. Clayton RN (1988). Mechanism of GnRH action in gonadotrophs. *Hum Reprod* 3: 479-483.
31. Coloma MA, Gómez-Brunet A, Velázquez R, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J (2010). Freezability of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa according to the glycerolization temperature and plasma testosterone concentration. *Cryobiology* 61: 204-210.

32. Coloma MA, Toledano-Díaz A, Castaño C, Velázquez R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J (2011). Seasonal variation in reproductive physiological status in the Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) and its relationship with sperm freezability. *Theriogenology* 76: 1695–1705.
33. Conn PM, Crowley WF (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Ann Rev Med* 45: 391-405.
34. Conn PM, Rogers DC, Seay SG (1984). Biphasic regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor by receptor microaggregation and intracellular Ca²⁺ levels. *Mol Pharmacol* 25: 51-55.
35. Conn PM, Staley DD, Yasumoto T, Huckle WR, Janovick JA (1987). Homologous desensitization with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) also diminishes gonadotrope responsiveness to maitotoxin: a role for the GnRH receptor-regulated calcium ion channel in mediation of cellular desensitization. *Mol Endocrinol* 1: 154-159.
36. Corona G, Jannini EA, Vignozzi L, Rastrelli G, Maggi M (2012). The hormonal control of ejaculation. *Nat Rev Urol* 9: 508–519.
37. Chrisp P, Goa KL (1990). Nafarelin. *Drugs* 39: 523-551.
38. Dardente H, Lomet D, Robert V, Decourt C, Beltramo M, Pellicer-Rubio MT (2016). Seasonal breeding in mammals: from basic science to applications and back. *Theriogenology* 86: 324–332.
39. Day ML (2018). State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. *Anim Reprod* 12: 473-478.
40. Deeks ED (2010). Histrelin. *Drugs* 70: 623-630.
41. Delgadillo JA, Chemineau P (1992). Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J Reprod Fertil* 94: 45-55.
42. Deslorelin acetate Summary report. The european agency for the evaluation of medicinal products. Committee for veterinary medicinal products. (2002). Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/deslorelin-acetate-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf. Fecha de consulta 5/9/2020.
43. D'Occhio MJ (1993). Immunological suppression of reproductive functions in male and female mammals. *Anim Reprod Sci* 33: 345-372.

44. Duan C, Goldberg E (2003). Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDHC4) blocks capacitation of mouse sperm in vitro. *Cytogenet Genome Res* 103: 352–359.
45. Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long KA, Lopaticki S, Nugent EA, Simons JA, Walker J, Hennessy DP (2001). Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J Anim Sci* 79: 2524-2535.
46. Dyson ALMB, Orgebin-Crist, MC (1973). Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* 93: 391–402.
47. Edwards B, Smith A, Skinner DC (2013). Dose and durational effects of the gonadotropin-releasing hormone agonist, deslorelin: the male rat (*Rattus norvegicus*) as a model. *J Zoo Wildlife Med* 44: S97-S101.
48. Einarsson S (2006). Vaccination against GnRH: pros and cons. *Acta Vet Scand* 48: 1-4.
49. Einarsson S, Andersson K, Wallgren M, Lundström K, Rodriguez-Martinez H (2009). Short-and long-term effects of immunization against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. *Theriogenology* 71: 302-310.
50. Einarsson S, Brunius C, Wallgren M, Lundström K, Andersson K, Zamaratskaia G, Rodriguez-Martinez H (2011). Effects of early vaccination with Improvac® on the development and function of reproductive organs of male pigs. *Anim Reprod Sci* 127: 50-55.
51. Estes MC, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Quintero-Moreno AA, Garde JJ (2006). Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J Androl* 27: 662-670.
52. Flores-Gil VN, de la Blanca MM, Velázquez R, Toledano-Díaz A, Santiago-Moreno J, López-Sebastián A (2020). Influence of testosterone administration at the end of the breeding season on sperm cryoresistance in rams (*Ovis aries*) and bucks (*Capra hircus*). *Domest Anim Endocrinol* 72: 106425.
53. França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD (2016). The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4: 189-212.

54. Fraser HM, Lincoln GA (1980). Effects of chronic treatment with an LHRH agonist on the secretion of LH, FSH and testosterone in the ram. *Biol Reprod* 22: 269-276.
55. Giriboni J, Lacuesta L, Ungerfeld R (2017). Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology* 87: 284-289.
56. Godfrey SI, Walkden-Brown SW, Martin GB, Speijers EJ (1996). Immunisation of goat bucks against GnRH to prevent seasonal reproductive and agonistic behaviour. *Anim Reprod Sci* 44: 41-54.
57. Goericke-Pesch S (2016). Long-term effects of GnRH agonists on fertility and behaviour. *Reprod Domest Anim* 52: 336-347.
58. Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383: 447-450.
59. Goodman RL, Parfitt DB, Evans NP, Dahl GE, Karsch FJ (1995). Endogenous opioid peptides control the amplitude and shape of gonadotropin-releasing hormone pulses in the ewe. *Endocrinology* 136: 2412-2420.
60. Goserelina. Ficha Técnica. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios. (2020). Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/61367/FT_61367.html. Visitado 29/9/2020.
61. Griswold MD (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9: 411-416.
62. Han X, Zhou Y, Zeng Y, Sui F, Liu Y, Tan Y, Cao X, Du X, Meng F, Zeng X (2017). Effects of active immunization against GnRH versus surgical castration on hypothalamic-pituitary function in boars. *Theriogenology* 97: 89-97.
63. Handelsman DJ, Spaliviero JA, Simpson JM, Allan CM, Singh J (1999). Spermatogenesis without gonadotropins: maintenance has a lower testosterone threshold than initiation. *Endocrinology* 140: 3938-3946.
64. Hashem NM, Sallam SM (2020). Reproductive performance of goats treated with free gonadorelin or nanoconjugated gonadorelin at estrus. *Domest Anim Endocrinol* 71: 106390.

65. Hazum E, Koch Y, Liscovitch M, Amsterdam A (1985). Intracellular pathways of receptor-bound GnRH agonist in pituitary gonadotropes. *Cell Tissue Res* 239: 3-8.
66. Hennessy D (2008). Improvac® mode of action. Pfizer Animal Health, Australia Bolentín Técnico.
67. Herbison AE (2006). Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone neuronal network. En: JD Neill. Knobil and Neill's physiology of reproduction (pp. 1415-1482). Academic Press.
68. Histrelina. Ficha Técnica. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios. (2012). Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2015/7/24/89257.pdf>. Visitado 29/9/2020.
69. Huang X, Harlan RE (1993). Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. *Brain Res* 624: 309-311.
70. Huxsoll CC, Price EO, Adams TE (1998). Testis function, carcass traits, and aggressive behavior of beef bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 76: 1760-1766.
71. Janett F, Gerig T, Tschuor AC, Amatayakul-Chantler S, Walker J, Howard R, Bollwein H, Thun, R (2012). Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. *Theriogenology* 78: 182-188.
72. Jeffcoate IA, Lucas JMS, Crighton DB (1982). Effects of active immunization of ram lambs and bull calves against synthetic luteinizing hormone releasing hormone. *Theriogenology* 18: 65-77.
73. Jeong KH, Kaiser UB (2006). Gonadotropin-Releasing Hormone Regulation of Gonadotropin Biosynthesis and Secretion. En: JD Neill. Knobil and Neill's physiology of reproduction (pp. 1635-1701). Academic Press.
74. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-228.

75. Jiménez-Severiano H, D'Occhio MJ, Lunstra DD, Mussard ML, Davis TL, Enright WJ, Kinder JE (2007). Comparative response of rams and bulls to long-term treatment with gonadotropin-releasing hormone analogs. *Anim Reprod Sci* 98: 204-224.
76. Junaidi A, Williamson PE, Cummins JM, Martin GB, Blackberry MA, Trigg TE (2003). Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reprod Fertil Dev* 15: 317-322.
77. Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Stanton PG, Blackberry MA, Cummins JM, Trigg TE (2007). Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod Fertil Dev* 19: 891-898.
78. Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Blackberry MA, Cummins JM (2009). Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reprod Domest Anim* 44: 725-34.
79. Katz LS (2007). Sexual behavior of domesticated ruminants. *Horm Behav* 52: 56-63.
80. Khanum SA, Hussain M, Kausar R (2006). Manipulation of estrous cycle in Dwarf goat (*Capra hircus*) using estrumate under different management conditions. *Anim Reprod Sci* 92: 97-106.
81. Kiyama Z, Adams TE, Hess BW, Riley ML, Murdoch WJ, Moss GE (2000). Gonadal function, sexual behavior, feedlot performance, and carcass traits of ram lambs actively immunized against GnRH. *J Anim Sci* 78: 2237-2243.
82. Knol BW, Dieleman SJ, Bevers MM, Van den Brom WE (1993). GnRH in the male dog: dose-response relationships with LH and testosterone. *Reproduction* 98: 159-161.
83. Kopera I, Tuz R, Hejmej A, Schwarz T, Koczanowski J, Bilińska, B (2009). Immunolocalization of androgen receptor in the boar epididymis: the effect of GnRH agonist deslorelin. *Reprod Domest Anim* 44: 266-272.
84. Krishnamurthy H, Danilovich N, Morales CR, Sairam MR (2000). Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol Reprod* 62: 1146-1159.

85. Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15: 201–204.
86. Lambalk CB, Banga FR, Huirne JA, Toftager M, Pinborg A, Homburg R, van der Veen F, van Wely M (2017). GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type. *Hum Reprod Update* 23: 560–579.
87. Lerrant Y, Kottler ML, Bergametti F, Moumni M, Blumberg-Tick J, Counis R (1995). Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin beta-subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology* 136: 2803–8.
88. Leuprorelina. Ficha Técnica. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios. (2019). Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/61367/FT_61367.html. Visitado 29/9/2020.
89. Levine JE, Duffy MT (1988). Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. *Endocrinology* 122: 2211-2221.
90. Lincoln GA (1976). Seasonal variation in the episodic secretion of luteinizing hormone and testosterone in the ram. *J Endocrinol* 69: 213-226.
91. Lincoln GA, Davidson W (1977). The relationship between sexual and aggressive behaviour and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams and the influence of photoperiod. *J Reprod Fertil* 49: 267-276.
92. Lincoln GA, Fraser HM, Fletcher TJ (1982). Antler growth in male red deer (*Cervus elaphus*) after active immunization against LH-RH. *Reproduction* 66: 703-708.
93. 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: 587-597.
94. Malpaux B. 2006. Seasonal regulation of reproduction in mammals. En: Knobil and Neill's physiology of reproduction. Vol 2. 3ª ed. Neill JD (Ed). Elsevier Academic Press. Missouri, EEUU. pp 2231-2281.

95. McArdle CA, Franklin J, Green L, Hislop JN (2002). Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *J Endocrinol* 173: 1–11.
96. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Kretser DM, Pratis K, Robertson DM (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 57: 149–179.
97. Meachem SJ, McLachlan RI, De Kretser DM, Robertson DM, Wreford NG (1996). Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol Reprod* 54: 36-44.
98. Miyachi Y, Mecklenburg RS, Hansen JW, Lipsett MB (1973). Metabolism of ¹²⁵I-luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 63-67.
99. Moenter SM, Brand RM, Midgley AR, Karsch FJ (1992). Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology* 130: 503-510.
100. Monaco D, Fatnassi M, Padalino B, Aubé L, Khorchani T, Hammadi M, Lacalandra GM (2015). Effects of a GnRH administration on testosterone profile, libido and semen parameters of dromedary camel bulls. *Res Vet Sci* 102: 212–216.
101. Nafarelina. Ficha Técnica. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. (2018). Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/61367/FT_61367.html. Fecha de consulta 29/9/2020.
102. Nederpelt I, Vergroesen RD, IJzerman AP, Heitman LH (2016). Persistent GnRH receptor activation in pituitary α T3-1 cells analyzed with a label-free technology. *Biosens Bioelectron* 79: 721-727.
103. Needham T, Lambrechts H, Hoffman LC (2016). The influence of vaccination interval on growth, carcass traits and testicle parameters of immunocastrated ram lambs. *Small Ruminant Res* 145: 53-57.
104. Nett TM, Crowder ME, Moss GE, Duello TM (1981). GnRH-receptor interaction. V. Down-regulation of pituitary receptors for GnRH in ovariectomized ewes by infusion of homologous hormone. *Biol Reprod* 24: 1145–1155.

105. Nuñez Favre R, García MF, García Mitacek MC, Rearte R, Fontaine C, de la Sota RL, Stornelli MA (2018). Reestablishment of sperm quality after long-term deslorelin suppression in tomcats. *Anim Reprod Sci* 195: 302-308.
106. Padmanabhan V, McNeilly AS (2001). Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction* 121: 21-30.
107. Padula AM (2005). GnRH analogues-agonists and antagonists. *Anim Reprod Sci* 88: 115-126.
108. Pelletier G, Cusan L, Auclair C, Kelly PA, Désy L, Labrie F (1978). Inhibition of spermatogenesis in the rat by treatment with [D-Ala⁶, des-Gly-NH²¹⁰] LHRH ethylamide. *Endocrinology* 103: 641-643.
109. Pereira Lents M, Pires Barbosa L, Almeida Santana AL, Gomes Pinheiro EE, Mugabe LC, Almeida Biscarde CE, Kazumi Kiya C, Morais Machado W, Silva Souza R (2018). Immunocastration of goats using antigonadotrophin releasing hormone vaccine. *Theriogenology* 114: 7-13.
110. Perry CM, Brogden RN (1996). Goserelin. *Drugs* 51: 319-346.
111. Picard-Hagen N, Lhermie G, Florentin S, Merle D, Frein P, Gayrard V (2015). Effect of gonadorelin, lecorelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology* 84: 177-183.
112. Pickering A, Fink G (1976a). Priming effect of luteinizing hormone releasing factor: in vitro and in vivo evidence consistent with its dependence upon protein and rna synthesis. *Obstet Gynecol Surv* 32: 32-33.
113. Pickering AJMC, Fink G (1976b). Priming effect of luteinizing hormone releasing factor: in-vitro studies with raised potassium ion concentrations. *J Endocrinol* 69: 453-454.
114. Pradiee J, O'Brien E, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Lopez-Sebastián A, Marcos-Beltrán JL, Vega RS, Guillamón FG, Martínez-Nevado E, Guerra R, Santiago-Moreno J (2016). Effect of shortening the prefreezing equilibration time with glycerol on the quality of chamois (*Rupicapra pyrenaica*), ibex (*Capra pyrenaica*), mouflon (*Ovis musimon*) and aoudad (*Ammotragus lervia*) ejaculates. *Anim Reprod Sci* 171: 121-128.
115. Purswell BJ, Kolster KA (2006). Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology* 66: 510-513.

116. Redding TW, Kastin AJ, Gonzalez-Barcena D, Coy DH, Coy EJ, Schalch DS, Schally AV (1973). The half-life, metabolism and excretion of tritiated luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in man. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 626-631.
117. Rispoli LA, Nett TM (2005). Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. *Anim Reprod Sci* 88: 57-74.
118. Robertson IS, Fraser HM, Innes GM, Jones AS (1982). Effect of immunological castration on sexual and production characteristics in male cattle. *Vet Rec* 111: 529-531.
119. Rodriguez RE, Wise ME (1991). Advancement of postnatal pulsatile luteinizing hormone secretion in the bull calf by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone during infantile development. *Biol Reprod* 44: 432-439.
120. Rosa HJD, Bryant MJ (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Res* 48: 155-171.
121. Sakurai H, Adams BM, Adams TE (1997). Concentration of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in pituitary tissue of orchidectomized sheep: effect of passive immunization against gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 75: 189-194.
122. Samir H, Sasaki K, Ahmed E, Karen A, Nagaoka K, El Sayed M, Taya K, Watanabe G (2015). Effect of a single injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood flow measured by color doppler ultrasonography in male Shiba goats. *J Vet Med Sci* 77: 549-556.
123. Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeijuk L, White WF (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 393-399.
124. Schanbacher BD, Lunstra DD (1977). Acute and chronic effects of gonadotropin releasing hormone on reproductive characteristics of rams during the nonbreeding season. *J Anim Sci* 44: 650-655.
125. Scott CJ, Rose JL, Gunn AJ, McGrath BM (2019). Kisspeptin and the regulation of the reproductive axis in domestic animals. *J Endocrinol* 240: R1-R16.

