

# Contraccezione reversibile negli animali di compagnia



La castrazione chirurgica è stata storicamente la metodica più utilizzata per controllo del randagismo, della fertilità e del comportamento sessuale o la modificazione del ciclo estrale. L'incremento del numero di animali da compagnia, di soggetti da riproduzione e l'evoluzione della conoscenza scientifica hanno tuttavia fatto sì che si studiassero soluzioni alternative alla chirurgia, procedura non scevra da rischi e irreversibile. In passato, la terapia medica più utilizzata nei pets per il controllo della riproduzione si è basata sull'uso dei progestinici. Il loro largo utilizzo ha fatto emergere numerosi effetti avversi tanto nei maschi quanto nelle femmine. Ricerche più recenti hanno messo in evidenza nuovi farmaci quali gli agonisti dell'ormone di rilascio della gonadotropina (GnRH). Nelle specie sensibili al fotoperiodo, quali ad esempio i gatti, anche la melatonina ha mostrato risultati promettenti.



Luis Ferré-Dolcet\*  
MedVet, MSc, PhD, Dipl  
College Europeo ECAR  
Clinica e Laboratorio  
Veterinario San Marco,  
Padova, Italia



Maria Carmela Pisu  
MedVet, Dipl College  
Europeo ECAR, VRC  
Centro di Riferenza  
Veterinario,  
10138 Torino, Italia

## MOLECOLE “STORICHE”

### 1. Progestinici

Essendo analoghi sintetici del progesterone (P4), questi farmaci agiscono creando un feedback negativo a livello ipotalamico inibendo direttamente il rilascio di GnRH e, di conseguenza, la produzione e il rilascio delle gonadotropine ipofisarie LH e FSH<sup>1</sup>. Nella femmina causano quindi l'inibizione del ciclo estrale e nel maschio la soppressione della spermatogenesi come conseguenza del blocco della secrezione di testosterone. L'effetto del farmaco è reversibile alla fine della sua somministrazione e la molecola è stata altamente utilizzata dagli allevatori.

La somministrazione prolungata o con dosaggio non corretto di progestinici può portare a effetti collaterali negativi su molti organi.

Gli effetti collaterali segnalati per i progestinici includono: iperplasia endometriale, iperplasia mammaria, diminuzione della secrezione di cortisolo, incremento nella secrezione di prolattina e dell'ormone della crescita ed

**Storicamente le molecole più utilizzate per sospendere l'attività sessuale sia nel maschio che nella femmina sono state i progestinici, le molecole però presentano effetti collaterali anche importanti.**

incremento di peso per aumentato appetito. I progestinici possono anche causare diabete o intolleranza al glucosio poiché il progesterone causa insulino-resistenza nei tessuti periferici e produzione epatica di glucosio<sup>2</sup>, xantomatosi

cutanea e cecità dovuta a iperlipidemia che causa opacità della camera anteriore.<sup>3</sup>

### 1.1 Progestinici nel gatto

Nel gatto maschio i progestinici, oltre ad indurre il controllo della spermatogenesi, hanno effetto sulla soppressione dei comportamenti legati agli steroidi sessuali maschili quali il rooming, le marcature urinarie, l'odore acre dell'urina. In letteratura è riportato anche un miglioramento del comportamento sociale tra soggetti maschi conviventi.<sup>4</sup>

**Nel gatto maschio i progestinici sono stati utilizzati per il controllo della spermatogenesi, e per evitare comportamenti indesiderati sessualmente; nella gatta per interrompere o posticipare l'estro.**

I progestinici sono stati ampiamente utilizzati anche nella femmina per la celere reversibilità dell'azione terapeutica. L'azione di feedback negativo sull'ipotalamo mima la soppressione del ciclo che si ha durante il diestro fisiologico. A seconda della molecola utilizzata, la durata dell'effetto è diversa. Ad oggi sono regolarmente registrati prodotti con necessità di somministrazione giornaliera, farmaci con durata d'azione media ed impianti con durata di circa un anno.

I progestinici comunemente utilizzati nei gatti includono il megestrolo acetato (MA), il medrossiprogesterone acetato (MPA) ed il proligestone (PRG).

