Número de Proyecto: .....
Año: .....

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de .....

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1.TÍTULO del PROYECTO: "EFECTOS REPRODUCTIVOS DEL ANTAGONISTA DE GNRH, AZALINE B, EN EL MACHO CANINO"

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta) 1200 (Medicina Veterinaria)

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta) 1299 (Farmacología y Reproducción animal)

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS Clínica de Pequeños Animales. Departamento de Clínica y Patología

2.2. OTRAS INSTITUCIONES: .....
.....

2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)

2.3.1 . INTEGRANTES

Apellido y Nombre	Título Academico	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem	Firma
Adagio, Lilia Mabel	M.V.	4	D	Clín. Peq. Anim	Adj. E	10	
Wheeler, Juan Tomás	M.V.	2	CD	Clín. Peq. Anim.	Titular S	4	
Hierro, José Alberto	M.V.	5	I	Clin. Peq. Anim	AY. 1º SE	6	
Lattanzi, Lina Daniela	M.V.	5	I	Clín. Peq. Anim.	AY. 1º S	4	
Ríos, Fernando	M.V.	--	AI	Semiología	AY. 1º S	4	
García, Mónica	MV	--	AI	Histología	AY. 1º S	4	
Torres, Perla	MV	4	I	Técnica Pat. Quir.	AY. 1º E	4	
Menguelle, Pablo	MV	--	AI	Clin. Peq. Anim.	Ay. 1º S	4	

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.2. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
	Director Co-Director Tesista		

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (Máximo 3 años)

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 /2010 FINALIZACIÓN: 31 / 06/2011

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

Este trabajo tiene como propósito observar los efectos del antagonista de GnRH, Azaline B, sobre parámetros reproductivos del testículo canino. Se pretende lograr nuevos avances sobre contracepción y mejoramiento reproductivo en caninos machos utilizando un antagonista de GnRH, que se une a los receptores gonadotropos específicos de membrana, compitiendo con las moléculas endógenas de GnRH. Se empleará un diseño experimental prospectivo, aleatorizado y con grupo control. Se incluirán 9 perros clínicamente sanos, de diversas razas, de 20 a 25 kg de peso, y de 2 a 4 años de edad. A 6 los perros se les administrará una única dosis de Azaline B por vía subcutánea y a 3 perros se le suministrará un placebo constituyendo el grupo control. Se realizarán estudios semiológicos, seminales e histológicos en el pretratamiento y postratamiento cada quince días. El antagonista Azaline B podría tener ciertas aplicaciones terapéuticas en el canino macho tales como contracepción y control de la líbido de manera reversible.

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

Existe un grupo de sustancias denominadas análogos de los factores liberadores de gonadotropinas (GnRH), que incluyen agonistas y antagonistas. Los análogos de GnRH se han sintetizado por sustituciones de aminoácidos de la molécula nativa de GnRH. Los agonistas de GnRH estimulan la producción y liberación de gonadotropinas por la hipófisis. Cuando los agonistas son administrados en forma prolongada y en dosis elevada producen una acción farmacológica anti reproductiva, por desensibilización de los receptores de GnRH, suprimiendo la liberación de gonadotropinas que van a actuar a nivel de las gonadas (Vickery y col., 1989; Padula, 2005).

Los antagonistas actúan uniéndose a los receptores gonadotropos específicos de membrana y compiten con las moléculas endógenas de GnRH por la ocupación de éstos (Vickery, 1985). De esta manera y, a diferencia de lo que sucede con los agonistas, no se produce la liberación masiva inicial de gonadotropinas originada por la estimulación del eje hipotálamo hipofisario (Heber y col, 1982; Herbst, 2003). Por lo tanto, la inhibición gonadal se logra más rápidamente con los antagonistas que con los agonistas lo que se considera una ventaja importante (Vickery, 1985; Vickery y Nestor, 1987; Gobello 2006).