126. Shivaji S, Jagannadham MV (1992). Steroid-induced perturbations of membranes and its relevance to sperm acrosome reaction. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* 1108: 99-109.
127. Shore L, Yehuda R, Marcus S, Bartoov B, Shemesh M (2003). Effect of hCG injection on prostaglandin E concentrations in ram seminal plasma. *Prostag Oth Lipid M* 70: 291–301.
128. Sieme H, Troedsson MHT, Weinrich S, Klug E (2004). Influence of exogenous GnRH on sexual behavior and frozen/thawed semen viability in stallions during the non-breeding season. *Theriogenology* 61: 159–171.
129. Smith AW, Asa CS, Edwards BS, Murdoch WJ, Skinner DC (2012). Predominant suppression of follicle-stimulating hormone β -immunoreactivity after long-term treatment of intact and castrate adult male rats with the gonadotrophin-releasing hormone agonist deslorelin. *J Neuroendocrinol* 24: 737-747.
130. Smith JT, Clifton DK, Steiner RA (2006). Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 131: 623-630.
131. Srkalovic G, Bokser L, Radulovic S, Korkut E, Schally AV (1990). Receptors for luteinizing hormone-releasing Hormone (LHRH) in Dunning R3327 prostate cancers and rat anterior pituitaries after treatment with a sustained delivery system of LHRH antagonist SB-75. *Endocrinology* 127: 3052-3060.
132. Stafford KJ, Mellor DJ (2005). The welfare significance of the castration of cattle: a review. *N Z Vet J* 53: 271-278.
133. Stocco DM, McPhaul MJ (2006). Physiology of testicular steroidogenesis. En: Knobil and Neill's physiology of reproduction. En: JD Neill. Knobil and Neill's physiology of reproduction (pp. 977-1016). Academic Press.
134. Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ (1994). Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 15: 462-499.
135. Thatcher WW, Drost M, Savio JD, Macmillan KL, Entwistle KW, Schmitt RL, De La Sota RL, Morris GR (1993). New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim Reprod Sci* 33: 27–49.
136. Tilbrook AJ, De Kretser DM, Clarke IJ (1992). A role for inhibin in the regulation of the secretion of follicle stimulating hormone in male domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 9: 243-260.

137. Tilbrook AJ, Galloway DB, Williams AH, Clarke IJ (1993). Treatment of young rams with an agonist of GnRH delays reproductive development. *Horm Behav* 27: 5-28.
138. Tilbrook AJ, Clarke IJ (2001). Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod* 64: 735-742.
139. Trigg TE, Wright PS, Armour AF, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB, Doyle AG, Walsh J (2001). Use of a GnRH analogue implant to produce reversible, long-term suppression of reproductive function of male and female domestic dogs. *J Reprod Fert* 57: 1-8.
140. Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, Swangchan-uthai T (2006). A review of advances in the use of GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 66: 1507-1512.
141. Triptorelina. Ficha Técnica. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios. (2017). Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/61665/61665_ft.pdf Visitado 29/9/2020.
142. Ungerfeld R, Fila D (2011). Testicular fluid content evaluated by ultrasound image computer-assisted analysis increases with small-dose multiple GnRH injections in rams. *Reprod Domest Anim* 46: 720-723.
143. Ülker H, Kanter M, Gökdal Ö, Aygün T, Karakus F, Sakarya ME, De Avila DM, Reeves JJ (2005). Testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in ram lambs immunized against recombinant LHRH fusion proteins. *Anim Reprod Sci* 86: 205-219.
144. Ülker H, Küçük M, Yilmaz A, Yörük M, Arslan L, De Avila D, Reeves J (2009). Changes in testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in buck kids immunized against LHRH using recombinant LHRH fusion protein. *Reprod Domest Anim* 44: 37-43.
145. Waring DW, Turgeon JL (1980). Luteinizing hormone-releasing hormone-induced luteinizing hormone secretion in vitro: cyclic changes in responsiveness and self-priming. *Endocrinology* 106: 1430-1436.
146. Xue JL, Dial GD, Bartsh S, Kerkaert B, Squires EJ, Marsh WE, Ferre G (1994). Influence of a gonadotropin-releasing hormone agonist on circulating

concentrations of luteinizing hormone and testosterone and tissue concentrations of compounds associated with boar taint. *J Anim Sci* 72: 1290-1298.

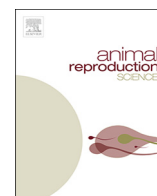
147. Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R (2009). Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenology* 71: 1316–1325.

10. PUBLICACIONES

Anexo I: artículo I. Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. Julia Giriboni, Özdal Gökdağ, Vadullah Eren, Engin Yaralı, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. *Animal Reproduction Science* 200 (2019) 43-50.

Anexo II: artículo II. Short-term treatment with deslorelin implants to improve the bucks' ability to stimulate cyclic activity during the late non-breeding season. Julia Giriboni, Özdal Gökdağ, Okan Atay, Ali Kemali Özüğür, Güneş Erdoğan, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. Aceptado para su publicación en *Small Ruminant Research*.

Anexo III: artículo III. Chronic use of a GnRH-agonist (deslorelin) or immunization against GnRH: effects on testicular function and sperm quality of bucks. Julia Giriboni, Lorena Lacuesta, Julián Santiago-Moreno, Rodolfo Ungerfeld. *Domestic Animal Endocrinology* 71 (2020) 106395.



Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season

Julia Giriboni^{a,*}, Özdal Gökdağ^b, Vadullah Eren^b, Engin Yaralı^b, Julián Santiago-Moreno^c, Rodolfo Ungerfeld^a

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Department of Plant and Animal Production, Çine Vocational School, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

^c Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Hormonal treatment
Seasonality
Testosterone
Sperm
Goats

ABSTRACT

The aim of this study was to determine if daily administration of a GnRH analogue (buserelin acetate) to bucks during the non-breeding season increases testosterone concentration and improves sperm quality. Five bucks received a daily dose of buserelin for 10 days, starting on Day 0 (first administration), and another five bucks remained as controls. Testosterone concentrations were greater in treated than in control bucks during the first hours after buserelin administration ($P = 0.05$), but greater in controls 10 h later ($P < 0.01$). Sperm mass motility and percentage of motile sperm were greater in treated (3.9 ± 0.6 and $70.1 \pm 7.9\%$, respectively) than in control bucks (1.0 ± 0.6 , $P < 0.01$; $45.0 \pm 7.9\%$, $P < 0.05$ respectively) on Day 4. Percentage of sperm with normal morphology tended to be greater in treated than in control bucks ($81.8 \pm 6.2\%$ compared with $63.5 \pm 6.4\%$ respectively, $P = 0.08$). The treatment decreased the percentage of sperm with mid piece defect and with bent tail ($7.0 \pm 1.5\%$ compared with $12.0 \pm 1.5\%$; $8.0 \pm 1.7\%$ compared with $13.5 \pm 1.7\%$, treated and control bucks, respectively, $P = 0.05$ for both). The square root percentage of sperm with loose but heads with normal structures tended to be less in treated than control bucks ($1.3 \pm 0.3\%$ compared with $0.4 \pm 0.3\%$ respectively, $P = 0.06$). It was concluded that daily administration of buserelin during the non-breeding season led to a rapid increase in testosterone concentration and improved sperm quality.

1. Introduction

Most goat breeds have a seasonal reproductive pattern mainly determined by photoperiod (Delgadillo et al., 1993; Dardente et al., 2016). In males of several species, gonadotropin and testosterone concentrations are maximal (Delgadillo and Chemineau, 1992), and sperm of the greatest quality, when photoperiod is decreasing (Zarazaga et al., 2009; Giriboni et al., 2017). During the non-breeding season, however, testosterone has a negative feedback at the hypothalamus, decreasing the frequency of GnRH pulses and thus, gonadotropin (FSH and LH) concentration (Tilbrook et al., 1991). In several livestock management systems, it is important to induce out-of-season parturitions, however, male fertility may be an important limitation unless techniques to modify seasonal reproductive pattern are used. Treatments with melatonin implants (Chemineau et al., 1992) or with light regimens (Delgadillo and Chemineau, 1992) have been effectively used in goats, but these techniques cannot be easily used in extensive productive systems, are economically costly, and require several weeks after initiation to have an effect (see review: Menchaca and Ungerfeld, 2017). It,

* Corresponding author at: Lasplaces 1620, Montevideo 11600, Uruguay.

E-mail address: giriboni02@gmail.com (J. Giriboni).

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.11.009>

Received 6 August 2018; Received in revised form 5 November 2018; Accepted 16 November 2018

Available online 19 November 2018

0378-4320/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

therefore, is important to develop other alternatives to improve reproductive capacity of males during the non-breeding season.

The GnRH agonists can be used to induce a rapid increase in the synthesis and secretion of gonadotropins, and thus in androgen secretion (Schanbacher and Lunstra, 1977; Fraser and Lincoln, 1980). These hormones may be used to increase the reproductive capacity of males. In females, GnRH administration has been included in estrous synchronization (Pierson et al., 2003) and multiple ovulation and embryo transfer (Menchaca et al., 2009) treatments. In males, the stimulatory effects of the administration of GnRH are transient and the information in these regards is limited and results inconsistent. In stallions, treatment with two daily doses of a GnRH analogue (buserelin acetate) for 6 weeks improved sexual behavior and increased the quality of frozen-thawed semen during the non-breeding season (Sieme et al., 2004). Similarly, the administration of three doses of another GnRH analogue (gonadorelin diacetate tetrahydrate) every 2 days increased testosterone concentration, led to having a shortened semen collection period and increased the sperm concentration in the ejaculate of camels (Monaco et al., 2015). Administration of GnRH increased testosterone concentration and testicular blood flow in bucks (Samir et al., 2015) and seminal fluid content in rams (Ungerfeld and Fila, 2011). The administration of two daily doses of GnRH for 7 weeks in rams resulted in an increase in testosterone concentration, scrotal circumference and the percentage of sperm with progressive motility in the ejaculate (Schanbacher and Lunstra, 1977). A shorter treatment (21 days), however, induced an initial increase in gonadotropins and testosterone secretion, but the response was not sustained (Lincoln et al., 1986). The sustained administration of GnRH, therefore, suppresses the pituitary-gonadal axis secretions of gonadotropins and testosterone, respectively (Xue et al., 1994; Junaidi et al., 2007) as it exerts a GnRH receptor downregulation (Lincoln et al., 1986) and thus, reduces LH, FSH and testosterone secretion (Fraser and Lincoln, 1980; Lincoln et al., 1986). Thus, it seems that the effectiveness of the administration of GnRH to improve the reproductive capacity is related to the administration protocol selected.

Considering all this information and based on the testosterone response to buserelin treatment (Damián et al., 2015), the protocol included the administration of the dose used in this previous study for 10 consecutive days. To produce positive effects on spermatogenesis with the administration of GnRH, the treatment should be longer, compromising its effectiveness due to the GnRH receptor downregulation that occurs when its administration is continued for a period. A short-term protocol, therefore, may be useful to enhance sperm quality as a result of effects at the epididymis and the sexual glands. The aim of the present study, therefore, was to determine if daily administration of a GnRH analogue for 10 days to bucks during the non-breeding season increases testosterone concentration and improves semen quality.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

All the procedures were approved by the Ethical Committee of Aydın Adnan Menderes University (ADU-HADYK 64583101/2018/097). The study was performed at the Çine Vocational School (Adnan Menderes University, latitude 37° 37' 48" N, longitude 28° 02' 27" E) during the non-breeding season (June, end of spring) with 10 bucks (six Alpine and four Hair bucks; 1–2 years old; 57.3 ± 3.5 kg; mean ± SEM). All animals were allocated in the same pen (9 m × 5.5 m) and received alfalfa hay (1.8 kg/day/animal) and concentrate (1.5 kg/day/animal), and had free access to water. Animals were allocated to two experimental groups and were of homogeneous breeding, as well as having a similar age and body weight. Five bucks received a daily i.v administration of a GnRH analogue (4.2 µg/animal of buserelin acetate, Buserin, Alke, Istanbul, Turkey) for 10 days, a dose that was used because of the response in a previous study (Damián et al., 2015). Buserelin was administrated at 09:00 h beginning on Day 0 (12 June; day of first administration). The other five bucks remained untreated as controls.

2.2. Blood samples

Blood samples were collected twice daily on Day -7 and -4 and from Day 0 to 10, at 9:00 (immediately before buserelin administration) and 19:00 (10 h after buserelin administration). Additionally, on Day 0 and 10, blood samples were collected every 30 min during 7 h beginning immediately before buserelin administration. Samples were allowed to clot for 1 h at room temperature before centrifugation for 15 min at 1500 g and were stored at -20 °C until testosterone concentration was quantified by radioimmunoassay in plasma aliquots as previously described (Santiago-Moreno et al., 2005). All the samples were analyzed for testosterone concentration in a single assay. The detection limit of the assay was 0.2 nmol/L and the intra-assay coefficient of variation was 7%.

2.3. Scrotal circumference, semen collection and fresh sperm evaluation

Scrotal circumference was measured on Days -7, -4, 1, 4 and 7, and semen was immediately collected on the same days. Semen was collected by electroejaculation using a rectal probe of 13 cm length x 2 cm width with longitudinal electrodes (Mark IV, Olvet, Ruakura, New Zealand). After insertion of the probe coated with carboxymethyl cellulose into the rectum, electrical pulses were applied for 4 s alternated with rest periods of 4 s until ejaculation. Semen was collected from all animals at all times that collections were scheduled to occur. Immediately after semen was collected, sperm motility mass and sperm vigor, as well as the percentages of motile sperm and sperm with progressive motility were assessed subjectively under phase contrast microscopy (Olympus, model CX31) on a warmed (37 °C) glass slide. Sperm mass motility (wave motion) and sperm vigor (the quality of sperm movement) were scored both on a scale of 0 to 5 (Evans and Maxwell, 1987). Sperm mass motility (0: no motion and 5: numerous rapid waves) was

assessed in fresh samples at $10 \times$. Sperm vigor, the percentages of motile sperm and sperm with progressive motility were assessed in semen diluted with UHT skim milk (1:10 v/v) at $400 \times$. Sperm vigor was scored as: 0, no motility; 1, weak tail movement, no forward progression; 2, slow forward movement, often in a circular pattern; 3, moderate forward movement; 4, rapid forward movement; and 5, very rapid forward movement. The percentage of sperm with a functional membrane was determined with use of the hypo-osmotic swelling test (HOST) at $400 \times$ as previously described by Jeyendran et al. (1984). Sperm concentration was determined using a Neubauer chamber. Morphological abnormalities were assessed by phase contrast microscopy at $400 \times$ using $10 \mu\text{L}$ of fixed samples (1:500 v/v in formol citrate) counting 200 cells. Sperm cell morphology was categorized as either normal or cells having an abnormal head, mid-piece defect, coiled tail, bent tail, broken tail, proximal or distal cytoplasmic droplet, or loose but normal head structure (Boe-Hansen et al., 2018). All sperm analyses were performed by the same operator.

2.4. Statistical analysis

Normal distribution of data of testosterone concentration, scrotal circumference and all sperm characteristics was confirmed with the Shapiro-Wilk test and then compared with the mixed model of SAS software (University Edition), considering treatment (administration or not of buserelin), time (day of collection), and the interaction between treatment and time as main effects. Time was included in the model as a repeated data. Percentage of sperm with loose but normal head structure was normalized with square root transformation before the statistical analysis. A mean value of data collected on Days -4 and -7 was used as a single pretreatment value. Testosterone concentrations during the entire experiment in the morning and during the entire experiment in the afternoon were analyzed independently. The testosterone response to buserelin administration on Day 0 and 10 was compared with a mixed model, including the treatment (administration or not of buserelin), the response to buserelin administration (Day 0 or 10), the time after buserelin administration and the interactions as main effects. The animal in the group, and the breed were included as random effects in the model. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Differences were considered as significant when $P \leq 0.05$, and tendencies when $0.1 < P < 0.05$.

3. Results

3.1. Testosterone concentration

Testosterone concentration was not different between groups, however, after the buserelin treatment there was an interaction between treatment and response to buserelin treatment ($P < 0.001$). In the control group, testosterone concentration on Day 0 (8.7 ± 2.4 nmol/L) and 10 (18.0 ± 2.4 nmol/L) was not different, however, in the buserelin-treated bucks, testosterone concentration on Day 0 (18.0 ± 2.4 nmol/L) was greater than on Day 10 (8.8 ± 2.3 nmol/L, $P < 0.001$). Also, on Day 0, testosterone concentration was greater for buserelin-treated (18.0 ± 2.4 nmol/L) than control bucks (8.7 ± 2.4 nmol/L, $P < 0.05$), but on day 10 testosterone concentration was not different between groups (7.5 ± 2.3 and 8.8 ± 2.3 nmol/L, control and buserelin-treated bucks, respectively).

On Day 0, in the samples collected during the first 7 h after the buserelin administration, LSmean values of testosterone concentration were greater in buserelin-treated than control bucks (17.7 ± 3.4 nmol/L compared with 6.4 ± 3.6 nmol/L respectively, $P = 0.05$). There was an interaction between treatment and time ($P < 0.001$): testosterone concentration was greater in buserelin-treated than in control bucks 30 ($P < 0.05$), 60 ($P < 0.01$), 90 ($P < 0.001$), 120 ($P < 0.001$), 150 ($P < 0.01$) and 180 min ($P < 0.05$) after buserelin administration (Fig. 1A). In buserelin-treated bucks testosterone concentration increased and remained greater from 30 to 300 min after the administration of buserelin and subsequently there was a return to basal concentrations.