- Megestrolo acetato (MA): è considerato come un progestinico sintetico con una attività maggiore del P4 endogeno, presenta una affinità del 75% con i recettori degli androgeni ed un 37% ai recettori dei glucocorticoidi. Questo principio attivo ha una durata d'azione corta ed un'emivita di poche ore. Nelle gatte può inibire l'attività del ciclo estrale e dunque l'ovulazione se utilizzato a 2,5 mg/settimana (approssimativamente 0,625 mg/kg/settimana per una gatta di 4kg) per una durata di 30 settimane.<sup>5</sup> Durante i trattamenti prolungati con megestrolo acetato si sono riscontrati effetti collaterali quali incremento di peso, letargia, proliferazione del tessuto mammario, sviluppo di tumori mammari, piometra e diabete mellito.<sup>6</sup>
- Medrossiprogesterone acetato: è considerato un progestinico di lunga durata con un'emivita di 12-17 ore quando è somministrato per via orale, mentre di 40-50 giorni quando somministrato per via intramuscolare. Questo prodotto presenta un'affinità minore del megestrolo acetato per i recettori androgenici e dei glucocorticoidi. È probabilmente per questo motivo che gli effetti diabetogeni sono meno de-

scritti, anche a dosi più alte. Diversi case reports indicano che quello mammario è il primo tessuto extra gonadico in cui il medrossiprogesterone acetato mostra effetti secondari, soprattutto ad alte dosi, provocando iperplasia e incrementando dunque il rischio di tumori.<sup>5</sup>

- Proligestone: è usato nei gatti come contraccettivo per la sua azione antigonadotropica che inibisce la secrezione di LH (1). Nel gatto il dosaggio riportato negli ultimi lavori è di 25-30 mg/kg ogni 5 mesi.<sup>5</sup> Questa molecola presenta un'attività progestinica meno potente rispetto alle precedenti, per questo motivo gli effetti avversi su tessuto endometriale e mammario sono stati osservati molto raramente.<sup>1</sup>

### 1.2 Progestinici nel cane

Nel cane i progestinici hanno trovato utilizzo fondamentalmente per la posticipazione del ciclo estrale nella cagna. Il trattamento viene iniziato, solitamente, ai primi segni del proestro. Fra tutti i progestinici in commercio quelli più utilizzati nella cagna sono il proligestone, il megestrolo acetato e il medrossiprogesterone acetato.

- Il proligestone è attualmente considerato un progestinico sintetico di terza generazione a cui sono associati minimi effetti collaterali.<sup>7</sup> Per un corretto funzionamento del farmaco, questo dovrebbe essere somministrato in anaestro o durante i primi giorni del proestro. La sua efficacia durante l'estro pieno è infatti controversa. Quando la molecola è somministrata durante il proestro, è indispensabile, tuttavia, che la femmina sia tenuta lontana dal maschio perché nel caso di monta vi è probabilità di concepimento con successiva normale gravidanza. Per indurre inibizione prolungata dell'estro, il prodotto viene somministrato per via sottocutanea con dose compresa fra 10 e 30 mg/kg ogni 4-5 mesi.<sup>9,10</sup> Non tutte le cagne rispondono al trattamento con proligestone.<sup>10</sup>
- Il megestrolo acetato è un progestinico sintetico somministrato per via orale ai primi segni di calore<sup>11</sup> con una durata di azione corta. La posologia è di 0,55 mg/kg al giorno per una durata minima di 32 giorni e massima di 40 giorni<sup>12</sup> anche se una dose di 0,01-0,05 mg/kg per 32 giorni ha dimostrato risultati simili con effetti collaterali minimi<sup>13</sup>. L'uso più corretto del trattamento con megestrolo acetato prevede che la som-

**Il Megestrolo acetato è un potente progestinico di sintesi di breve durata mentre il Medrossiprogesterone acetato: è considerato un progestinico può arrivare a emivita di 50 giorni e il poligestone ha azione meno potente. Tutti possono avere importanti effetti collaterali.**

ministrazione avvenga una settimana antecedente i primi segni di calore: in tal modo si previene il successivo estro per circa 5 mesi nel 90% delle cagne<sup>11</sup>.

Nel caso del cane maschio questo prodotto non riesce a diminuire significativamente né il comportamento sessuale né la qualità del seme.<sup>14</sup>

- L'acetato di medrossiprogesterone, a differenza dei precedenti progestinici, è considerato un progestinico di lunga permanenza quando viene utilizzata la formulazione iniettabile al dosaggio di 2-3 mg/kg con applicazioni ripetute ogni 3-5 mesi.<sup>5</sup> Nel caso in cui il farmaco sia somministrato per via orale la dose sarà di 1-2 mg/kg per 4 giorni seguita da 0,5-1 mg/kg per i successivi 12 giorni. La durata di azione del farmaco è molto variabile e comprende un periodo fra 1,5 e 26 mesi.<sup>15</sup> L'incidenza di effetti collaterali è più alta nell'uso di questo progestinico per cui la sua somministrazione non dovrebbe essere fatta di routine.<sup>6</sup> Gli effetti avversi sono più frequenti con la somministrazione orale; la metabolizzazione epatica del MPA è infatti molto più lenta se comparata con il MA che presenta una durata più corta. Inoltre, il MPA presenta un'affinità molto più forte ai recettori di progesterone e glucocorticoidi in comparazione al proligestone. L'impiego del MPA deve essere fatto durante l'anestro e mai per più di due anni.