Las primeras generaciones de los antagonistas requerían altas dosis para mantener una adecuada supresión de los receptores de GnRH (Vickery y Nestor, 1987), eran hidrófobos y tenían una solubilidad muy limitada, lo que originaba la producción de nódulos inflamatorios en el sitio de la inoculación. Adicionalmente, producían cuadros alérgicos localizados y sistémicos por la liberación de histaminas y otros mediadores químicos (Vickery y Nestor, 1987; Gobello, 2006). Todos estos problemas fueron superados en, su mayor parte, con la aparición de la tercera generación de antagonistas, como el teverelix, abarelix, cetrorelix, ganirelix y acyline entre otros; que demostraron ser bien tolerados en varias especies incluso el perro (Gobello 2006, Herbst, 2003 y 2004). El efecto de los antagonistas en caninos fue descrito por primera vez hace más de dos décadas, cuando se encontraban disponibles únicamente los primeros compuestos. Así se demostró en perros machos que el antagonista de segunda generación detirelix (4 a 2 mg/kg), causa

declinación de la testosterona sérica en forma dosis y tiempo dependiente. Con dosis de 100 µg/kg/día de detirelix se abolió totalmente la espermatogénesis (Vickery y col., 1989).
Tras un intervalo de más de 20 años en el estudio de los antagonistas de GnRH en la especie canina, y debido a la aparición de nuevos compuestos potentes y seguros, se describió el efecto clínico y endocrino de un antagonista de tercera generación, acyline en machos y hembras (Valiente y col., 2007, 2009a y 2009b; García Romero y col., 2009; Gobello, 2007). Una única aplicación de 330 µg/kg de acyline suprimió la concentración de gonadotrofinas durante 10 días sin efectos colaterales locales ni sistémicos en perros (García Romero y col, 2009). El azaline B [Ac-D2Nal1,D4Cpa2,D3Pal3, 4Aph5(atz),D4Aph6(atz),ILys8,DAla10]- GnRH es otro potente antagonista de GnRH de tercera generación que demostró suprimir, sin reacciones adversas, varias funciones reproductivas en otras especies (Campen y col., 1995).
Nada se ha descrito sobre los efectos de este antagonista en el perro. El conocimiento detallado de aspectos clínicos, endocrinos e histológicos gonadales de estos compuestos, permitirá su eventual aplicación práctica futura con fines contraceptivos y terapéuticos.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

***Torres, P.; Hermo, G.; Audisio, S.; D'Amico, G.D.; Adagio, L. y Gobello, C.** (2005) Evaluación del efecto de la desmopresina en caninos con neoplasias mamarias: resultados preliminares. Resumen de las IV Jornadas de Ciencia y Técnica. Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. pp:22

***González, G; Adagio, L; Otegui, F; D'Amico, G. y Gobello, C. 2006**. "Efecto del citrato de tamoxifeno sobre parámetros ultrasonográficos testiculares en caninos". Resumen VI Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compania de Argentina (AVEACA). Pp:176

***D'Amico, G.N.[*]; Adagio, L.M ; Martín, S.; Somoza, J. y Gobello, C.** (2007) **"**Evaluación de una combinación de Gonadotrofina Corionica Equina y Humana en la inducción de ciclos estrales en hembras caninas: resultados preliminares". Resumen VII Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compania de Argentina (AVEACA). pp:161

***D'Amico, G.N.[*]; Adagio, L.M ; Martín, S.; Somoza, J. y Gobello, C.** (2007) Utilización de una combinación de gonadotropina coriónica equina y humana en la inducción de ciclos estrales de la Hembra canina. Resumen Jornadas de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam.

***Adagio, L.; Hierro, J.; Ríos, F.; Lattanzi, D.; García, M.; Amiano, C.; Torres, P.; Wheeler, J.; Corrada, Y.; Gobello, C. (2008).** *"Efecto del citrato de tamoxifeno sobre parámetros seminales,semiológicos del testiculo canino".*Jornadas de Ciencia y Técnica 2008, organizado por la Secretaría de Investigación y Posgrado de la UNLPam.