On Day 10, in the samples collected during the first 7 h after the buserelin administration, testosterone concentration was not affected by the treatment but there was an interaction between treatment and time ($P < 0.001$): testosterone concentration was greater in buserelin-treated than in control bucks at 60 ($P < 0.001$), 90 ($P < 0.01$), 120 ($P < 0.05$) and 180 ($P < 0.05$) after administration. At 300 min after buserelin administration, control bucks had a greater testosterone concentration than buserelin-treated bucks ($P < 0.05$; Fig. 1B). In buserelin-treated bucks, testosterone concentration remained greater from 30 to 240 min after the administration of buserelin, and subsequently there was a return to basal concentrations.

Considering the entire experiment, testosterone concentration before buserelin administration (morning concentrations) was greater in the control than buserelin-treated bucks (9.3 ± 1.0 nmol/L compared with 3.0 ± 0.9 nmol/L, respectively; $P < 0.01$). There was also a tendency for an interaction between treatment and time for the samples collected in the morning ($P = 0.1$; Fig. 2A). In the samples collected during the afternoon, testosterone concentration tended to be greater in the control than buserelin-treated bucks (7.8 ± 1.3 nmol/L compared with 4.3 ± 1.2 nmol/L, $P = 0.08$), and there was no treatment and time interaction (Fig. 2B).

3.2. Scrotal circumference and sperm characteristics

Scrotal circumference was not affected by buserelin administration (30.9 ± 0.9 cm and 29.5 ± 0.9 cm, buserelin-treated and control bucks, respectively) and there was no interaction between treatment and time.

Sperm mass motility was not affected by treatment, but there was an interaction between treatment and time ($P < 0.05$): on Day 4 sperm mass motility was greater in buserelin-treated than in control bucks (3.9 ± 0.6 compared with 1.0 ± 0.6 , respectively, $P = < 0.01$; Fig. 3A). The percentage of motile sperm was not affected by buserelin administration. There, however, was also an interaction between treatment and time ($P = 0.05$). On Day 4, the percentage of motile sperm was greater in buserelin-treated than in

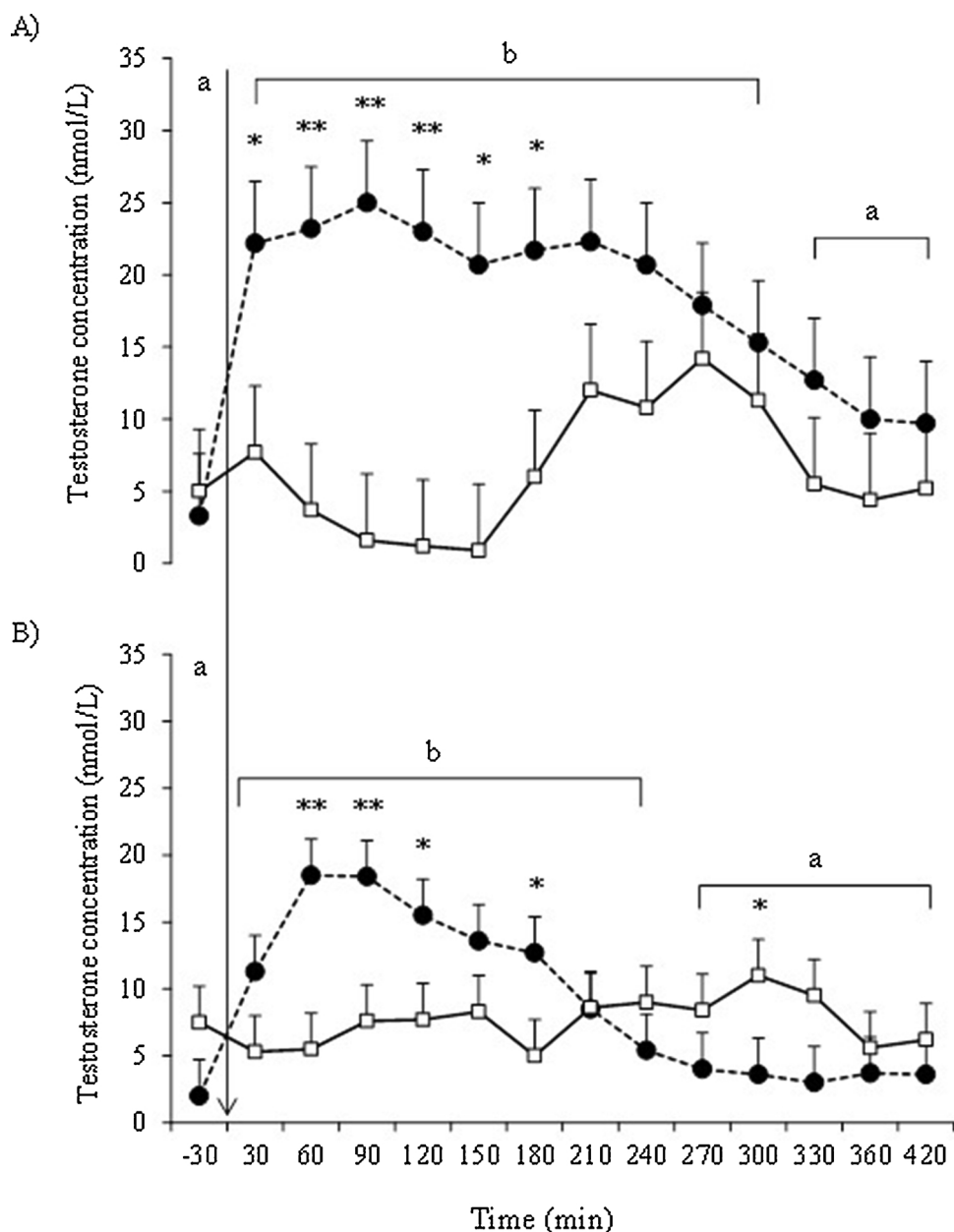


Fig. 1. Serum testosterone concentration (mean $\pm$ SEM) in bucks that received a single dose of 4.2 μ g of buserelin acetate ($n = 5$, $\bullet$) or untreated bucks ($n = 5$, $\square$) for A) the first and B) last day of administration.

Different letters indicate differences over time; differences between groups in the same time are indicated * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$); arrow indicates time of buserelin administration

control bucks ($70.1 \pm 7.9\%$ compared with $45.0 \pm 7.9\%$ respectively, $P < 0.05$; Fig. 3B). The percentage of sperm with progressive motility and sperm vigor were not affected by buserelin administration, but there was a tendency for an interaction between treatment and time ($P = 0.08$ and $P = 0.07$, respectively). The percentage of sperm with normal morphology tended to be greater in buserelin-treated than in control ($81.8 \pm 6.2\%$ compared with $63.5 \pm 6.4\%$ respectively, $P = 0.08$) bucks, and there was no interaction between treatment and time. For morphological abnormalities, the percentages of sperm with a midpiece defect and with a bent tail were affected by treatment. Treatment decreased the percentage of spermatozoa with those abnormalities: percentage of sperm with midpiece defect: $7.0 \pm 1.5\%$ compared with $12.0 \pm 1.5\%$ for buserelin-treated and control bucks, respectively ($P = 0.05$). Percentage of sperm with a bent tail was $8.0 \pm 1.7\%$ compared with $13.5 \pm 1.7\%$ for buserelin-treated and control bucks, respectively ($P = 0.05$). The square root percentage of sperm with loose but normal head structures tended to be less in buserelin-treated than in control bucks ($1.3 \pm 0.3\%$ compared with $0.4 \pm 0.3\%$ respectively, $P = 0.06$). The sperm concentration

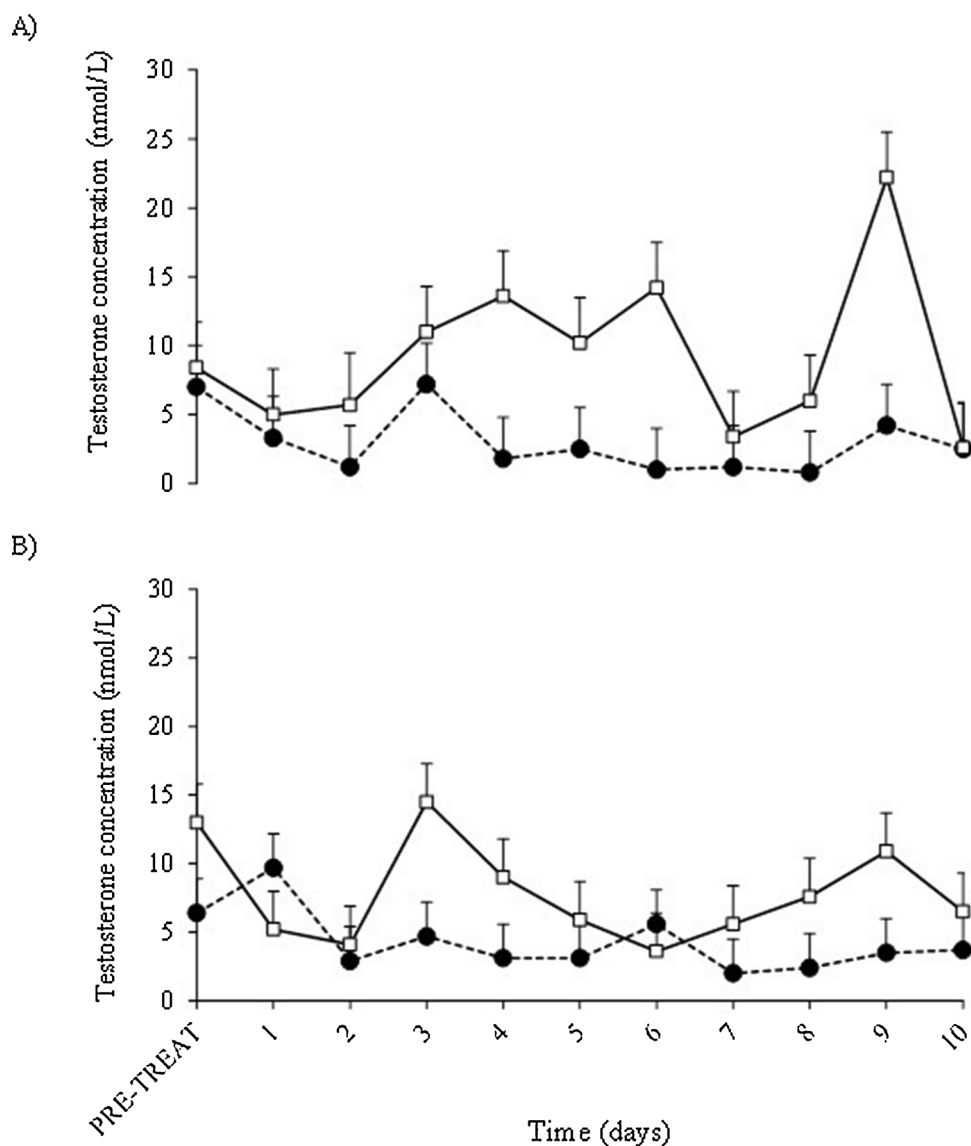


Fig. 2. Serum testosterone concentration (mean $\pm$ SEM) in bucks that received a daily dose of 4.2 μ g of buserelin acetate for 10 consecutive days ($n = 5$, ●) or untreated bucks ($n = 5$, □); samples were collected: (A) in the morning, before buserelin administration (24 h after the previous administration); (B) in the afternoon, 10 h after buserelin administration.

($5.0 \pm 0.6 \times 10^6$ sperm/mL and $4.0 \pm 0.6 \times 10^6$ sperm/mL, buserelin-treated and control bucks, respectively) and the percentage of sperm with functional membranes ($75.2 \pm 6.4\%$ and $66.3 \pm 5.9\%$, buserelin-treated and control bucks, respectively) were not affected by buserelin administration, and there was not an interaction between treatment and time.

4. Discussion

Administration of buserelin to bucks during the non-breeding season induced an immediate increase in testosterone concentration, and there was a rapid and transient improvement in sperm quality. To the best of our knowledge, there are no previous reports where there were similar aims, therefore, there are possibilities for evaluation of other protocols, including different GnRH analogues, doses, and frequency of administration for treatment of bucks to enhance their capacity for out-of-season breeding. It should be important to maximize the stimulus with the minimum risk in desensitizing the response to treatment with GnRH or its analogues.

These effects were obvious for enhanced sperm motility and morphology, even considering the small number of animals used in the study. The improvement in sperm quality was observed in a short time after initiation of buserelin treatments, so the positive effects are probably not explained by effects on spermatogenesis, and are more likely related to enhancement of the conditions for sperm stored in the epididymis and/or seminal plasma composition. In effect, gonadotropins and testosterone secreted in response to

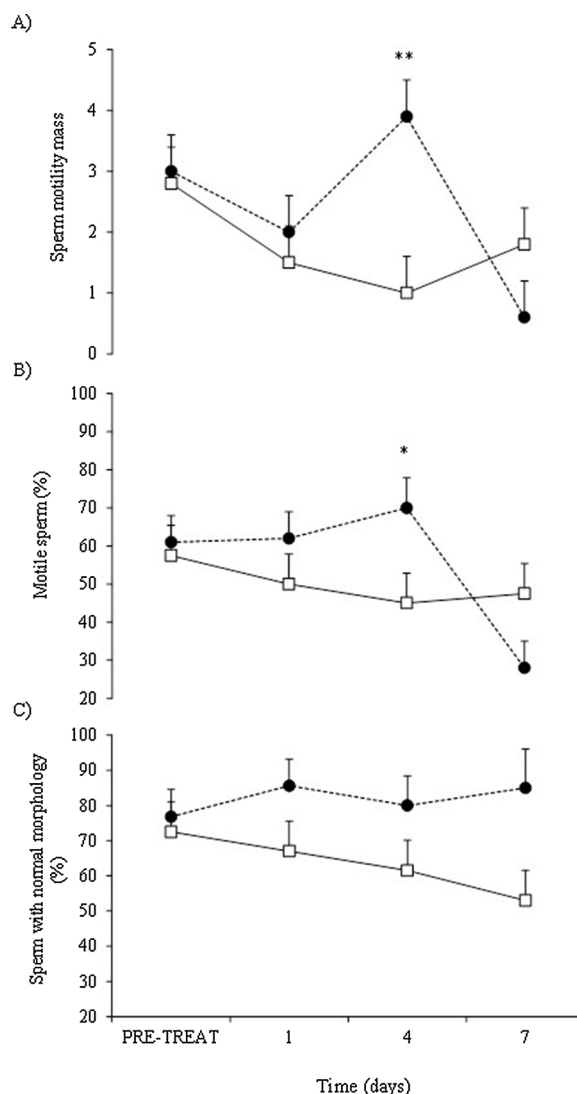


Fig. 3. (A) Sperm motility mass (0–5 scale), (B) percentage of motile sperm (%) and (C) percentage of sperm with normal morphology in bucks that received a daily dose of 4.2 µg of buserelin acetate for 10 consecutive days ($n = 5$, ●-), and untreated bucks ($n = 5$, □-); data are presented as (mean ± SEM).

Differences between groups in a time point are indicated with * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$)

buserelin administration may function directly at the epididymis (Parlevliet et al., 2006; Swider-Al-Amawi et al., 2007, 2010,) and accessory sex glands (Tao et al., 1995, 1998; Bilinska et al., 2005), modifying the composition of the seminal plasma. Androgens regulate the epididymal function (Pujol and Bayard, 1979; Pearl et al., 2007), stimulating the synthesis and release of proteins and vesicular secretions into the seminal plasma (Cooper, 1998), and are also associated with the content of fructose, citric acid and some ions and enzymes released by the accessory sex glands into the seminal plasma (Borquez and Vázquez, 1999; Matsuoka et al., 2006; Zamiri et al., 2010). All of these components in the seminal plasma interact with the sperm membrane and exert positive effects on sperm metabolism, motility, capacitation and fertilization capacity (Duan and Goldberg, 2003; Shore et al., 2003). Considering that the response was rapidly observed it is not likely related to spermatogenesis, however, it possibly could be explained by modifications in the seminal plasma that enhanced sperm quality. Also, in a recent study in bucks a sustained increase in gonadotropins and/or testosterone concentrations for 20 days improved sperm quality and cryo-resistance to the freezing-thawing process (Beracochea et al., 2018). In addition, FSH and LH are detected in the seminal plasma, with its concentration being positively related to sperm mass motility and sperm concentration in bulls (Tuli et al., 1984). The administration of buserelin probably led to an increase in FSH and LH in the seminal plasma, which might explain the improvement on the sperm quality. Although the mechanisms may be still unclear, the positive effects on sperm morphology were evident on the morpho-abnormalities that are produced in the epididymis, as sperm with loose but normal head structures and with a bent tail, providing greater support to the role of the epididymis in the response to treatment in the present study.