**Nella specie canina i progestinici sono stati utilizzati soprattutto per la posticipazione del ciclo estrale nella cagna mentre nel maschio non hanno dimostrato efficacia.**

Nel cane maschio, invece, il MPA viene utilizzato a dosaggi di 20 mg/kg e determina soltanto alterazioni nella qualità seminale a partire da una settimana dopo l'inizio della terapia. La durata di questo effetto è più o meno di 8 settimane e non produce modificazioni del comportamento sessuale come, per esempio, alterazione della libido.<sup>14</sup>

L'acetato di demadinone (DMA) e l'acetato di chlomidone (CMA) sono meno utilizzati; si tratta di progestinici sintetici con una azione simile a quella del MPA. Il loro effetto ha una durata approssimativa di 8 mesi per il DMA e fino 2 anni con il CMA. La somministrazione può essere ripetuta con dosi di 1-2 mg/kg ogni 4 mesi.<sup>15</sup>

Purtroppo, in letteratura non esistono studi sull'interazione di questa due molecole nel cane maschio.

## 2. Androgeni

L'uso di androgeni nella femmina ha l'effetto di simulare l'azione progestinica creando dunque un feedback negativo nell'asse ipotalamo-pituitario.<sup>16</sup> L'impiego di que-

ste molecole può causare un certo grado di mascolinizzazione che si evidenzia con iperplasia clitoridea, incremento dell'aggressività o della massa muscolare<sup>17,19</sup> ma non si ha nessun tipo d'effetto a livello endometriale o ovarico.

**Anche gli androgeni sono stati utilizzati per bloccare l'attività sessuale nel cane ma gli effetti collaterali sono importanti.**

Essendo uno steroide con forte metabolizzazione epatica, tutte le cagne con problemi epatici non dovrebbero essere trattate con androgeni. Da ciò deriva che prima di qualsiasi trattamento la funzionalità epatica deve essere controllata tramite esame emato-biochimico. Tra gli androgeni utilizzati annoveriamo il miborelone ed il testosterone.

Il trattamento con mibolerone prevede la somministrazione per via orale ad una dose di 16 µg/kg SID con inizio più o meno 30 giorni prima dell'estro successivo e non per più di due anni di seguito.<sup>19</sup> Dalla sospensione del farmaco, la ripresa dell'attività ciclica è molto variabile con un range che va da 1 a 7 mesi con una media di 2 mesi.<sup>18</sup> Nel caso dell'uso di propionato di testosterone, la dose raccomandata è di 25 mg/kg una volta al mese tramite iniezione intramuscolare. La somministrazione per via orale dovrebbe essere giornaliera, a un dosaggio di 0,25-0,5 mg/kg o settimanale a 25 mg/cane. Il periodo di anestro osservabile può variare fra 12 e 24 mesi.

L'uso di androgeni nei maschi, causa un peggioramento della qualità seminale, reversibile dopo 60 giorni dalla fine della somministrazione.<sup>14,20</sup>

## Le molecole dei giorni nostri

Negli ultimi decenni gli studi si sono concentrati nella ricerca di nuovi farmaci e protocolli per poter garantire la massima efficacia ed efficienza (minimi rischi per la salute e la fertilità dei soggetti).