***Adagio, L.; Hierro, J.; Ríos, F.; Lattanzi, D.; García, M.; Amiano, C.; Torres, P.; Wheeler, J.; Corrada, Y.; Gobello, C.(2009),** *"Efectos del citrato de Tamoxifeno sobre los parámetros semiológicos del testículo del perro".* VI Jornadas de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UNLPam. Modalidad oral.

***Adagio, L.; Hierro, J.; Ríos, F.; Lattanzi, D.; García, M.; Amiano, C.; Torres, P.; Wheeler, J.; Corrada, Y.; Gobello, C. (2009)** *"Efecto del citrato de tamoxifeno sobre parámetros seminales epididimarios en caninos"*. IX Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios Espercializados en Animales de Compañía de Argentina (AVEACA). Premio al mejor trabajo científico. Pp:160

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Adagio, L.; Wheeler, J. T; D'Amico, G.; Hierro, J.; Lattanzi, D; Corrada, Y.; Gobello, C. "Efectos del antiestrogeno citrato de tamoxifeno en parametros seminales, semiológicos y ecográficos del testiculo del perro". Cátedra de Clinica de Pequeños Animales de la Fac. de Cs. Veterinarias de la UNLPam

Adagio, L.; Wheeler, J. T; D'Amico, G.; Hierro, J.; Lattanzi, D; Corrada, Y.; Gobello, C. "Efectos del antiestrogeno citrato de tamoxifeno en parametros histológicos del testiculo del perro". Cátedra de Clínica de Pequeños Animales de la Fac. de Cs. Veterinarias de la UNLPam

Wheeler, JT.; Torres, P.; Audisio, S.; Vaquero, P.; Verna, E.; D'Amico, G.; Adagio, L.; Hierro, J.; Maria, A.; Sanfilipo, S.; Meder, A.; Galeano, M.; Lattanzi, D. "Evaluación del efecto de la resección quirúrgica de tumores mamarios caninos sobre el tiempo de sobrevida libre de enfermedad y general". Cátedras de Clínica de Pequeños Animales y Técnica y Patología Quirúrgica de la Fac. de Cs. Veterinarias de la UNLPam.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

6.1.1 Problema:

Se desconoce la utilización de nuevas drogas con efecto antiandrogéno con fines contraceptivos y terapéuticos.

6.1.2. Objetivos:

a) Objetivo General

Contribuir al conocimiento de nuevos grupos farmacológicos con efecto antiandrógeno en caninos machos.

b)Objetivos Específicos

* Describir el efecto clínico, seminal, endocrino e histológico reproductivo del antagonista del GnRH de tercera generación, azaline B sobre el testículo canino.

6.1.3. Hipótesis

Los antagonistas de GnRH producen efectos endocrinos, seminales e histológicos sobre el aparato genital canino que podrían ser de utilidad para el control de la fertilidad y el manejo de enfermedades hormonodependientes en la especie.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

Animales

Se estudiarán 9 perros mestizos, clínicamente sanos, de entre 20 y 25 kg y 2 a 4 años, provenientes de la Canilera Municipal de la Sociedad Protectora de Animales de la ciudad de General Pico, La Pampa. Los perros serán ubicados en caniles experimentales 2 meses antes de iniciado los estudios para su adaptación, desparasitación y vacunación. Tambien, se les realizará 4 espermogramas pretratamientos para evaluar si son aptos desde el punto de vista reproductivo para ingresar al experimento. Los animales se alimentarán con balanceado superpremium (Royal Canin®, Argentina) y se les proporcionará agua *adlibitum*

En día 0 de tratamiento los perros serán aleatoriamente ubicados en uno de los siguientes protocolos terapéuticos:

-Azaline B (donado por The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA) 375 µg/kg sc (AZA; n=6).