The increase in testosterone concentration during the first day of the experiment (Day 0) was followed by lesser concentrations during the following days. During the first day, the testosterone response was directly related to buserelin administration, remaining elevated for 3 h. During the following days and until the end of the experiment, however, testosterone concentrations decreased to basal. This is probably due to a downregulation of the pituitary GnRH receptors. In effect, although the sustained administration of GnRH agonists leads to an initial increase in LH secretion (Aspden et al., 1997) it is followed by an abolition of its pulsatile release as a consequence of the desensitization on the pituitary gland (D'Occhio et al., 2000). There should also be consideration that testosterone was quantified 10 h after the administration of buserelin, so lesser concentrations may also be consequence of the negative feedback of the testosterone increase at the hypothalamic-pituitary axis.

The positive effects on sperm motility were transient and observed near the mid-treatment period, so it would be interesting to study protocols with more frequent but smaller doses of buserelin, which may maintain the positive effects for a longer time. The administration of multiple small GnRH doses induces a sustained increase in testicular blood flow (Ungerfeld and Fila, 2011). This type of administration will likely be more effective in inducing a response similar to what occurs with physiological conditions and, therefore, to induce a more sustained response. It would not be practical, however, to use this administration pattern in field conditions. Considering that GnRH analogues are commercially readily available, the type of treatment approach used in the present study might be useful for improvement of the reproductive capacity of males during the non-breeding season with a low-cost, rapid and easily applicable treatment. Furthermore, the approach used in the present study could provide a means for extending the periods when there is greater semen quality and thus be useful when different reproductive technologies are utilized such as artificial insemination.

Overall, it is concluded that daily administration of a GnRH analogue to bucks enhanced testosterone secretion and transiently improved sperm quality during the non-breeding season. This approach, therefore, may result in development of other protocols for use of GnRH analogue administration to improve reproductive capacity of males during the non-breeding season.

Declarations of interest

None.

Acknowledgements

We are grateful to The Council of Higher Education of Turkey, Mevlana Exchange Program (Project No: MEV-2017-039) and Aydin Adnan Menderes University Scientific Research Project Commission (ADU- KRM-17001-123). We also thank to Rosario Velázquez, who performed the hormonal measurements.

References

- Aspden, W.J., Rao, A., Rose, K., Scott, P.T., Clarke, I.J., Trigg, T.E., Walsh, J., D'Occhio, M.J., 1997. Differential responses in anterior pituitary luteinizing hormone (LH) content and LH- β and α -subunit mRNA, and plasma concentrations of LH and testosterone, in bulls treated with the LH-releasing hormone agonist deslorelin. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14, 429–437. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(97\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(97)00048-9).
- Beracochea, F., Viera, M.N., Acevedo, L., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R., 2018. Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) improves bucks' semen quality during the nonbreeding season. *Reprod. Domest. Anim.* 1–7. <https://doi.org/10.1111/rda.13209>.
- Bilinska, B., Hejmej, A., Gancarczyk, M., Sadowska, J., 2005. Immunoeexpression of androgen receptors in the reproductive tract of the stallion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1040, 227–229. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.030>.
- Boe-Hansen, G.B., Fortes, M.R.S., Satake, N., 2018. Morphological defects, sperm DNA integrity, and protamination of bovine spermatozoa. *Andrology* 6, 1–7. <https://doi.org/10.1111/andr.12486>.
- Borque, C., Vázquez, I., 1999. Correlation between blood plasma levels of free and total testosterone and concentrations of some seminal markers in adult Manchego rams. *Small Rumin. Res.* 33, 263–269. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(99\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00028-0).
- Chemineau, P., Malpau, B., Delgadillo, J.A., Guerin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., Pelletier, J., 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 30, 157–184. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90010-B](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90010-B).
- Cooper, T.G., 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 119–136.
- Damián, J.P., Beracochea, F., Hötzel, M.J., Banchero, G., Ungerfeld, R., 2015. Reproductive and sexual behaviour development of dam or artificially reared male lambs. *Physiol. Behav.* 147, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.004>.
- Dardente, H., Lomet, D., Robert, V., Decourt, C., Beltramo, M., Pellicer-Rubio, M.T., 2016. Seasonal breeding in mammals: from basic science to applications and back. *Theriogenology* 86, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.045>.
- Delgadillo, J.A., Chemineau, P., 1992. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J. Reprod. Fertil.* 94, 45–55. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940045>.
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod. Nutr. Dev.* 33, 609–617. <https://doi.org/10.1051/rnd:19930612>.
- D'Occhio, M.J., Fordyce, G., Whyte, T.R., Aspden, W.J., Trigg, T.E., 2000. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Anim. Reprod. Sci.* 60, 433–442. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00078-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00078-6).
- Duan, C., Goldberg, E., 2003. Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDHC4) blocks capacitation of mouse sperm in vitro. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 352–359. <https://doi.org/10.1159/000076824>.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, second ed. Sydney, Butterworths.
- Fraser, H.M., Lincoln, G.A., 1980. Effects of chronic treatment with an LHRH agonist on the secretion of LH, FSH and testosterone in the ram. *Biol. Reprod.* 22, 269–276. <https://doi.org/10.1095/biolreprod22.2.269>.
- Giriboni, J., Lacuesta, L., Ungerfeld, R., 2017. Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology* 87, 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.004>.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>.
- Junaidi, A., Williamson, P.E., Martin, G.B., Stanton, P.G., Blackberry, M.A., Cummins, J.M., Trigg, T.E., 2007. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 891–898.

- <https://doi.org/10.1071/RD07088>.
- 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. *J. Reprod. Fertil.* 77, 587–597. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770587>.
- Matsuoka, T., Imai, H., Asakuma, S., Kohno, H., Fukui, Y., 2006. Changes of fructose concentrations in seminal plasma and glucose and testosterone concentrations in blood plasma in rams over the course of a year. *J. Reprod. Dev.* 52, 805–810. <https://doi.org/10.1262/jrd.18039>.
- Menchaca, A., Ungerfeld, R., 2017. Reproductive strategies for goat production in adverse environments. In: Simões, J., Gutiérrez, C. (Eds.), *Sustainable Goat Production in Adverse Environments: Volume I*. Springer, Cham, pp. 71–88. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71855-2_5.
- Menchaca, A., Vilarinho, M., Pinczak, A., Kmaid, S., Saldaña, J.M., 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72, 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.002>.
- Monaco, D., Fatnassi, M., Padalino, B., Aubé, L., Khorchani, T., Hammadi, M., Lacalandra, G.M., 2015. Effects of a GnRH administration on testosterone profile, libido and semen parameters of dromedary camel bulls. *Res. Vet. Sci.* 102, 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.011>.
- Parlevliet, J.M., Pearl, C.A., Hess, M.F., Famula, T.R., Roser, J.F., 2006. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology* 66, 755–765. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.12.013>.
- Pearl, C.A., Berger, T., Roser, J.F., 2007. Estrogen and androgen receptor expression in relation to steroid concentrations in the adult boar epididymis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.09.003>.
- Pierson, J.T., Baldassarre, H., Keefer, C.L., Downey, B.R., 2003. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. *Theriogenology* 60, 397–406. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00037-2).
- Pujol, A., Bayard, F., 1979. Androgen receptor in the rat epididymis and their hormonal control. *J. Reprod. Fertil.* 56, 217–222. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560217>.
- Samir, H., Sasaki, K., Ahmed, E., Karen, A., Nagaoka, K., El Sayed, M., Taya, K., Watanabe, G., 2015. Effect of a single injection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood flow measured by color doppler ultrasonography in male Shiba goats. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 549–556. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0633>.
- Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., González-Bulnes, A., Toledano-Díaz, A., Malpau, B., López-Sebastián, A., 2005. Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28, 416–429. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.002>.
- Schanbacher, B.D., Lunstra, D.D., 1977. Acute and chronic effects of gonadotropin releasing hormone on reproductive characteristics of rams during the nonbreeding season. *J. Animal Sci.* 44, 650–655. <https://doi.org/10.2527/jas1977.444650x>.
- Shore, L., Yehuda, R., Marcus, S., Bartoov, B., Shemesh, M., 2003. Effect of hCG injection on prostaglandin E concentrations in ram seminal plasma. *Prostag. Oth. Lipid M.* 70, 291–301. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00145-4).
- Sieme, H., Troedsson, M.H.T., Weinrich, S., Klug, E., 2004. Influence of exogenous GnRH on sexual behavior and frozen/thawed semen viability in stallions during the non-breeding season. *Theriogenology* 61, 159–171. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00205-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00205-X).
- Swider-Al-Amawi, M., Marchlewicz, M., Kolasa, A., Wenda-Rozewicka, L., Wisniewska, B., 2007. Rat epididymal epithelial cells and 17beta-estradiol synthesis under hCG stimulation in vitro. *Folia Histochem. Cytobiol.* 45, 255–263.
- Swider-Al-Amawi, M., Kolasa, A., Sikorski, A., Marchlewicz, M., Baranowska-Bosiacka, I., Wisniewska, B., 2010. The immune expression of FSH-R in the ductuli efferentes and the epididymis of men and rat: effect of FSH on the morphology and steroidogenic activity of rat epididymal epithelial cells in vitro. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2010/506762>.
- Tao, Y.X., Lei, Z.M., Woodworth, S.H., Rao, C.V., 1995. Novel expression of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene in rat prostates. *Mol. Cel. Endocrinol.* 11, R9–R12. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03564-N](https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03564-N).
- Tao, Y.X., Lei, Z.M., Rao, C.V., 1998. Seminal vesicles are novel sites of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin—receptor gene expression. *J. Androl.* 19, 343–347. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb02014.x>.
- Tilbrook, A.J., Kretser, D.D., Cummins, J.T., Clarke, I.J., 1991. The negative feedback effects of testicular steroids are predominantly at the hypothalamus in the ram. *Endocrinology* 129, 3080–3092. <https://doi.org/10.1210/endo-129-6-3080>.
- Tuli, R.K., Galhotra, M.M., Dahiya, N.S., Kaker, M.L., 1984. Follicle stimulating hormone and luteinizing hormone levels in buffalo seminal plasma. *Theriogenology* 21, 959–962. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90389-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90389-3).
- Ungerfeld, R., Fila, D., 2011. Testicular fluid content evaluated by ultrasound image computer-assisted analysis increases with small-dose multiple GnRH injections in rams. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 720–723. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01735.x>.
- Xue, J.L., Dial, G.D., Bartsh, S., Kerkaert, B., Squires, E.J., Marsh, W.E., Ferre, G., 1994. Influence of a gonadotropin-releasing hormone agonist on circulating concentrations of luteinizing hormone and testosterone and tissue concentrations of compounds associated with boar taint. *J. Anim. Sci.* 72, 1290–1298. <https://doi.org/10.2527/1994.7251290x>.
- Zamiri, M.J., Khalili, B., Jafaroghli, M., Farshad, A., 2010. Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams. *Small Rumin. Res.* 94, 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.013>.
- Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., 2009. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenology* 71, 1316–1325. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.007>.

Track Your Accepted Article

The easiest way to check the publication status of your accepted article

Short-term treatment with deslorelin implants to improve the bucks' ability to stimulate cyclic activity during the late non-breeding season

Article reference	RUMIN_106240
Journal	Small Ruminant Research
Corresponding author	Julia Giriboni
First author	Julia Giriboni
Received at Editorial Office	10 Mar 2020
Article revised	29 Aug 2020
Article accepted for publication	5 Sep 2020



➔ISSN 0921-4488

Last update: 5 Sep 2020

✉ [Share via email](#)

Short-term treatment with deslorelin implants to improve the bucks' ability to stimulate cyclic activity during the late non-breeding season

Julia Giriboni ^{a*}, Özdal Gökdağ ^b, Okan Atay ^b, Ali Kemali Özüğür ^b, Güneş Erdoğan ^c,
Julián Santiago-Moreno ^d, Rodolfo Ungerfeld ^a

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República,
Montevideo, Uruguay

^b Department of Plant and Animal Production, Çine Vocational School, Aydın Adnan
Menderes University, Aydın, Turkey

^c Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan
Menderes University, Aydın, Turkey

^d Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología
Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain

*Corresponding author: Julia Giriboni, Lasplacas 1620, Montevideo 11600, Uruguay.

Phone: +598-26225640; fax: +598-26280130; Email: giriboni02@gmail.com

Abstract

The sudden introduction of males to anestrus females stimulates synchronous ovulations. The effectiveness of males to induce this response is androgen dependent. The aim of the present study was to compare the reproductive response of anestrus does to the introduction of teaser bucks treated with or without deslorelin implants, which continuously release a GnRH agonist. While 5 bucks were acutely treated with a single subcutaneous implant containing 7.4 mg of deslorelin (Suprelorin, Virbac) (group Des), other 5 bucks remained as controls (group Con). Each buck was placed with one group of 8 adult females. Deslorelin implants were inserted on Day -6 and from Day 0 to Day 9, bucks were joined with females from 07:00 to 08:00 and from 19:00 to 20:00 every day. Testosterone concentration was measured from blood samples collected twice a day (12 h apart, am/pm) on Days -11, -10, -9 and from Day -6 to Day -1, and collected immediately after buck stimulation from Day 0 to Day 9. Does that came into estrus and that showed short estrous cycles was registered from Day 0 to Day 9. Transrectal ultrasound examination for recording cyclicity on basis of presence of corpus luteum was done between Days 22 and 27, whereas ultrasonographic pregnancy diagnosis was carried out on Day 49. Testosterone concentration was greater in Des than Con bucks before joining them with females (36.0 ± 7.6 nmol/L vs 15.0 ± 6.8 nmol/L; $P = 0.04$), but the difference disappeared when all the experiment was analyzed together. Non significant differences were observed in reproductive response of does stimulated by treated or control males. Therefore, we concluded that both treated and control bucks were fully capable of inducing reproductive activity in anestrus does.

Key words: goats, male effect, ruminants, testosterone

1. Introduction

Reproductive seasonality is a major limitation for goat production in temperate zones, as it limits the kidding period, and thus, the period in which milk and/or meat are offered (Chemineau et al., 2008). The male effect has been used to induce out-of-season ovulations, and thus, parturitions (Chemineau 1987; Chemineau et al., 2006; Delgadillo et al., 2009). The sudden introduction of males to anestrus females stimulates a rapid increase in LH pulse frequency that ends in an LH peak, followed by ovulations (Delgadillo et al., 2009). This technique is widely used among goat farmers in extensive systems considering that it requires minimal human labor and economic costs (Rivas-Muñoz et al., 2007).

The percentage of females that respond to the male effect is related to male's sexual behavior (Véliz et al., 2002). In this sense, males that display high levels of sexual behavior induce ovulation in a greater proportion of females than males with low levels of sexual behavior (Martínez-Alfaro et al., 2014). For example, increase of bucks nutritional plane (Walkden-Brown et al., 1993) or application of photostimulation (Delgadillo et al., 2002) enhances bucks' sexual activity, increasing bucks' ability to induce out-of-season ovulations. In the same direction, at least in certain conditions females would not respond if bucks are not prestimulated with light regimes (Flores et al., 2000; Delgadillo et al., 2002). However, light treatments cannot be easily applied in extensive grazing systems, in which animals remain continuously grazing outside, in big paddocks, with low human intervention.

As both androgenized buck wethers and does are as effective to induce estrus as intact bucks (Mellado and Hernández, 1996), it was proposed that the effectiveness of males as teasers is androgen dependent. Therefore, it is important to develop practical strategies to increase

bucks' testosterone concentration before joining bucks and does to induce ovulations and pregnancies in more anestrous females. In rams, a practical alternative is to administer two doses of eCG, inducing sustained increase of testosterone, and therefore, induce estrus and pregnancies in a greater proportion of females (Ungerfeld et al., 2014). They hypothesized that testosterone concentrations should remain elevated for several days before joining rams with ewes to increase the percentage of females responding (Ungerfeld et al., 2014). However, as the production of eCG is under debate due to ethical concerns, is important to develop other alternative treatments. The application of implants containing GnRH agonists is used as a pharmacological contraception technique, as the continuous release of the analogue desensitizes the pituitary GnRH receptors (Lincoln et al., 1986). However, during the immediate period after inserting these implants there is a short-term *flare up* period, during which GnRH agonists stimulates males' reproductive activity and thus, testosterone concentration increases (Junaidi et al., 2007). Giriboni et al. (2020) observed elevated testosterone concentrations for several weeks after insertion of Deslorelin implants in bucks. Therefore, the insertion of deslorelin implants during a short period before joining bucks with anestrous does may be an alternative to maximize the response of anestrous does. Considering all this information, the aim of this study was to compare the reproductive response of anestrous does to the introduction of teaser bucks treated with or without deslorelin implants.