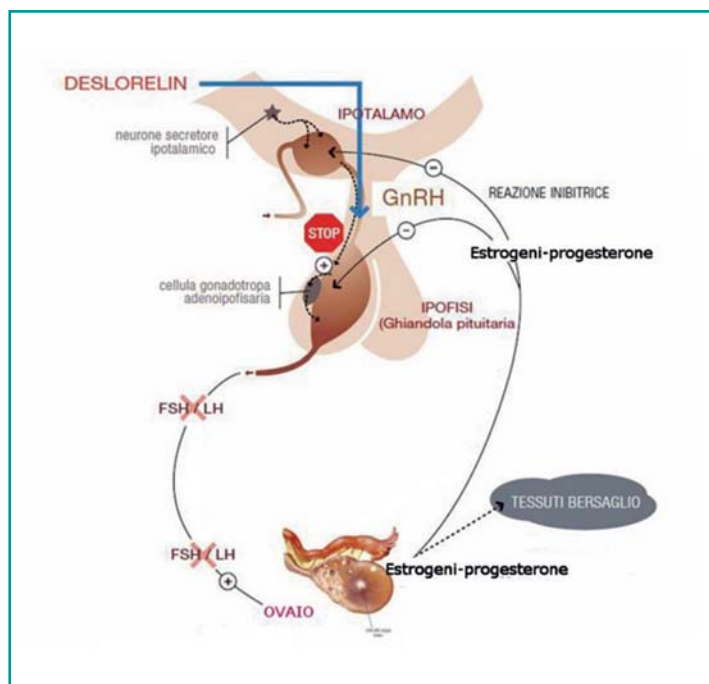
## 3. Agonisti del GnRH

Gli agonisti del GnRH hanno assunto un'importanza rilevante nelle ultime due decadi per il controllo della riproduzione. I più utilizzati sono la deslorelina e l'azagly-nafarelin.

### 3.1 Impianti di deslorelina

Gli agonisti del GnRH si legano ai recettori ipofisari del GnRH causando un rilascio prolungato di LH e FSH seguito da una desensibilizzazione dei loro recettori e la conseguente interruzione di secrezione (Fig. 1)

La deslorelina (p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NH<sub>2</sub>) è un analogo sintetico del GnRH, con una



**Figura 1** - Schema di attività della deslorelina: il suo legame con i siti recettoriali blocca la secrezione di FSH e LH e di conseguenza l'attività gonadica (ovaie nella femmina e testicoli nel maschio).

affinità recettoriale a livello ipofisario e una attività sette volte superiore rispetto all'ormone nativo. La molecola ha una struttura chimica creata partendo dalla molecola endogena a cui sono state cambiate due sequenze aminoacidiche (Fig. 2). La deslorelina è attualmente commercializzata in diversi Paesi, in tutto il mondo, ed è impiegata in cani maschi adulti e furetti; pochi mesi fa una tavola rotonda tra i più grandi esperti europei ha ratificato la registrazione della molecola per l'utilizzo nei gatti maschi e nelle cagne prepuberi (12- 16 settimane d'età). L'impiego corretto della deslorelina, anche se off-

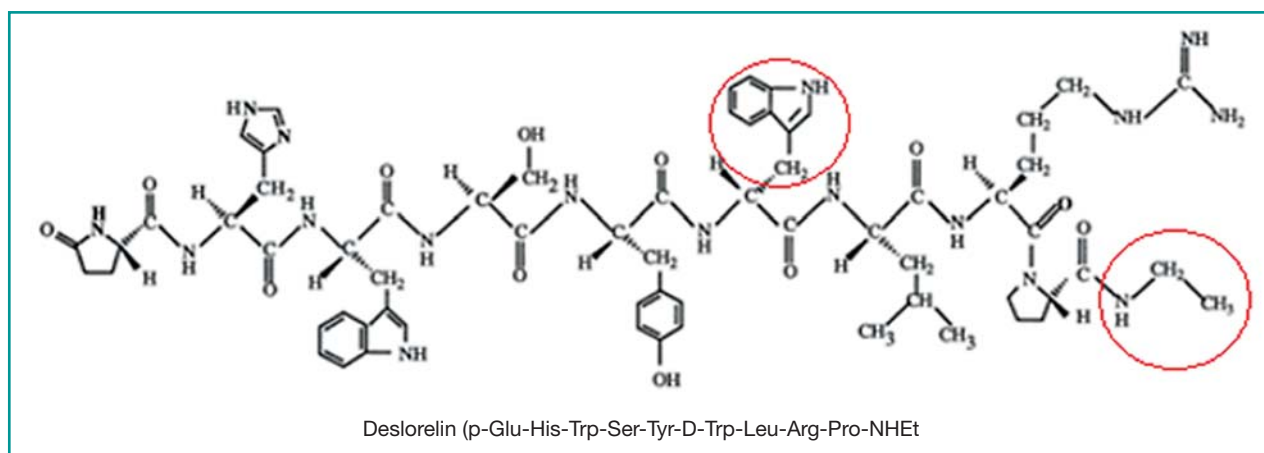
label, in femmine di gatti e cani presenta delle opportunità molto utili per la gestione della riproduzione.