-Placebo (PLA [n = 3]).

Examen testicular y libido

Durante el experimento se evaluarán quincenalmente la consistencia (blanda, tenso-elástica y firme) testicular y la libido. La libido se evaluará subjetivamente con una escala de 0 a 3 (0: sin erección, ni eyaculación; 1-2: graduaciones intermedias; 3: movimientos de empuje vigorosos, erección y eyaculación rápida), durante la estimulación manual para la recolección de semen.

Espermogramas

Con el semen recolectado manualmente (Johnston, 1991), se realizarán espermogramas cada quince días. Se evaluará volumen y pH de la segunda fracción del eyaculado, el porcentaje de espermatozoides mótiles y el vigor (0-5) a 400x. Se determinará el porcentaje de espermatozoides vivos mediante la coloración supravital de eosina – nigrosina y la concentración de espermatozoides se realizará con cámara de Neubauer mejorada. La morfología se examinará en una muestra coloreada con rosa de bengala al 3% en agua destilada bajo inmersión (1000x) en 200 espermatozoides. Se contará el porcentaje de esperma con morfología normal y con anormalidades primarias y secundarias.

Determinación de testosterona sérica

A la totalidad de los animales, en forma quincenal se les extraerá sangre por venopunción periférica para la determinación de testosterona sérica. Las muestras obtenidas se centrifugaran por 15 minutos y se guardaron a -20°C hasta su procesamiento. La testosterona se determinará mediante la técnica de radioinmunoensayo comercial de fase sólida (Coat-A-Count, DPC®, Los Angeles,USA)

Orquiectomías unilaterales

Los animales serán anestesiados con una combinación de maleato de acepromazina (5 a 1,1 mg/kg, Acedan®, Holliday, Buenos Aires), diazepan (0,5 mg/kg., Valium®, Roche, Buenos Aires) y ketamina (20 mg/kg, Ketamina 50®, Holliday, Buenos Aires) vía endovenosa y se procederá a la realización de orquiectomías unilaterales (Boothe, 1993) según el cronograma quirúrgico de la **Tabla 1.** En cada animal se realizará la orquiectomía derecha, en primer orden, y en segundo término la izquierda.

Tabla 1: Cronograma quirúrgico de las orquiectomías unilaterales. OD= Orquiectomía derecha. OI = Orquiectomía izquierda

	Día -15	**Día 0**	**Día 15**	**Día 30**	**Día 45**	**Día 60**
Perro 1	OD	Azaline		OI		
Perro 2	OD	Azaline			OI	
Perro 3		Azaline	OD	OI		
Perro 4		Azaline	OD		OI	
Perro 5		Azaline	OD			OI
Perro 6		Azaline		OI		OI
Control	OD	Placebo				OI
Control		Placebo	OD		OI	
Control		Placebo		OD		OI

Examen microscópico de los testículos y observación de los espermatozoidesepidimales

De los testículos extraídos se recuperarán los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo seccionándola en forma longitudinal con hoja de bisturí y recogiendo el material exudado en un portaobjeto atemperado en platina térmica. Se evaluará la motilidad y vigor de los espermatozoides recuperados a 200x. Se evaluará porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides normales con la coloración supravital de eosina-nigrosina y la coloración de rosa de bengala, respectivamente (England y Allen, 1989). Para ambos propósitos se evaluaran un mínimo de 200 espermatozoides por preparado.

Estudio histopatológico

Los testículos extraídos serán cortados en una sección longitudinal y posteriormente se tomarán muestras de tejido de 0,5 cm x 0,5 cm de tamaño. Se fijarán en solución de Bouin por 24 horas. Luego se procesarán según la técnica establecida por Olson (1991).