2. Materials and methods

2.1. General procedures

All the procedures were approved by the Ethical Committee of the Aydın Adnan Menderes University (64583101/2018/096). The study was performed at the Research Unit of the Aydın Adnan Menderes University, Çine Vocational School (latitude 37°37' N, longitude 28°04' E), at Çine town located in Aydın province of Turkey. According to the historical records in this location, and in the southern Aegean region, July is the late non-breeding season. At this location the breeding period is consistently from August to October.

We used 80 does and 10 bucks of Saanen, Alpine and Hair breeds. Females were allocated to 10 groups of 8 does, homogenous in breed and age (2-7 years) in pens with equal dimensions (3.5 m x 4.5 m), which remained completely isolated from all males in the farm during 1 month (minimum distance from bucks= 3500 m). Before beginning the experiment, all does were in a single group, housed in the same facilities where the experiment was carried out. Does grazed during light hours in the rangeland, and received 200 g/day dry alfalfa hay and 500 g/day of a commercial concentrate (containing 15% protein and 2700 Kcal energy) since one month before beginning the study. Dry alfalfa hay and clean and fresh water were available *ad libitum*.

Bucks were fed with the same commercial feed than does, and had free access to alfalfa hay and water. Bucks were allowed to graze natural pastures for 3 h/d.

2.2. Bucks treatments

On Day -6 (Day 0= first contact between bucks and does), a single subcutaneous implant impregnated with 7.4 mg of deslorelin (Suprelorin; Virbac, Barcelona, Spain), a GnRH

agonist that is released continuously, was inserted to 5 bucks (group Des). The other 5 bucks remained as untreated controls (group Con). Deslorelin implants remained in situ until the end of the experiment, when were removed.

2.3. Buck effect

From Day 0 to Day 9, one buck was introduced to each female pen from 07:00 to 08:00 and from 19:00 to 20:00 (time length enough to stimulate anestrous females, Ramírez et al., 2017), and sexual receptiveness was continuously recorded. Does were considered to be in estrus when they remained immobile at mounting. A female was considered to have a short estrus cycle when a second estrus was observed within Day 5 and Day 9. During all the experiment, each buck stimulated all the times the same group of does. When bucks were not in the females' pens, they remained as a single male group in a pen of 4 m x 6 m separated 100 m from those of the females. After Day 9, bucks and does were allocated permanently in separated pens.

The presence and number of corpora lutea (CL) in each ovary of each doe was determined on Days 22 and 27 by transrectal ultrasound (Mylab 30-Esaote, Genova, Italy) with a 7.5 MHz linear rectal transducer. Does were fasted for 7 h before the examination to avoid excess gas in the loops and prevent artefacts. Goats were maintained on standing position and fecal pellets were removed manually before examination. To avoid the gas artefacts caused by the caecum, the probe surface was covered with a large amount of ultrasound gel. All screening procedures were performed by the same operator.

124 Additionally, pregnancy diagnosis were performed by transrectal ultrasound on Day 49. Does
125 with gestational sacs were assumed as pregnant in the study. At the end of study, litter size
126 (number of kids born per female kidding) were recorded.

127 *2.4. Blood collection and testosterone concentration determination*

128 On Days -11, -10, -9 and from Day -6 to Day -1, blood samples were collected from all males
129 at 9:00 and 19:00 and from Day 0 to Day 9 immediately after the buck stimulation (at 08:00
130 and 20:00) to determine testosterone concentration. Blood samples were allowed to clot for
131 1 h at room temperature before being centrifuged for 15 min, and stored at -20 °C until
132 testosterone was measured. Serum testosterone concentration was measured by
133 radioimmunoassay in plasma aliquots as previously described (Santiago-Moreno et al.,
134 2005). The detection limit of the assay was 0.2 nmol/L and the intra-assay coefficient of
135 variation was 7%.

136 *2.5. Statistical analysis*

137 Testosterone concentration was analyzed considering 3 different periods: 1) the entire study
138 (Day -6 to Day 9.5); 2) from 2 days after the insertion of the deslorelin implants until 12 h
139 before the first contact with does (Day -4.5 to Day -1, deslorelin treatment without contact
140 between sexes) and 3) the period in which males and does were in contact (Day 0.5 to Day
141 9.5, deslorelin treatment and contact between sexes twice daily). In all cases, testosterone
142 concentration was compared using the proc mixed of SAS software (University Edition). The
143 model included the group of bucks (Des or Con), time and the interaction between group and
144 time. The buck within each group and their breed were included as random effects. Data for
145 testosterone concentration is presented as LSmeans $\pm$ SEM.

146 Frequencies of does that came into estrus, does that showed short estrous cycles, pregnancy
147 rate (pregnant does/stimulated does), and does with single or multiple fetuses were compared
148 using the chi-square test. Ovulation rate was compared using the Brown test. Days between
149 introduction of males and onset of estrus, ovulation rate and litter size are presented as mean
150 $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Testosterone concentration

Considering the entire experiment, testosterone concentration was not different between Des and Con bucks. However, testosterone concentration was greater in Des (36.0 ± 7.6 nmol/L) than in Con (15.0 ± 6.8 nmol/L) bucks ($P = 0.04$) from Day -4 to Day -1.5 (Figure 1).

3.2. Females' response

Insignificant differences in most of the reproductive parameters in does stimulated with Des and Con bucks were observed in present study (Table 1). Overall, until Day 11, 66.3% of the stimulated does came into estrus. All the does that got pregnant gave birth.

4. Discussion

Deslorelin implants produced a fast increase of testosterone concentration, which rise rapidly (1.5 days after insertion), in consonance with recent reports in bucks (Giriboni et al., 2020). However, although Des bucks produced more testosterone during the period immediate before joining them with anestrus females, there were no differences in does' reproductive response. This may be explained by the rapid and unexpected increase of testosterone concentration in Con bucks after Day 0, which probably masked previous differences. Overall, this implies that bucks do not need an extended period of elevated testosterone concentrations to induce high reproductive responses in anestrus females, as was reported for sheep by Ungerfeld et al. (2014).

At least in our experimental conditions, sexually inactive bucks responded to the sudden exposure of females with an acute great increase in testosterone secretion, even greater than what has already been reported for other breeds and conditions (Walkden-Brown et al., 1994). Therefore, although Des bucks achieved Day 0 more stimulated than controls, the acute contact with females stimulated and enhanced their reproductive activity, probably inducing an increase in LH and thus in testosterone secretion. Although in certain conditions stimulation is only induced by estrous females (sheep: Ungerfeld and Silva, 2004; goats: Ramírez et al., 2019), non-cyclic females may also stimulate sexual responses, especially after a period in which males remained isolated (Gonzalez et al., 1991), as happened in this study. Therefore, the great increase in testosterone secretion after the contact with females probably enhanced bucks' reproductive status, and thus, avoided possible differences in bucks effectiveness when used as teasers.

182 There were no differences in the reproductive response of does stimulated by treated or
183 untreated males. Probably, males from both groups induced similar LH responses in
184 anestrus does, enough to induce ovulation, as a high percentage of females ovulated even
185 when they were teased by untreated bucks. In this sense, and contrary to what we expected
186 according to previous reports (Luna-Orozco et al., 2012), non-stimulated bucks were highly
187 effective as teasers. Therefore, it should not be considered as a general rule the need of prior
188 stimulation of bucks for its' use as teasers, and that their effectiveness may be more related
189 to the strength of the seasonal pattern in each population at each location.

190 The results of this study also support the concept that the continuous presence of the bucks
191 is not necessary to obtain a good response of the male effect, which may facilitate animal
192 management. Short stimulating periods, even as two periods of 1 h/d, were enough to induce
193 high reproductive responses in anestrus does. This expands previous reports of full
194 responses after 4 h of daily contact (Bedos et al., 2010) of photostimulated bucks, to even
195 shorter periods of non-stimulated bucks. The use of teasers that do not need to be
196 photostimulated is a practical advantage, as it does not require building facilities that can be
197 expensive and difficult to implement.

198 In conclusion, both treated and control bucks were fully capable of inducing reproductive
199 activity in anestrus does. Our results expands previous findings that the continuous contact
200 between sexes is not essential, and suggests that reducing the time of contact to half of
201 previously reported is sufficient to generate a response of does, which has practical and
202 economic advantages to goat farmers.

203 **Acknowledgements**

204 We are grateful to The Council of Higher Education of Turkey, Mevlana Exchange Program
205 (Project No: MEV-2017-039) and Aydın Adnan Menderes University Scientific Research
206 Project Commission (ADU- KRM-17001-123). We also thank to Rosario Velázquez, who
207 performed the hormonal measurements.

208 **References**

- 209 Bedos, M., Flores, J.A., Fitz-Rodríguez, G., Keller, M., Malpaux, B., Poindron, P.,
210 Delgadillo, J.A., 2010. Four hours of daily contact with sexually active males is sufficient to
211 induce fertile ovulation in anestrus goats. *Hormon. Behav.* 58, 473-477.
- 212 Chemineau, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles
213 in anovulatory goats - a review. *Livest. Prod. Sci.* 17, 135-147.
- 214 Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M.T., Lassoued, N., Khaldi, G., Monniaux, D., 2006. Male-
215 induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod.*
216 *Nutr. Dev.* 46, 417-429.
- 217 Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiery, J.C., Pellicer-Rubio, M.T., Malpaux, B.,
218 2008. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and
219 practical implications. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 40-47.
- 220 Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Malpaux,
221 B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats
222 treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.* 80, 2780-2786.
- 223 Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A., Martin, G.B., 2009. The 'male
224 effect' in sheep and goats - revisiting the dogmas. *Behav. Brain Res.* 200, 304-314.
- 225 Flores, J.A., Véliz, F.G., Pérez-Villanueva, J.A., Martínez De La Escalera, G., Chemineau,
226 P., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the
227 limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol.*
228 *Reprod.* 62, 1409-1414.

229 Giriboni, J., Lacuesta, L., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R., 2020. Chronic use of a GnRH
 230 agonist (deslorelin) or immunization against GnRH: effects on testicular function and sperm
 231 quality of bucks. *Domest. Anim. Endocrinol.* 71, 106395.

232 Gonzalez, R., Orgeur, P., Poindron, P., Signoret, J.P., 1991. Female effect in sheep. I. The
 233 effects of sexual receptivity of females and the sexual experience of rams. *Reprod. Nutr.*
 234 *Develop.* 31, 97-102.

235 Junaidi, A., Williamson, E., Martin, G.B., Stanton, P.G., Blackberry, M.A., Cummins, J.M.,
 236 Trigg, T.E., 2007. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotropin-
 237 releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone in male dogs treated with GnRH agonist
 238 implants. *Reprod. Fertil. Dev.* 19.891–898.

239 Lincoln, G.A., Fraser, H.M., Abbott, M.P., 1986. Blockade of pulsatile LH, FSH and
 240 testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *J. Reprod. Fertil.*
 241 77, 587–597.

242 Luna-Orozco, J.R., Guillen-Muñoz, J.M., De Santiago, M.D.L.A., García, J.E., Rodríguez-
 243 Martínez, R., Meza-Herrera, C.A., Mellado, M., Véliz, F.G., 2012. Influence of sexually
 244 inactive bucks subjected to long photoperiod or testosterone on the induction of estrus in
 245 anovulatory goats. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 71-75.

246 Martínez-Alfaro, J. C., Hernández, H., Flores, J. A., Duarte, G., Fitz-Rodríguez, G.,
 247 Fernández, I. G., Bedos, M., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J.A., Vielma, J., 2014.
 248 Importance of intense male sexual behavior for inducing the preovulatory LH surge and
 249 ovulation in seasonally anovulatory female goats. *Theriogenology* 82, 1028-1035.

250 Mellado, M., Hernández, J.R., 1996. Ability of androgenized goat wethers and does to induce
251 estrus in goats under extensive conditions during anestrus and breeding seasons. *Small*
252 *Rumin. Res.* 23, 37-42.

253 Ramírez, S., Bedos, M., Chasles, M., Hernández, H., Flores, J.A., Vielma, J., Retana-
254 Márquez, M.S., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 2017. Fifteen minutes of daily
255 contact with sexually active male induces ovulation but delays its timing in seasonally
256 anestrus goats. *Theriogenology* 87, 148-153.

257 Ramírez, S., Chesneau, D., Grimaldo-Viesca, E., Vielma, J., Hernández, H., Santiago-
258 Moreno, J., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 2019. Continuous presence of
259 females in estrus does not prevent seasonal inhibition of LH and androgen concentrations in
260 bucks. *Domest. Anim. Endocrinol.* 69, 68-74.

261 Rivas-Muñoz, R., Fitz-Rodríguez, G., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2007.
262 Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous
263 exposure to males. *J. Anim. Sci.* 85, 1257–1263.

264 Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., González-Bulnes, A., Toledano-Díaz, A., Malpoux,
265 B., López-Sebastián, A., 2005. Differences in reproductive pattern between wild and
266 domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin
267 and melatonin concentrations. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28, 416–429.

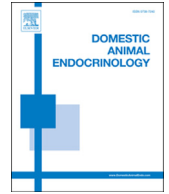
268 Ungerfeld, R., Silva, L., 2004. Ewe effect: endocrine and testicular changes in experienced
269 adult and inexperienced young Corriedale rams used for the ram effect. *Anim. Reprod.*
270 *Sci.* 80, 251-259.

271 Ungerfeld, R., Clemente, N., Bonjour, L., Orihuela, A., 2014. Equine chorionic
272 gonadotrophin administration to rams improves their effectiveness to stimulate anoestrous
273 ewes (the “ram effect”). *Anim. Reprod. Sci.* 149, 194-198.

274 Véliz, F.G., Moreno, S., Duarte, G., Vielma, J., Chemineau, P., Poindron, P., Malpaux, B.,
275 Delgadillo, J.A., 2002. Male effect in seasonally anovulatory lactating goats depends on the
276 presence of sexually active bucks, but not estrous females. *Anim. Reprod. Sci.* 72, 197-207.

277 Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Henniawati, 1993. The male effect in the Australian
278 cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous females. *Anim.*
279 *Reprod. Sci.* 32, 69-84.

280 Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., 1994. The 'female
281 effect' in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and
282 testosterone response of bucks to oestrous does. *Reproduction* 100, 521-531.



Chronic use of a GnRH agonist (deslorelin) or immunization against GnRH: effects on testicular function and sperm quality of bucks



J. Giriboni^{a,*}, L. Lacuesta^a, J. Santiago-Moreno^b, R. Ungerfeld^a

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2018

Received in revised form 5 September 2019

Accepted 6 September 2019

Keywords:

Contraception

GnRH agonist

GnRH immunization

Sperm characteristics

Testosterone concentration

ABSTRACT

Chronic use of GnRH agonists and immunization against GnRH have been used as reversible contraceptive methods. The aim of this study was to compare the effectiveness of both treatments to inhibit reproductive function of adult bucks, in terms of strength and duration of the effects. We used 9 control untreated bucks (CON), 7 bucks treated chronically with a GnRH agonist (subcutaneous implants with 7.4 mg of deslorelin, Suprelorin, Virbac) (AGO), and another 7 bucks were immunized against GnRH (dose of 2 mL of Improvac-Zoetis with 300 µg of a synthetic incomplete analog of natural GnRH; 300 mg of diethylaminoethyl-dextran; and 2.0 mg of chlorocresol) (IMM). Testicular and sperm evaluations, testosterone concentrations, and male odor were determined from 4 wk before applying the treatments until 17 mo of their application. Scrotal circumference of CON (21.0 ± 0.1 cm) and IMM (21.2 ± 0.2 cm) was greater than that of AGO bucks (19.9 ± 0.2 cm) ($P < 0.05$ for each), without difference between CON and IMM bucks. Pixels' color intensity of testicular ultrasound images was not affected by treatment (general mean $\pm$ SEM: 116.0 ± 1.8). Testosterone concentration was greater in CON than AGO and IMM in months 3 and 4, greater in CON and IMM than AGO bucks in months 15 and 16, and greater in IMM than CON and AGO bucks in month 17 ($P < 0.05$ for all comparisons). Male odor was greater in CON (1.5 ± 0.0) than IMM bucks (1.3 ± 0.0) and greater in IMM than AGO (1.1 ± 0.0) bucks ($P < 0.05$ for each). Treatment negatively affected all the sperm variables: the total number of sperm in the ejaculate, sperm motility, sperm with normal morphology and sperm with integral membrane function. It was concluded that both treatments were effective in inhibiting the reproductive axis; however, neither of them produced azoospermia or decreased testosterone concentrations to undetectable levels. With both treatments, there were individual males exhibiting characteristics of fertility in all periods of the study. However, chronic use of a GnRH agonist seemed to be the most effective treatment in terms of duration and strength.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In livestock production systems, males that are not used for reproduction are usually castrated to reduce unwanted

breeding, problems due to libido and aggressive behavior and to improve meat quality and carcass characteristics [1,2]. However, chemical contraception could be advantageous as it is reversible [3,4], does not alter groups' social structure [5], is more aligned with welfare requirements, and is easy to implement. In addition, chemical contraception preserves a residual level of androgens that is adequate to promote body growth without inducing sexual

* Corresponding author. Tel.: +598-26225640; fax: +598-26280130.