Attualmente sono disponibili due impianti con dosaggi 4,7 mg e 9,4 mg (Suprelorin, Virbac, Carros, Francia). (Fig. 3) Questi impianti presentano una ottima tolleranza locale grazie alla composizione lipidica biocompatibile.<sup>21,24</sup> Inizialmente la casa produttrice consigliava di inserire gli impianti nella zona interscapolare, tuttavia, la loro difficile rimozione da questa sede, ha spinto all'utilizzo di altre aree, tra cui la periombelica o il piatto interno della coscia. (Video 1a e 1b). La pratica dell'inserimento dell'impianto contraccettivo nel piatto interno della coscia nella specie felina è sempre più diffusa, specialmente nei casi in cui l'impianto debba essere rimosso prima del termine del suo effetto. La rimozione dell'impianto è una procedura relativamente semplice ma può tuttavia divenire più complessa qualora l'impianto sia circondato da grasso addominale che si attacca alla sua matrice, ciò potrebbe renderlo friabile e facile a rompersi durante l'operazione. La permanenza nel tessuto sottocutaneo anche solamente di un piccolo residuo di impianto può prolungare l'effetto della deslorelina.<sup>22</sup>

### 3.2.1 Deslorelina nei cani maschi

Nei maschi il rilascio prolungato di gonadotropine provoca un aumento della secrezione di testosterone che può durare da pochi giorni a 1-2 settimane ed è indicato come «effetto flare-up».<sup>25</sup> Già un'ora dopo l'applicazione dell'impianto si può osservare un incremento nella secrezione di testosterone che ritornerà a livelli pre

**Tra i nuovi farmaci che sono stati valutati nell'ultimo ventennio la deslorelina la fa da padrone in tutte le specie anche se è a oggi registrata solo per il cane maschio, il furetto, il gatto maschio e la cagna prepubere.**



**Figura 2** - Struttura chimica del deslorelin. I cerchi rossi indicano le sequenze aminoacidiche che differiscono dal GnRH endogeno. I cambiamenti nella sequenza chimica hanno 2 principali effetti: maggior affinità di legame ai recettori ipofisari, aumentata potenza.





**Video 1a**  
Inserimento dell'impianto di deslorelina nel  
piatto interno della coscia in un cane.  
<https://www.scivac.it/it/v/24681/1>



**Video 1b**  
Inserimento dell'impianto di deslorelina nel  
piatto interno della coscia in un cane.  
<https://www.scivac.it/it/v/24681/2>

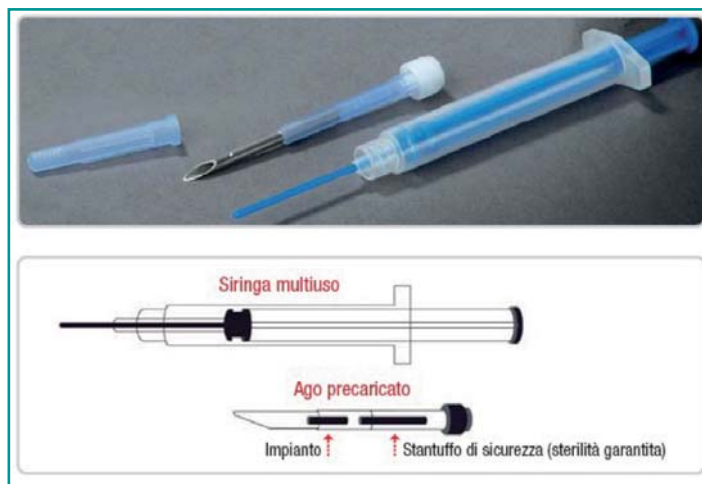
applicazione circa quattro ore dopo.<sup>26</sup> Un recente studio ha dimostrato che successivamente all'incremento sierico di testosterone, lo stesso non è più rilevabile dopo il settimo giorno post applicazione, anche se alcuni soggetti dimostravano ancora valori non basali di testosterone fino al giorno 28 post applicazione.<sup>26</sup> L'aumento della secrezione di testosterone provoca un temporaneo miglioramento della qualità dello sperma che viene mantenuto per tutto il primo mese dopo il trattamento (correlato al "flare up effect") e ciò, nonostante la downregulation dei recettori GnRH e la riduzione della concentrazione di testosterone fino a valori basali già durante il primo mese post-trattamento.<sup>27,28</sup> La sterilità completa può essere raggiunta fino a 72 giorni dopo l'impianto. La durata dell'efficacia degli impianti di 4,7 mg e 9,4 mg nel cane è stata riportata di un minimo di 180 e 400 giorni rispettivamente.<sup>29</sup> La durata degli impianti da 4,7 mg è stata riportata variabile a seconda del peso corporeo dell'animale: fino a 420 giorni in cani di peso inferiore ai 10 kg e fino a 290 giorni in cani di taglia superiore a 25 kg.<sup>29</sup>

**La deslorelina nel cane maschio determina una castrazione chimica reversibile della durata di almeno 6 mesi.**

La riduzione dell'attività endocrina a livello testicolare determina una riduzione del volume e della consistenza, apprezzabili alla visita clinica. Questi effetti sono gradualmente dal momento di attività dell'impianto fino alla fine dell'efficacia.