En los cortes histológicos se observarán un mínimo de 20 campos microscópicos a 125x. La caracterización del ciclo seminal se basará en el examen de los túbulos seminíferos, mediante el registro de los tipos y estratificación de las células espermatogénicas que forman parte de la estructura tubular (espermatogonias, espermatocitos I y II, espermátides redondas y elongadas, espermatozoides en la luz del túbulo y células de Sértoli) a 400x y 1000x. De un mínimo de 20 cortes transversales de túbulos seminíferos por preparado, se medirá el diámetro tubular y la altura del epitelio seminal de acuerdo a lo establecido por Celan de Basi y col. (1984). También se registrará la presencia de divisiones meióticas. En el tejido intersticial se evaluará la existencia de células de Leydig. Para el recuento los elementos celulares se establecerán tres categoría: 1:escasa cantidad; 2: moderada cantidad; : abundante cantidad)

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se analizarán mediante un test de ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo considerando como variable intrasujeto el día (-15, 15, 30, 45 y 60). En aquellas variables estudiadas en semen eyaculado y epididimario (porcentajes de motilidad, viabilidad y morfoanomalías) se calculará el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los resultados obtenidos en ambas muestras. Las variables cualitativas se analizarán por Chi2. En todos lo casos el nivel de significancia se fijará en $P<0.05$

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

A nivel mundial en los últimos 10 años se vienen presentando dos situaciones problemáticas, por un lado el aumento de la población canina y por el otro el aumento de la cría de perros de raza. Los controles de la sobrepoblación canina son actualmente insuficientes (Jochle, 1974). A pesar de que la gonadectomía es el método más efectivo para este fin, tiene el inconveniente de ser irreversible, lo que la hace inaceptable, muchas veces, para perros con propietarios y/o de raza usados para cría. Con la intención de mejorar esta situación se desarrollará nuevos protocolos terapéuticos de contracepción canina eficientes, seguros, rápidos, no invasivos y reversibles optimizando significativamente el control de la reproducción.

Por otro lado, debido al creciente aumento de la cría de perros de raza como emprendimiento productivo, los profesionales nos vemos obligados a optimizar la eficiencia reproductiva en esta especie. Por lo anteriormente expuesto, resulta de utilidad probar distintos protocolos terapéuticos usados durante años en esterilidad humana que permitan potencialmente mejorar este aspecto en los caninos.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

AÑO 2010

tipo de actividad	**mes 1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Recopilación bibliográfica	X	X	X	X	X							
Adaptación y sanidad de los animales experimentales			X	X	X							
Comienzo de los protocolos experimentales y toma de muestras						X	X	X	X	X	X	X
Eventual reporte de datos preliminares en reuniones científicas											X	X

Año 2011

tipo de actividad	**mes 1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Finalización de los protocolos experimentales y toma de muestras	X	X	X			
Procesamiento, y análisis estadístico de los datos obtenidos				X	X	X	X

Elaboración y presentación del informe final	X X

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

La Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam, presenta una infraestructura edilicia de canileras, quirófano y laboratorios necesarios para el tratamiento y estudios histológicos de los perros.
La Cátedra de Pequeños Animales de FCV-UNLPam dispone del equipamiento informático necesario para el procesamiento de texto, análisis estadístico, graficación de datos científicos y otras tareas electrónicas necesarias para la realización del presente Plan como así también para la búsqueda de información en bases de datos bibliográficas biológicas on line como Medline. A través de la página web de la biblioteca de UNLPam, se puede acceder a la base de datos EBSCO y a la Biblioteca de SECYT de la Nación.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

*Reparación de las 6 canileras existentes en la UDEP.
*Material de vidrio para laboratorio.
*Colorantes: Hematoxilina-eosina.
*Alcohol 100, solución de Bouin, xilol, bálsamo de canadá
*Anestésicos y tranquilizantes.
*Material para cirugía.
*Material descartable.