E-mail address: giriboni02@gmail.com (J. Giriboni).

and agonistic behaviors [2] and reduces the male-associated odor in some species (boars: [6]). In this sense, controlling the secretion of GnRH makes it possible to control gonadotropin and testosterone secretion, and thus, fertility (see reviews: [7,8]). Chronic use of GnRH agonists or immunization against GnRH prevents GnRH action; therefore, both methods can be potentially used as contraceptive treatments (boars: [4,9]; dogs: [10]; bulls: [11]).

Chronic treatment with GnRH agonists elicits 2 phases of response with different effects. During the acute response, GnRH agonist binds to the GnRH receptor, mimic GnRH action, and induce an increase in LH and testosterone secretion during a short period that lasts some hours or days (flare up effect) (rams: [12,13]; dogs: [14]). However, the sustained action of the agonists desensitizes GnRH receptors [13], probably through a decrease in the expression of GnRH receptor genes [15], and decouples the GnRH receptor from some of the second messenger pathways [16]. This desensitization of GnRH receptors induces a decrease in the pituitary content of LH and FSH [17], and therefore, testosterone secretion decreases [12,13]. Moreover, chronic use of GnRH reduces testicular volume (dogs: [14]), disturbs the normal morphology of testicular tissue (rats: [18,19]), and overall, impairs spermatogenesis (rats: [14,18]). Due to its great effectiveness, deslorelin is the GnRH agonist most widely used during the last few decades [4,20]. However, the effects of chronic use of GnRH agonists in small ruminants have been examined in only 2 studies in rams [12,13]; there is no information on how these treatments affect semen production.

Active immunization against GnRH prevents GnRH diffusion through the capillary plexus within the pituitary and blocks the receptor binding portion of the GnRH molecule (see review: [21]). Different vaccines against GnRH have been tested in bulls [1,11], rams [22,23], and bucks [24], with wide variations in the results, probably because the reproductive response may differ between species [25]. Until now, Improvac seems to be the most used anti-GnRH vaccine. It was developed for the control of boar taint [26], but it also inhibits testicular growth in rams [27] and bucks [28], although to our knowledge, there is only one study in each species. In boars, the use of Improvac disrupts the hypothalamus-pituitary-testis axis leading to a decrease in FSH and LH concentration [29] and to impaired testicular function [30]. Specifically, the application of this vaccine reduces testicular weight, bulbourethral gland size, decreases the number of Leydig cells, and increases the incidence of sperm abnormalities [31]. In addition, Improvac reduces plasma testosterone concentration and fat levels of boar taint compounds [6]. Its application to prepubertal lambs delays testicular growth [22] and decreases the spermatogonia population in the testis [25]. In adult rams, it induces testicular regression, reduces LH, FSH, and testosterone secretion [22,23], and sperm production [32]. In bucks, immunization against GnRH prevents the seasonal increase in LH, FSH, and testosterone secretion and decreases testicular size, male odor, and sperm production [24]. Moreover, it induces azoospermia in a high proportion of immunized animals [33]. In the same direction, testicular and accessory sex gland activity is suppressed, and

consequently, sperm production is arrested in kid bucks immunized against GnRH [34].

Although animals need to receive repeated boosters to maintain an appropriate GnRH antibody titer, the implant may be effective for longer periods, as its duration of effect depends on the availability of deslorelin to be released. Therefore, our hypothesis was that the chronic use of a GnRH agonist produces a negative impact on buck reproduction that persists for a longer time than immunization against GnRH. The aim of this study was to compare the effectiveness of both treatments (chronic use of a GnRH agonist vs immunization against GnRH) to inhibit reproductive function (including the effects on testicular function and sperm output) in bucks. The comparison included the strength and the duration of the effects.

2. Materials and methods

2.1. Animal management and general procedures

All the procedures were approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales (Ethical Committee) of the Facultad de Veterinaria. The study was performed at the Facultad de Veterinaria, Uruguay (35°S), using adult Gabon bucks, blocked by age and body weight [5–6 yr old, 34.8 ± 5.7 kg at the beginning of the study (mean $\pm$ SEM)]. Bucks were allocated in all-male groups, without contact with females. Each group of bucks was housed in 17×10 m pens. All animals were fed with lucerne hay according to nutritional maintenance requirements (in accordance with INRA-CIRAD-AFZ tables) and had free access to water.

Seven bucks received subcutaneous implants with 7.4 mg of deslorelin (Suprelorin; Virbac, Barcelona, Spain), a GnRH agonist that is continuously released (AGO). A single subcutaneous implant was inserted in the prescapular zone of each buck and remained in situ throughout the study. Another 7 bucks were vaccinated against GnRH (Improvac; Zoetis, Brussels, Belgium) (IMM). Each dose (2 mL) contains 300 μ g of a synthetic incomplete analog of natural GnRH; 300 mg of diethylaminoethyl-dextran (aqueous adjuvant), and 2.0 mg of chlorocresol (excipients). The vaccine was administered the same day that implants were placed in AGO bucks and administered again (booster) 4 wk later. The remaining 9 bucks remained untreated as controls (CON).

The study lasted 18 mo. Treatments were applied in week 0, during mid-November (close to the onset of the breeding season for this breed and location; [35]). From week –4 to week 3, testicular and sperm evaluations, blood sampling, and male odor assessment were performed weekly. Then, from January (month 2) to April of the following year (month 17), recordings were performed monthly.

2.2. Testicular evaluations

Scrotal circumference (SC) was measured, and testicular ultrasounds scanning and pixels' color intensity (PCI) of the images were performed as described by Ungerfeld and Fila [36] (darker pictures have lower PCI and indicate greater amounts of testicular fluid). Pixels' color intensity was used to estimate the changes in tissue:fluid ratio in the testes.

This provides information about the relationship between parenchyma density and fluid content, which may be useful to study the function and structure of testis tissue [37].

2.3. Blood samples and testosterone concentration

Blood samples were collected always in the morning (8:00–9:00 AM) at the same time in all groups by jugular venipuncture and allowed to clot at room temperature, and then centrifuged. Then, serum was stored at -20°C until testosterone measurement by RIA at the Laboratorio de Técnicas Nucleares (Facultad de Veterinaria) using a solid-phase kit (TESTO-CT2, Cisbio Bioassays, Codolet, France) [38]. Testosterone concentration was measured in all samples in a single assay. The detection limit of the assay was 0.35 nmol/L, and the intra-assay coefficients of variation for low and high controls were 8% and 20%, respectively.

2.4. Gonadotropin-releasing hormone challenges

Exogenous GnRH was administered to all bucks to determine the response in testosterone secretion and thus the functionality of the hypothalamus-pituitary-testicular axis. In months 5 and 17 (April first and second year, mid-breeding season), a single dose (8.4 $\mu\text{g}/\text{animal}$) of a synthetic GnRH analog (buserelin acetate, Receptal, Intervet International GmbH, Germany) was intravenously administered to each buck and testosterone concentration was determined 30 min before buserelin administration, every 30 min for the first 5 h, and 6 and 7 h after the challenge. The dose was based on previous studies [39,40] in which the same GnRH analog was used to assess testosterone responses. Blood samples were collected and processed, and testosterone concentration was determined as described in Section 2.3.

2.5. Male odor

In bucks, male odor is positively related to testosterone concentration and depends on LH secretion [41]. Therefore, male odor intensity was assessed in a blinded evaluation, according to the study by Walkden-Brown et al [41] and always by the same observer. Male odor intensity of each animal was assessed using a 0 to 2 scale, where: 0 = no odor; 1 = low intensity odor; and 2 = high intensity odor.

2.6. Sperm collection and evaluation

Semen was collected by electroejaculation as described by Abril-Sánchez et al [42]. Immediately after semen collection, ejaculated semen volume, sperm mass motility (scored on a scale: 0 [lowest] to 5 [highest]), and percentage of sperm with progressive motility were assessed by phase-contrast microscope observations made at $100\times$ in 5 fields. Then, an aliquot of semen was diluted in formol citrate to determine sperm concentration using a Neubauer chamber, and total number of sperm in the ejaculate (sperm concentration $\times$ ejaculated semen volume) was calculated. Percentage of sperm with normal morphology was analyzed by phase-contrast microscopy, counting 100 cells. Integral membrane functionality of sperm was

assessed by the hypo-osmotic swelling test (HOST) [43], counting 100 cells. All sperm analyses were performed by the same operator. When it was not possible to collect semen, data for ejaculated semen volume, sperm mass motility, percentage of sperm with progressive motility, sperm concentration, percentage of sperm with normal morphology, total number of sperm in the ejaculate, and percentage of sperm with integral membrane function were considered as 0. It was considered that collecting semen was not possible when the buck did not ejaculate after 10 pulses of 3 V followed by 10 pulses of 4 V [42].

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed using the mixed proc of SAS software (University Edition). The statistical model included the effect of experimental treatments (CON, AGO and IMM), time as a repeated measure, and the interaction between treatment and time. Buck was considered as a random effect in each treatment. Data obtained before treatments (week -4 to week -1) were used as a pretreatment value and included in the model as a covariate. In addition, as all the variables changed rapidly during the first month, data from week -4 to week -1 were analyzed in a separated mixed proc of SAS software, including the effect of experimental treatment time as a repeated measure, and the interaction between treatment and time. Data obtained from week 0 to 3 were analyzed as the mean value of the weekly samples and a unique value for month 1 (first December) was obtained.

Data are presented as LS mean $\pm$ pooled SEM. Differences were considered as significant when $P \leq 0.05$ and tendencies when $0.1 \leq P < 0.05$.

3. Results

3.1. Testicular characteristics

During the first month of the experiment, SC was unaffected by treatment (general mean $\pm$ SEM: 21.2 ± 0.5 cm). However, when data from the entire experiment were analyzed, there was an interaction between treatment and time ($P < 0.0001$): although SC did not change over time in AGO bucks, in IMM and CON bucks, it increased from month 10 (September) to the end of the experiment. However, in months 7, 15, and 16 (January, February and March 2nd year), SC was greater in IMM than in CON bucks (Fig. 1).

During the first month of the experiment, PCI of testicular ultrasound images was affected by the treatments: it was greater in CON (130.0 ± 2.3) than in IMM (121.0 ± 2.6) and AGO (113.0 ± 2.6) bucks and greater in IMM than AGO bucks ($P < 0.05$ for both comparisons). When data from the entire experiment were analyzed, there was an interaction between treatment and time ($P < 0.0001$). Pixels' color intensity of testicular ultrasound images started decreasing in all groups from Month 10 (September). At the end of the experiment (month 17, April 2nd year), PCI of testicular ultrasound images was greater in CON and AGO than in IMM bucks (Fig. 2).

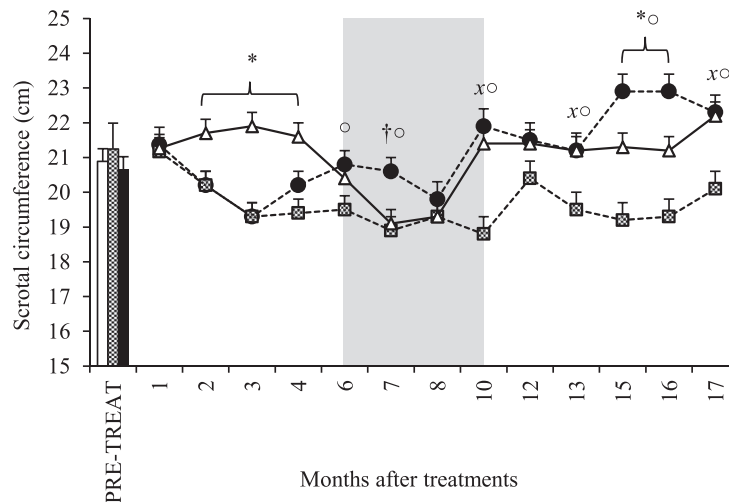


Fig. 1. Scrotal circumference of control untreated bucks (CON, $n = 9$, white bar and Δ), bucks treated with chronic use of a GnRH agonist (AGO, $n = 7$, dotted bar and $\square$), or immunized against GnRH (IMM, $n = 7$, black bar and $\bullet$). Pretreatment values correspond to the covariate. The gray bar indicates the nonbreeding season. Differences between CON and AGO and IMM are shown as *; CON and IMM as †; CON and AGO as x; and IMM and AGO as $\circ$.

3.2. Testosterone concentration

During the first month of treatment, testosterone concentration was greater in AGO (19.6 ± 2.2 nmol/L) than CON (12.5 ± 1.8 nmol/L) and IMM (7.6 ± 2.1 nmol/L) bucks ($P < 0.05$ for both comparisons), without differences between the last 2 groups. When data from the entire experiment were analyzed, there was an interaction between treatment and time ($P < 0.0001$). Testosterone concentration was greater in AGO than CON and IMM bucks in month 2 (January); greater in CON than AGO and IMM in months 3 and 4 (February and March); greater in CON and IMM than

AGO bucks in months 15 and 16 (February and March 2nd year); and greater in IMM than CON and AGO bucks in month 17 (April 2nd year) ($P < 0.05$ for all comparisons) (Fig. 3A).

3.3. Testosterone concentration in response to GnRH challenge

During the first GnRH challenge (month 5, April 1st year), testosterone concentration was greater in CON (26.9 ± 2.5 nmol/L) and IMM (26.5 ± 2.9 nmol/L) than AGO (9.6 ± 2.9 nmol/L) bucks ($P < 0.05$ for all comparisons).

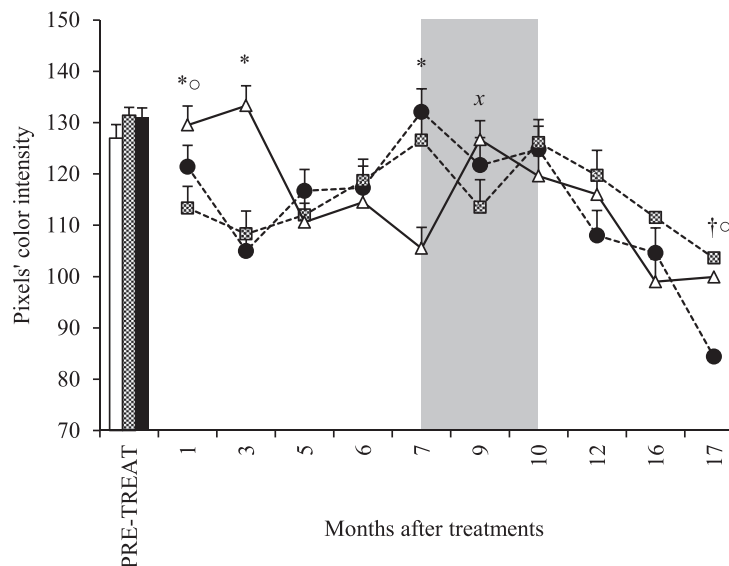


Fig. 2. Pixels' color intensity of control untreated bucks (CON, $n = 9$, white bar and Δ), bucks treated with chronic use of a GnRH agonist (AGO, $n = 7$, dotted bar and $\square$), or immunized against GnRH (IMM, $n = 7$, black bar and $\bullet$). Pretreatment values correspond to the covariate. The gray bar indicates the nonbreeding season. Differences between CON and AGO and IMM are shown as *; CON and IMM as †; CON and AGO as x; and IMM and AGO as $\circ$.