Nel cane maschio si è osservata una riduzione del volume testicolare pari al 65% della dimensione iniziale percepibile a 56 giorni post applicazione. Si evidenzia anche una riduzione del volume prostatico del 73% e del 82% rispettivamente a 63 e 147 giorni.<sup>26,30</sup>

Alla fine dell'efficacia del farmaco, o dopo sua rimozione, in circa 20 giorni si assiste a testosteronemia che torna nella norma e, dopo circa 65 giorni dalla ripresa



**Figura 3** - Impianto di deslorelina, l'impianto si trova all'interno dell'ago sterile e viene spinto da uno stantuffo di sicurezza in plastica sterile, contenuto sempre all'interno dell'ago.

dell'attività corretta secernitrice il cane torna fertile. Importante il fatto che prima della fine dell'effetto terapeutico sia possibile reimpiantare il farmaco sommando la durata dell'efficacia, e che questa procedura può essere ripetuta più volte senza controindicazioni. È stata notata però una diminuzione del tempo di permanenza della deslorelina negli impianti successivi.

### 3.2.2 Deslorelina nei gatti maschi

Nei gatti maschi trattati con un impianto di deslorelina da 4,7 mg i livelli di testosterone diminuiscono rapidamente verso il 20° giorno dopo l'inserimento, rimanendo a livelli basali (inferiori a 0,1 ng/ml) per periodi prolungati con una media di  $15 \pm 3$  mesi.<sup>31</sup> Tuttavia, esiste un'elevata variabilità individuale nella risposta al trattamento e la durata dell'efficacia può essere evidenziata in 9 mesi e fino a 38 mesi.<sup>32</sup> L'uso dell'impianto di deslorelina da 9,4 mg ha causato la mancanza di secrezione di testosterone per una media di 805 giorni (intervallo di 750-850 giorni). La riduzione del volume testicolare è del 50% a 3 mesi con l'impianto di 4,7mg<sup>22</sup> e del 60% a 12 mesi con l'impianto di 9,4mg.<sup>28</sup> Parallelamente alla diminuzione del volume testicolare e della qualità dello sperma, anche le spicole del pene scompaiono completamente rispettivamente a  $14 \pm 5$  settimane.<sup>27,28,33,36</sup> Si tratta in tutti i casi di effetti reversibili e dunque ripristinati completamente dopo la fine del trattamento o dopo la rimozione dell'impianto.<sup>4,22,27,34,36</sup> Dal momento della rimozione dell'impianto, la rinnovata secrezione di

**La deslorelina determina nel gatto maschio una castrazione chimica reversibile della durata variabile, in media  $15 \pm 3$  mesi.**

testosterone può essere osservata dopo 23 giorni nel caso di impianto deslorelina da 4,7 mg nei gatti maschi.<sup>22</sup> Dalla ripresa della secrezione testosteronica corretta bisogna poi attendere almeno 60 giorni per osservare iniziale fertilità vista la durata del ciclo spermiogenico nel gatto.

### 3.2.3 Uso della deslorelina nella femmina

#### 3.3.1 Uso della deslorelina nella cagna

La criticità nell'uso della deslorelina nella femmina si manifesta nella secrezione di gonadotropine indotta in prima battuta: durante l'effetto denominato "flare up" condurrà all'induzione di una fase estrale entro la prima settimana post applicazione nelle cagne in anestro.<sup>8,37,40</sup> Per impedire l'induzione di un calore si è tentato di inserire l'impianto di deslorelina durante la fase diestrale, quando gli alti livelli di progesterone dovrebbero essere sufficienti ad impedire le manifestazioni estrali. È stato dimostrato che a volte è possibile indurre una fase estrale anche in diestro. È dunque difficile evitare, nella cagna femmina, lo sviluppo del complesso iperplasia endometriale cistica - piometra per l'effetto concomitante del progesterone e gli estrogeni.<sup>41</sup> Nella maggior parte delle cagne (75%) che vengono sottoposte ad impianto durante la fase anaestrale, l'ovulazione avverrà approssimativamente 12 giorni post impianto (range 8-16 giorni).<sup>37,40,42,43</sup> Nel 25% delle soggette però non si ottiene ovulazione spontanea post impianto.