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual) *

Año 2010:	
Equipamiento e Infraestructura	**$ 1500,00**
Bienes de Consumo	**$ 1200,00**
Bibliografía	**$ 1000,00**
Viajes	**$ 1300,00**
Personal de Apoyo	**$ 900,00**
Otros (Cursos de posgrados)	**$ 1000,00**
Total	**$ 6.900,00**
Año 2011	
Equipamiento e Infraestructura	**$ 500,00**
Bienes de Consumo	**$ 1000,00**
Bibliografía	**$ 500,00**
Viajes	**.$ 1500,00**
Personal de Apoyo	**$ 200,00**
Otros (Cursos de posgrados)	**$ 1000,00**
Total	**$ 4.700,00**
TOTAL	**$ 11.600,00**

*** El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.**

8.1. BIBLIOGRAFÍA

1. Vickery BH, Mc Rae GI, Goodpasture JC, Sanders LM. Use of Potent LHRH Analogues for Chronic Contraception and Pregnancy Termination in dogs. J Reprod Fertil. 1989; 39:175-187.
2. Padula, A.M. GnRH analogues-agonists and antagonists. Anim Reprod Sci 2005; 88:115-126.
3. Vickery BH. Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. J. Steroid. Biochem. 1985; 23(5B): 779-791.
4. Heber D, Dobson R, Swerdloff RS, Channabasavaiah K, Stewart JM. Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin-releasing antagonist in vivo: mechanism of action. Science 1982; 216:420-421.
5. Herbst KL. Gonadotrophin releasing hormone antagonists. Current Opinion in Pharmacology 2003; 1-7.
6. Vickery BH, Nestor JJ. LHRH analogues, development and mechanism of action Sem Reprod Endocrinol. 1987; 5: 353-370.

7. Gobello, C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. Theriogenology 2006; 66(6):1560-1567.

8. Herbst KL, Coviello AD, Page S, Amory JK, Anawalt BD, Bremmer WJ. A single dose of the potent GnRH antagonist Acyline suppresses gonadotrophins and testosterone for 2 weeks in healthy young men. J. Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(12):5959-5965.

9. Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Galassi Gerez P, Gobello C. Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular characteristics. Theriogenology 2007; 15; 68(5): 687-692.

10. Valiente C, García Romero G, Corrada Y, de la Sota PE, Hermo G, Gobello C. Estrous cycle interruption with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline, in bitches. Theriogenology 2009a; 71: 408-411.

11. Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Blanco P, Arias D, Gobello C. Comparison of two doses of the GnRH antagonist, acyline, for pregnancy termination in bitches. Reprod Dom Anim. 2009b: En prensa.

12. García Romero G, Valiente C, Aquilano D, Corrada Y, Gobello C. Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. Theriogenology. 2009;71:1234-1237.

13. Gobello C. New GnRH analogs in canine reproduction: A review. Anim Reprod Sci. 2007;100(1-2):1-13.

14. Campen CA, Lai MT, Kraft P, Kirchner T, Phillips A, Hahn DW. Rivier Potent pituitary-gonadal axis suppression and extremely low anaphylactoid activity of a new gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor antagonist "azaline B". J Biochem Pharmacol. 1995; 11; 49(9):1313-1321.

15. Johnston, SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. Vet Clin North Am (Small Anim Practice) 1991; 21(3): 545-551.

16. Boothe, H. Testes and Epididymies. En: Slatter, D (ed) Textbook of small animal surgery, Saunders RW, Philadelphia, USA. 1993; 1331-5.

17. England, G, Allen, W. Seminal characteristics and fertility in the dog. Vet Rec. 1989; 125: 399.

18. Olson, PN. Clinical approach for evaluating dogs with azoospermia or aspermia Vet Clin. North Am (Small Anim Pract) 1991; 13: 591-08.

19. Celan de Bassi, MS.; Fernández Surribas, J.; Von Lawzewitsch. Lecciones de histología veterinaria.Argentina: Ed. Hemisferio Sur 1984; 1:12.

20. Jochle, W. (1974). Pet population control: chemical methods. Can. Pract. Sept-Oct: 10-18.