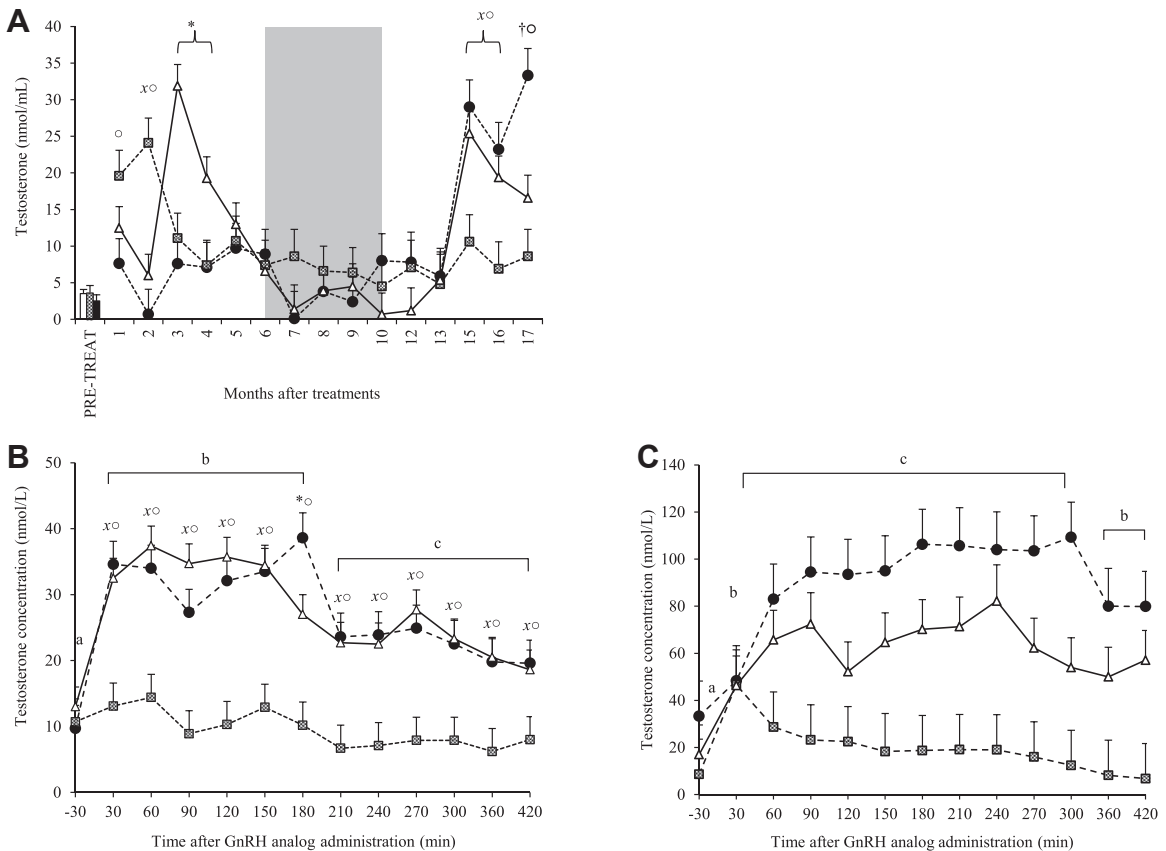


Fig. 3. Testosterone concentration of control untreated bucks (CON, $n = 9$, white bar and Δ), bucks treated with chronic use of a GnRH agonist (AGO, $n = 7$, dotted bar and $\square$), or immunized against GnRH (IMM, $n = 7$, black bar and $\bullet$) during 17 mo (A), in response to exogenous GnRH administration in month 5 (B) and 17 (C). Pretreatment values correspond to the covariate. The gray bar indicates the nonbreeding season. Different letters indicate significant differences over time. Differences between CON and AGO and IMM are shown as *; CON and IMM as †; CON and AGO as x; and IMM and AGO as o.

Testosterone concentration changed over time in CON and IMM bucks after administration of the GnRH analog ($P < 0.0001$): it increased from values recorded 30 min before the challenge and remained elevated until 150 and 180 min, respectively, after which it decreased but did not return to initial values. However, testosterone concentration in AGO bucks did not change in response to GnRH analog administration. There was also an interaction between treatment and time ($P < 0.0001$): testosterone concentration was greater in CON and IMM than AGO bucks from 30 to 420 min after the challenge. In addition, testosterone concentration was not different between CON and IMM bucks, except at 180 min, when it was greater in IMM than in CON bucks (Fig. 3B).

During the second GnRH challenge (month 17, April 2nd year), testosterone concentration was greater in IMM (87.4 ± 9.8 nmol/L) than CON (58.9 ± 8.3 nmol/L) and AGO (16.8 ± 9.8 nmol/L) bucks ($P < 0.05$ for both comparisons). Testosterone concentration changed over time after the administration of the GnRH analog ($P < 0.0001$): it increased at 30 min, reached maximum concentration at 60 min, and remained elevated until 300 min. Then, testosterone concentration decreased but did not reach initial concentration (Fig. 3C). There was no interaction between treatment and time.

3.4. Male odor

During the first month of the experiment, male odor was not affected by treatment (general mean $\pm$ SEM: 1.4 ± 0.1). When data from the entire experiment were analyzed, there was an interaction between treatment and time ($P < 0.0001$): male odor was greater in AGO than CON and IMM bucks in month 2 (January) and in CON than in AGO and IMM bucks in months 3, 4, and 6 (February, March, and May) ($P < 0.05$). Male odor started to increase in all groups starting in month 15 (February 2nd year) and it was greater ($P < 0.05$) in IMM than in CON bucks in months 16 and 17 (March and April 2nd year) (Fig. 4).

3.5. Sperm variables

Semen samples were collected from all CON bucks in every sampling period, except on month 9 (August, mid-nonbreeding season), when it was collected from 8/9 animals. However, it was possible to collect semen in all the AGO bucks only in 6/17 mo and in the IMM group in 10/17 mo (Table 1). In some AGO and IMM animals, it was not possible to collect semen in several consecutive periods: in one AGO buck from month 9 to 12, and 9 to 13 in another, and in one IMM buck from month 7 to 10.

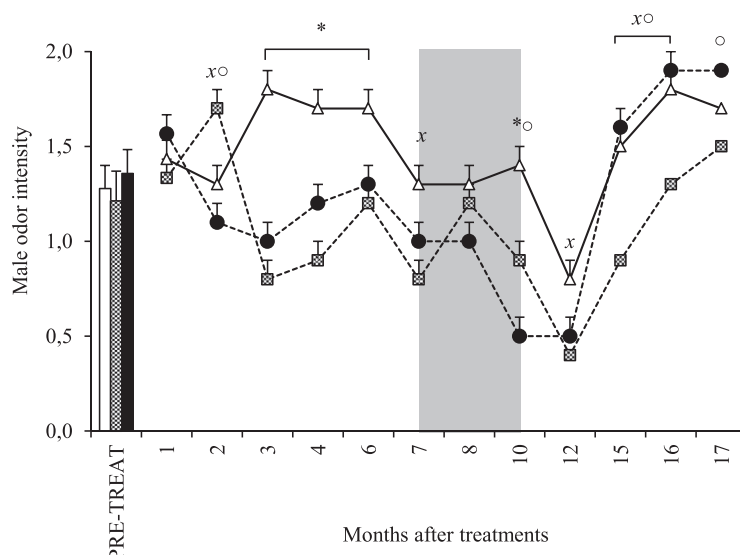


Fig. 4. Male odor intensity of control untreated bucks (CON, $n = 9$, white bar and Δ), bucks treated with chronic use of a GnRH agonist (AGO, $n = 7$, dotted bar and $\square$), or immunized against GnRH (IMM, $n = 7$, black bar and $\bullet$) during 17 mo. Pretreatment values correspond to the covariate. The gray bar indicates the nonbreeding season. Differences between CON and AGO and IMM are shown as $*$; CON and AGO as x ; and IMM and AGO as $\circ$.

The main effects of treatment for each sperm variable are presented in Table 2. In month 1 (December), treatments negatively affected the total number of sperm in the ejaculate, the percentage of sperm with normal morphology and percentage with integral membrane function. Overall, when data from the entire experiment were analyzed, treatments negatively affected all of the sperm variables, and there was an interaction between treatment and time in the percentages of sperm with progressive motility and with normal morphology.

During the first month of the experiment, the total number of sperm was greater ($P < 0.05$) in IMM ($3,034 \pm 571 \times 10^6$ sperm) than in CON ($656 \pm 518 \times 10^6$ sperm) and AGO ($1,189 \pm 592 \times 10^6$ sperm) bucks, without differences between the last 2 groups. When data from the entire experiment were analyzed, the total number of sperm in the ejaculate was greater ($P < 0.05$) in IMM ($1,788 \pm 245 \times 10^6$ sperm) than in AGO bucks ($874 \pm 256 \times 10^6$ sperm). There was no interaction between treatment and time for the total number of sperm (Fig. 5A).

During the first month of the experiment, sperm mass motility was not affected by the treatments. However, when data from the entire experiment were analyzed, sperm mass motility was greater ($P < 0.05$) in semen collected from CON (2.5 ± 0.1) than from AGO (1.3 ± 0.1) and IMM (1.6 ± 0.1) bucks (Fig. 5B).

During the first month of the experiment, the percentage of sperm with progressive motility was not affected by the treatments. When data from the entire experiment were analyzed, there was an interaction between treatment and time ($P = 0.02$): the percentage of sperm with progressive motility was greater ($P < 0.05$) in semen collected from CON than from both groups of treated bucks in months 7 and 10 (January and September). It was also greater in semen collected from CON than from IMM bucks in months 5 (April) and 8 (July) and was greater in semen

collected from CON than from AGO bucks in months 9, 12, 13, and 15 (August, November, December 2nd year and February 2nd year) ($P < 0.05$ for all comparisons) (Fig. 5C).

During the first month of the experiment, the percentage of sperm with normal morphology was greater ($P < 0.05$) in semen collected from CON ($79.6 \pm 3.2\%$) than from AGO bucks ($63.2 \pm 3.8\%$, $P < 0.05$), without difference with that collected from IMM ($69.4 \pm 3.7\%$) bucks. When data from the entire experiment were analyzed, there was an interaction between group and time ($P < 0.01$): the percentage of sperm with normal morphology was greater in semen collected from CON than AGO bucks in months 4, 7, 9, 10, 12, and 13 (March, January, August, September,

Table 1

Percentage of animals from which semen samples could be collected throughout the experiment in control untreated bucks (CON, $n = 9$), bucks treated chronically with a GnRH agonist (AGO, $n = 7$), or immunized against GnRH (IMM, $n = 7$).

Month of treatment	Percentage of animals from which semen samples were collected		
	CON	AGO	IMM
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	83.3	100
4	100	83.3	100
5	100	100	100
6	100	85.7	100
7	100	33.3	71.4
8	100	83.3	71.4
9	87.5	50.0	71.4
10	100	50.0	66.7
12	100	33.3	83.3
13	100	66.7	100
15	100	100	100
16	100	100	100
17	100	100	100

Table 2

Main effects of treatments during month 1 or along the entirety of the experiment, and the interaction between treatment and time for the entirety of the experiment for seminal characteristics in nontreated bucks (CON, n = 9), those treated chronically with a GnRH agonist (AGO, n = 7) or those immunized against GnRH (IMM, n = 7).

Variable	P treatment		P interaction treatment*time
	Month 1	Whole experiment	Whole experiment
Sperm mass motility	ns	<0.0001	ns
Percentage of sperm with progressive motility	ns	<0.0001	<0.05
Total number of sperms in the ejaculate	<0.05	<0.05	ns
Percentage of sperms with normal morphology	<0.05	<0.0001	<0.01
Percentage of sperms with integral membrane function	<0.01	0.0001	ns

Abbreviations: ns, nonsignificant.

November and December 2nd year) ($P < 0.05$ for all comparisons). The percentage of sperm with normal morphology was greater in semen collected from CON than from IMM bucks in months 2 and 4 (January and March) ($P < 0.05$ for both comparisons). The percentage of sperm with normal morphology was greater in semen collected from IMM than from AGO bucks in months 7, 9, 12, and 13 (January, August, November and December 2nd year) ($P < 0.05$ for all comparisons) (Fig. 5D).

During the first month of the experiment, the percentage of sperm with integral membrane function was greater in semen collected from CON ($83.4 \pm 3.7\%$) and AGO bucks ($78.6 \pm 4.6\%$) than from IMM bucks ($59.0 \pm 4.3\%$) ($P < 0.05$ for both comparisons). When data from the entire experiment were analyzed, the percentage of sperm with membrane integrity was greater in semen collected from CON ($72.8 \pm 2.4\%$) than from AGO ($57.7 \pm 2.8\%$) and IMM ($54.0 \pm 2.8\%$) bucks ($P < 0.05$ for both comparisons), without differences between treated groups. There was no interaction between group and time in the percentage of sperm with integral membrane function (Fig. 5E).

4. Discussion

Although the use of deslorelin implants seemed to be the most effective contraceptive method in terms of strength and duration, both chronic use of a GnRH agonist and immunization against GnRH strongly affected most reproductive parameters. Deslorelin implants caused a greater decrease in testosterone concentration and male odor than the immunization against GnRH and inhibited testosterone secretion in response to administration of a GnRH analog. The use of these implants also produced more intensive effects in the percentage of morphologically normal sperm, an important determinant of fertilization ability (see review: [44]). In addition to the decrease in testosterone concentration, the chronic use of a GnRH agonist impaired the response to the ejaculation process for a longer time. As testosterone stimulates the ejaculatory reflex [45], the lower release of this hormone induced by the chronic use of

a GnRH agonist plus the seasonal changes in its secretion could explain the lack of semen collection in many animals, leading also to a wide variation in sperm data.

Furthermore, although immunized bucks were negatively affected during the study, at the end of the experiment they had greater SC, testosterone concentration, and testicular fluid content than untreated animals. These differences may be partially explained by the different mechanisms of action between treatments. The suppressive effects of deslorelin implants imply a progressive loss of pituitary responsiveness to GnRH and to a desensitization of the Leydig cells to LH, which is maintained while the drug is released [46]. However, the effects of anti-GnRH immunization require the continuous production of antibodies against GnRH, and therefore, reproductive function is enhanced immediately after the decline of the antibody titer [3,22]. Therefore, the different mechanisms of action explain the differences between immunization against GnRH and chronic use of the GnRH agonist in terms of strength and duration. The possible advantages of each treatment depend on the purpose for use that each one may have. For a prolonged suppressive effect, treatment with deslorelin implants should be recommended. On the other hand, immunization against GnRH should be considered as the treatment of choice when a rapid reversal of the effects is required.

Although we applied the vaccine according to the manufacturer recommendation [26], it lost effectiveness and had a rebound effect, so it is possible that a more frequent revaccination is needed to maintain the contraceptive effects in bucks. The suppression of male reproductive function by active immunization against GnRH has been reported in many species. In young bulls, immunization against GnRH before puberty temporarily delayed the development of sexual and agonistic behavior [47], and in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) males, reduced libido and affected the antler cycle [48]. In boars [30] and rusa deer (*Rusa timorensis*: [49]), the same treatments also affected negatively semen production and quality. Although this product has been previously tested in lambs [27] and bucks [28], there is no information regarding the effects on semen production and quality. According to our results, the treatment should be frequently repeated to maintain the inhibition of reproductive activity in bucks.

Although both treatments were effective to inhibit the reproductive axis, neither of them produced azoospermia or decreased testosterone concentration to undetectable levels, so these methods are not totally reliable to prevent pregnancies. Moreover, during the studied period, there were individual males that remained fertile according to the characteristics of the ejaculate. Nevertheless, considering that libido is positively related to testosterone concentrations [50] and considering the large decrease in sperm production and quality, it is possible to speculate that fertility would be greatly reduced by both treatments. Therefore, these methods can be considered in some situations where it is not essential to completely avoid pregnancies and it is enough or desirable to decrease fertility and pregnancy rate in a herd of animals. However, it should be important to maintain a continuous control of the reproductive status of each individual male to avoid undesirable pregnancies.