**Nella cagna femmina la deslorelina induce un iniziale calore fertile ma se non si rimuove l'impianto sono possibili effetti collaterali duraturi.**

Se durante la fase di flare up, la cagna dovesse accoppiarsi è possibile l'instaurarsi di una gravidanza, tuttavia, la soppressione di secrezione di LH, causata dall'impianto, causerà un aborto verso il giorno 40 di gravidanza.

A seguito dell'estro indotto sono stati riportati possibili effetti collaterali quali estro permanente e formazioni di cisti ovariche in circa il 25% delle pazienti, lattazione e cambiamenti comportamentali.<sup>8</sup> In una importante percentuale di casi che presentavano questi effetti collaterali la sterilizzazione chirurgica è stata necessaria.<sup>42,43</sup>

Per gli importanti effetti collaterali segnalati, nella cagna pubere l'utilizzo dell'impianto di deslorelina trova impiego per l'induzione farmacologica dell'estro, con rimozione dell'impianto non appena sono evidenti le prime manifestazioni, ma sconsigliata per l'inibizione del ciclo riproduttivo. Nella cagna prepubere (12-15 settimane), la deslorelina non ha capacità di indurre il flare up e può essere quindi utilizzata per posporre il momento della pubertà.

### 3.2.4 Uso della deslorelina nella gatta

Anche nella gatta l'impianto di deslorelina, ha un effetto *flare up* simile a quello nella cagna e induce solitamente un estro. Nel caso della gatta impiantata in interestro, si riscontrano i primi segni di estro nei primi 2-5 giorni post applicazione e gli stessi scompaiono durante la prima settimana post impianto.<sup>44,46</sup> Nel caso in cui la gatta sia impiantata dopo l'ovulazione, la fase diestrale continua poi direttamente con la fase di anastro indotto, senza però evidenziare una fase di fale up.<sup>47</sup> La durata d'azione degli impianti di 4,7 mg nella gatta sono stati riportati da un minimo di 8 mesi ad un massimo di 38 mesi.<sup>31,32,44,48</sup>

**Anche nella gatta la deslorelina induce un estro fertile ma se l'impianto non viene rimosso la gatta avrà un periodo di riposo sessuale di circa 20 mesi.**

Nel caso degli impianti di 9,4 mg, la durata media nella gatta è stata riportata di  $26 \pm 4$  mesi.<sup>5</sup> La variabilità nel caso della gatta si deve non solo alla razza o al peso corporeo, ma anche probabilmente alla latitudine e/o alla stagione dell'anno in cui l'impianto interrompe il suo effetto.<sup>46</sup> Inoltre, è stata studiata la tempistica di ripresa dopo la rimozione dell'impianto di 4,7 mg nella gatta a 3, 6 e 9 mesi di trattamento osservando primi segni di estro da 3 a 7 settimane a seconda del fotoperiodo in cui l'impianto è stato rimosso.<sup>49,50</sup> Nel caso della gatta, è stata descritta la fibroadenomatosi mammaria legata all'ovulazione indotta dall'impianto così come estri prolungati.

Anche nella gatta l'estro indotto è un estro fertile ma la gatta è in grado di portare avanti la gravidanza sino al parto fisiologico. L'ipotesi principale è che la soppressione della secrezione di LH non sia importante nell'interruzione della gravidanza nella gatta grazie alla produzione placentare di progesterone in questa specie che inizia verso il trentesimo giorno, per cui si è ipotizzato che la deslorelina possa avere un effetto nelle produzioni d'ormoni della pituitaria posteriore.<sup>51</sup>

Anche nella gatta, la ripresa della funzionalità riproduttiva è certa e determina nuova comparsa d'estro, ovulazione, e successive gravidanze.<sup>31,44,47,48,49,50,52</sup>

### 3.3 Altri GnRH agonisti

#### 3.3.1. Acetato di leuprolida

Nel cane maschio, una somministrazione SC di 1 mg/kg causa azoospermia, da 8 settimane post-somministrazione. La ricomparsa di spermatozoi nell'eiaculato si ha dopo 6 settimane dall'inizio dell'azoospermia.<sup>53</sup> Attualmente non esistono altri studi realizzati nella cagna.

**Altri analoghi del GnRH sono stati studiati per l'inibizione temporanea dell'attività riproduttiva ma senza gli effetti desiderati.**

### 3.3.2 Azaghy-nafarelin

Quando utilizzato sotto forma d'impianto di 18,5 mg, il completo silenziamento dell'ipofisi ha una durata di 6-22 mesi nel cane maschio<sup>54</sup> mentre nella femmina la durata di soppressione è di 18-31 mesi.