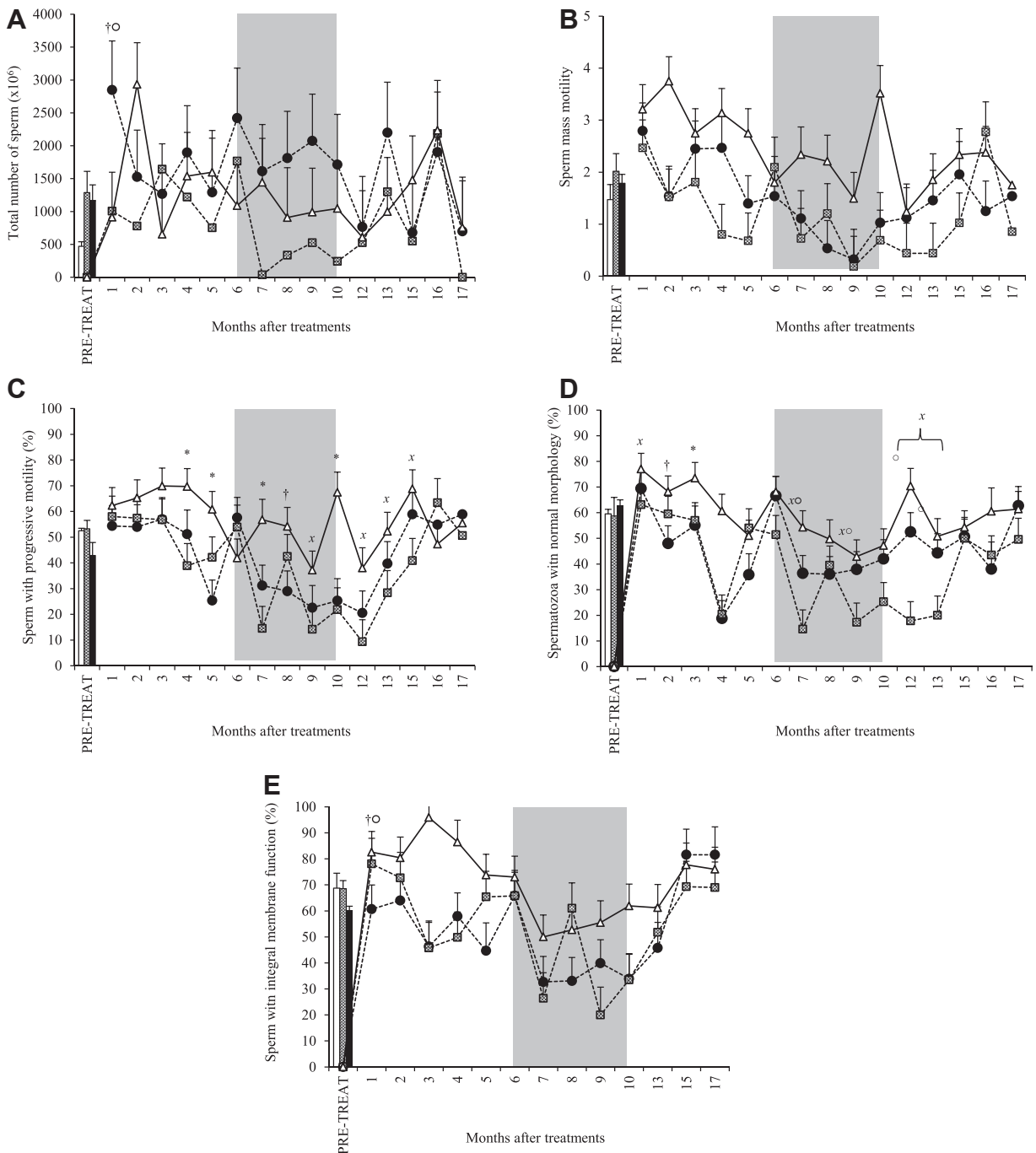


Fig. 5. Total number of sperm in the ejaculate (A), sperm mass motility (B), sperm with progressive motility (C), sperm with normal morphology (D), and sperm with integral membrane function (E) of control untreated bucks (CON, $n = 9$, white bars and Δ), bucks treated with chronic use of a GnRH agonist (AGO, $n = 7$, dotted bars and $\square$), or immunized against GnRH (IMM, $n = 7$, black bars and $\bullet$). Pretreatment values correspond to the covariate. The gray bars indicate the nonbreeding season. Differences between CON and AGO and IMM are shown as *; CON and IMM as †; CON and AGO as x; and IMM and AGO as $\circ$.

Lower sperm production and motility and an increase in sperm abnormalities are in accordance with low testosterone concentrations induced by the treatments, which confirms the essential role of testosterone for spermatogenesis [51,52], epididymal function [53,54], and accessory sex glands activity [55]. The composition of seminal plasma is directly influenced by plasmatic testosterone concentration [56,57],

affecting sperm concentration, motility, and viability [58], as well as the presence of normal acrosomes [59]. Thus, it is possible that the effects mediated by the decrease in gonadotropins and androgen concentration affect both spermatogenesis and seminal plasma composition.

It must be noted that AGO bucks elicited the typical response known as the *flare up* effect at the beginning of

the experiment, including an increase in testosterone secretion, male odor intensity, and testicular fluid content. This enhancement of their reproductive status lasted at least 2 mo, a longer period than what was previously reported in other species (10 d in rams: [13]; 3 d in dogs: [20]). It is possible that at least in bucks, the GnRH receptors may be less sensitive to desensitization than in other species, but it also may be considered that this effect took place during the natural breeding season, when bucks display spontaneously their maximum reproductive status [41]. Therefore, it would be interesting to know if this flare up period is maintained for as long when implants are inserted outside of the breeding season, as this may also be an alternative method to stimulate transiently their reproductive activity.

In summary, both treatments were effective in inhibiting the reproductive axis. However, neither produced azoospermia or decreased testosterone concentration to undetectable levels. With both treatments, there were individual males exhibiting characteristics of fertility in all periods of the study. However, the chronic use of a GnRH agonist seemed to be the most effective treatment in terms of duration and strength. Although none of the treatments produced total infertility, these could be used in situations where the prolificacy of a flock is required to be greatly reduced.

CRedit authorship contribution statement

J. Giriboni: Conceptualization, Methodology, Funding acquisition, Project administration, Writing - original draft, Writing - review & editing. **L. Lacuesta:** Funding acquisition, Project administration, Writing - review & editing. **J. Santiago-Moreno:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. **R. Ungerfeld:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing.

Acknowledgments

Financial support was given by CSIC-VUSP II 2014 (Universidad de la República Montevideo, Uruguay). J.G. received a scholarship from Comisión Académica de Posgrados (CAP, Universidad de la República Montevideo, Uruguay). The authors acknowledge to Campo Experimental No 2, Facultad de Veterinaria (Uruguay), Federico De León, and Milton Pintos for help received in the handling and care of the experimental animals. The authors are grateful to Marcela Acosta, Camila Loureiro, Magdalena Machado, Rosalía Morales, Melanie Piñeyría, and Carolina Vázquez for helping with experimental work.

There are no conflicts of interest for any of the authors.

References

- [1] Huxsoll CC, Price EO, Adams TE. Testis function, carcass traits, and aggressive behavior of beef bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 1998;76:1760–6.
- [2] Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long KA, Lopaticki S, Nugent EA, Simons JA, Walker J, Hennessy DP. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J Anim Sci* 2001;79:2524–35.
- [3] Claus R, Rottner S, Rueckert C. Individual return to Leydig cell function after GnRH-immunization of boars. *Vaccine* 2008;26:4571–8.
- [4] Kauffold J, Rohrmann H, Boehm J, Wehrend A. Effects of long-term treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin®) on sexual function in boars. *Theriogenology* 2010;74:733–40.
- [5] Rosenfield DA, Pizzutto CS. On the importance of alpha behavior integrity in male *Capybara Hydrochoerus hydrochaeris* (Mammalia: Rodentia: Caviidae) following immuno-contraceptive treatment. *J Threat Taxa* 2019;11:13967–76.
- [6] Zamaratskaia G, Andersson HK, Chen G, Andersson K, Madej A, Lundström K. Effect of gonadotropin-releasing hormone vaccine (Improvac™) on steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs. *Reprod Domest Anim* 2008;43:351–9.
- [7] Adams TE. Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2005;88:127–39.
- [8] Padula AM. GnRH analogues-agonists and antagonists. *Anim Reprod Sci* 2005;88:115–26.
- [9] Bonneau M, Dufour R, Chouvet C, Roulet C, Meadus W, Squires EJ. The effects of immunization against luteinizing hormone-releasing hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint related compounds in intact male pigs. *J Anim Sci* 1994;72:14–20.
- [10] Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, Swangchan-Uthai T. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 2006;66:1507–12.
- [11] Janett F, Gerig T, Tschuor AC, Amatayakul-Chantler S, Walker J, Howard R, Bollwein H, Thun R. Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. *Theriogenology* 2012;78:182–8.
- [12] Fraser HM, Lincoln GA. Effects of chronic treatment with an LHRH agonist on the secretion of LH, FSH and testosterone in the ram. *Biol Reprod* 1980;22:269–76.
- [13] Lincoln GA, Fraser HM, Abbott MP. Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *J Reprod Fertil* 1986;77:587–97.
- [14] Vickery BH, McRae GI, Briones WV, Roberts BB, Worden AC, Schanbacher B, Falvo RE. Dose-response studies on male reproductive parameters in dogs with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J Androl* 1985;6:53–60.
- [15] Lerrant Y, Kottler ML, Bergametti F, Moumni M, Blumberg-Tick J, Counis R. Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin beta-subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology* 1995;136:2803–8.
- [16] McArdle CA, Franklin J, Green L, Hislop JN. Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *J Endocrinol* 2002;173:1–11.
- [17] Amundson BC, Wheaton JE. Effects of chronic LHRH treatment on brain LHRH content, pituitary and plasma LH and ovarian follicular activity in the anestrous Ewe. *Biol Reprod* 1979;20:633–8.
- [18] Rivier C, Rivier J, Vale W. Chronic effects of [D-Trp6, Pro9-NET] luteinizing hormone-releasing factor on reproductive processes in the male rat. *Endocrinology* 1979;105:1191–201.
- [19] Pelletier G, Cusan L, Auclair C, Kelly PA, Déry L, Labrie F. Inhibition of spermatogenesis in the rat by treatment with [D-Ala6, des-Gly-NH210] LHRH ethylamide. *Endocrinology* 1978;103:641–3.
- [20] Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Blackberry MA, Cummins JM. Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reprod Domest Anim* 2009;44:725–34.
- [21] Thompson DL. Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Anim Reprod Sci* 2000;60:61:459–69.
- [22] Brown BW, Mattner PE, Carroll PA, Holland EJ, Paull DR, Hoskinson RM, Rigby RDG. Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in rams. *J Reprod Fertil* 1994;101:15–21.
- [23] Kiyima Z, Adams TE, Hess BW, Riley ML, Murdoch WJ, Moss GE. Gonadal function, sexual behavior, feedlot performance, and carcass traits of ram lambs actively immunized against GnRH. *J Anim Sci* 2000;78:2237–43.
- [24] Godfrey SI, Walkden-Brown SW, Martin GB, Speijers EJ. Immunisation of goat bucks against GnRH to prevent seasonal reproductive and agonistic behavior. *Anim Reprod Sci* 1996;44:41–54.
- [25] Aponte PM, Gutierrez-Reinoso MA, Sanchez-Cepeda EG, Garcia-Herreros M. Active immunization against GnRH in pre-pubertal

- domestic mammals: testicular morphometry, histopathology and endocrine responses in rabbits, Guinea pigs and ram lambs. *Animal* 2017;12:784–93.
- [26] Hennessy D. Improvac® mode of action. Technical bulletin. Pfizer Animal Health. Parkville Australia. <http://www.innosure.com.pa/assets/document/en/indesignmoatechbulletintim0509.pdf>. [Accessed 5 September 2019].
- [27] Needham T, Lambrechts H, Hoffman LC. The influence of vaccination interval on growth, carcass traits and testicle parameters of immunocastrated ram lambs. *Small Ruminant Res* 2016;145:53–7.
- [28] Bishop CC, Fleming PA, Barnes AL, Collins T, Miller DW. Immunisation against gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) reduces agonistic behaviours in male rangeland goats. *Anim Prod Sci* 2016;56:1882–7.
- [29] Fuchs T, Thun R, Parvizi N, Nathues H, Koehrmann A, Andrews S, Brock F, Klein G, Sudhaus N, Grosse Beilage E. Effect of a gonadotropin-releasing factor vaccine on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone concentrations and on the development of testicles and the expression of boar taint in male pigs. *Theriogenology* 2009;72:672–80.
- [30] Einarsson S, Brunius C, Wallgren M, Lundström K, Andersson K, Zamaratskaia G, Rodríguez-Martínez H. Effects of early vaccination with Improvac® on the development and function of reproductive organs of male pigs. *Anim Reprod Sci* 2011;127:50–5.
- [31] Einarsson S, Andersson K, Wallgren M, Lundström K, Rodríguez-Martínez H. Short- and long-term effects of immunization against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. *Theriogenology* 2009;71:302–10.
- [32] Schanbacher BD. Responses of ram lambs to active immunization against testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone. *Am J Physiol* 1982;242:E201–5.
- [33] Pereira Lents M, Pires Barbosa L, Almeida Santana AL, Gomes Pinheiro EE, Mugabe LC, Almeida Biscarde CE, Kazumi Kiya C, Morais Machado W, Silva Souza R. Immunocastration of goats using anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine. *Theriogenology* 2018;114:7–13.
- [34] Ülker H, Küçük M, Yılmaz A, Yörük M, Arslan L, de Avila DM, Reeves JJ. Changes in testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in buck kids immunized against LHRH using recombinant LHRH fusion protein. *Reprod Domest Anim* 2009;44:37–43.
- [35] Giriboni J, Lacuesta L, Ungerfeld R. Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology* 2017;87:284–9.
- [36] Ungerfeld R, Fila D. Testicular fluid content evaluated by ultrasound image computer-assisted analysis increases with small-dose multiple GnRH injections in rams. *Reprod Domest Anim* 2011;46:720–3.
- [37] Chandolia RK, Bartlewski PM, Omeke BC, Beard AP, Rawlings NC, Pierson RA. Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. *Theriogenology* 1997;48:99–117.
- [38] Goldzieher JW, Dozier TS, Smith KD, Steinberger E. Improving the diagnostic reliability of rapidly fluctuating plasma hormone levels by optimized multiple-sampling techniques. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;43:824–30.
- [39] Damián JP, Beracochea F, Hötzel MJ, Banchero G, Ungerfeld R. Reproductive and sexual behaviour development of dam or artificially reared male lambs. *Physiol Behav* 2015;147:47–53.
- [40] Giriboni J, Gökdağ Ö, Eren V, Yaralı E, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R. Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 2019;200:43–50.
- [41] Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ, Martin GB. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *J Reprod Fertil* 1994;102:351–60.
- [42] Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Damián JP, Giriboni J, Villagrà-García A, Ungerfeld R. Ejaculation does not contribute to the stress response to electroejaculation in sheep. *Reprod Domest Anim* 2017;52:403–8.
- [43] Jeyendran R, Van Der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, Zaneveld L. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relation to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984;70:219–28.
- [44] Saacke RG. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 2008;70:473–8.
- [45] Fritz WF, Sena LS, Becker SE, Katz LS. Differential effects of androgens, estrogens and socio-sexual context on sexual behaviors in the castrated male goat. *Horm Behav* 2019;109:10–7.
- [46] Junaidi A, Williamson E, Martin GB, Stanton PG, Blackberry MA, Cummins JM, Trigg TE. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:891–8.
- [47] Jago JG, Bass JJ, Matthews LR. Evaluation of a vaccine to control bull behaviour. *Proc New Zeal Soc Anim* 1997;57:91–5.
- [48] Miller LA, Johns BE, Killian GJ. Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *Am J Reprod Immunol* 2000;44:266–74.
- [49] Phraluk O, Wajjwalku W, Siriaronrat B, Booddee O, Thongtip N. Effects of immunization against gonadotropin releasing hormone on reproductive functions in male rusa deer (*Rusa timorensis*). *Thai J Vet Med* 2015;45:1–10.
- [50] Mattner PE, George JM, Braden AWH. Testosterone treatment of ram lambs: effect on adult libido. In: *Aust Soc Reprod Biol*; 1976. p. 17–8. Eighth Annual Conference Proceedings.
- [51] Sofikitis N, Giotitis N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem* 2008;109:323–30.
- [52] Smith LB, Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol* 2014;30:2–13.
- [53] Swider-Al-Amawi M, Marchlewicz M, Kolasa A, Wenda-Rozewicz L, Wiszniewska B. Rat epididymal epithelial cells and 17 beta-estradiol synthesis under hCG stimulation in vitro. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:255–63.
- [54] Swider-Al-Amawi M, Kolasa A, Sikorski A, Marchlewicz M, Baranowska-Bosiacka I, Wiszniewska B. The immunoexpression of FSH-R in the ductuli efferentes and the epididymis of men and rat: effect of FSH on the morphology and steroidogenic activity of rat epididymal epithelial cells in vitro. *J Bio Med Res* 2010;2010:1–8.
- [55] Tao YX, Lei ZM, Woodworth SH, Rao CV. Novel expression of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene in rat prostates. *Mol Cell Endocrinol* 1995;11:R9–12.
- [56] Borque C, Vázquez I. Correlation between blood plasma levels of free and total testosterone and concentrations of some seminal markers in adult Manchego rams. *Small Ruminant Res* 1999;33:263–9.
- [57] Casao A, Cebrián I, Asumpción ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:59–68.
- [58] Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 2006;66:841–50.
- [59] La Falci VSN, Tortorella H, Rodrigues JL, Brandelli A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 2002;57:1035–48.

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Doctorado

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA Montevideo, 29 de octubre de 2020

TRIBUNAL: Dr. Gustavo Gastal (Presidente), Dr. Víctor Parraguez, Dra. Alejandra Stornelli

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.234.302-6	GIRIBONI PINTO, Julia	SSS	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Gustavo Gastal (Presidente)

Dr. Víctor Parraguez

Dra. Alejandra Stornelli

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Defensa de Tesis pueden ser:
B.B.B.-6 o S.S.S.-12