### 3.3.3 Buserelina

Nel cane maschio, un impianto con 6,6 mg di buserelina inibisce la secrezione di testosterone per  $233 \pm 28.2$  giorni<sup>55</sup>, anche se si evidenzia un peggioramento nella morfologia spermatica già a 16 giorni post-impianto. Tutti questi composti non sono registrati per la soppressione dell'attività riproduttiva nel cane e nel gatto perché mancano ancora studi definitivi su efficacia e sicurezza.

## 4. Melatonina

L'uso della melatonina è stato principalmente studiato nella specie felina. I gatti sono considerati riproduttori stagionali a fotoperiodo positivo, cioè l'attività riproduttiva è influenzata negativamente da livelli elevati di melatonina che aumenta durante la diminuzione delle ore di luce.<sup>56</sup> Questo meccanismo fisiologico è molto più pronunciato nella gatta e causa la scomparsa di segni estrali fino alla stagione in cui iniziano ad incrementare le ore di luce. Infatti, perché prenda avvio la crescita follicolare nelle ovaie, le gatte devono essere sottoposte ad almeno 10 ore consecutive di luce<sup>57</sup>, ad una certa temperatura (di solito più di 15 °C) e ad un certo grado d'umidità.<sup>58</sup> Nel gatto maschio, nei periodi di fotoperiodo negativo, si osserva soltanto una diminuzione della qualità spermatica che in genere non interferisce con la sua capacità riproduttiva.<sup>59,60,61</sup> Interessante notare però, che periodi prolungati di fotoperiodo negativo sono seguiti da una diminuzione della qualità dello sperma, il che implica che la stimolazione luminosa è necessaria per una corretta spermatogenesi e qualità dello sperma.<sup>62</sup> Il meccanismo principale della melatonina è, ad alti livelli, l'interferenza con la produzione di GnRH, dunque impatto negativo nella produzione di gonadotropine ipofisarie e infine un effetto nella soppressione della crescita follicolare.<sup>63</sup>

Partendo da queste conoscenze fisiologiche, si sono cercati protocolli per la soppressione dell'attività riproduttiva nella specie felina. Nei gatti maschi 18 mg di melatonina somministrati con impianto sottocutaneo (Fig. 4) determinano riduzione del numero di spermatozoi (82%) e della motilità (38,5%), 90 giorni dopo l'inserimento dell'impianto. La spermatogenesi è ridotta



**Figura 4** - Impianti di melatonina da 18mg e con pistola per l'inserimento. È importante notare che gli impianti di melatonina in Italia sono commercializzati solo per l'uso negli ovini e di conseguenza vengono venduti solo in confezioni da 50, montati su 2 cartucce da 25 impianti l'una.

per  $120 \pm 15$  giorni con ripristino dei parametri seminali a  $261 \pm 22$  giorni dopo l'inserimento dell'impianto.<sup>64</sup> L'uso di impianti di melatonina ha permesso di ottenere una riduzione delle caratteristiche degli spermatozoi (motilità 38,5%, velocità 26,5%, concentrazione totale 82%, integrità della membrana acrosomiale 22%, integrità della membrana plasmatica 30% e morfologia normale 32%) rispetto a quelle riscontrate nei gatti durante la stagione non riproduttiva con alti livelli sierici di melatonina circolante. È interessante notare che il volume dell'eiaculato e le concentrazioni di testosterone non sono stati influenzati durante il trattamento con melatonina.<sup>64</sup> Sfortunatamente, sebbene la qualità dello sperma sia stata significativamente ridotta per circa 4 mesi, non si sono ottenuti dati confortanti sulla effettiva sterilità dei gatti, anche in funzione della fisiologica teratospermia di questa specie che quindi è in grado di conservare la fertilità anche con grandi alterazioni seminali.

Nelle gatte femmine, invece, la melatonina somministrata per OS a 4mg/die o, meglio, con impianto SC da 18mg, ha reso possibile la soppressione del ciclo estrale per un massimo di 150 giorni.

È importante notare che l'impianto nei mesi di massimo aumento delle ore di luce può risultare inefficace e che la somministrazione orale, dovrebbe avvenire sempre allo stesso orario nelle ore serali per aver maggiore possibilità di efficacia.

**Nella gatta, animale stagionale, la melatonina si è dimostrata utile per sopprimere l'attività sessuale per circa 4 mesi, nel gatto maschio inibisce la libido ma non azzerla la spermiogenesi.**

## 5. Immunocontraccezione

Uno dei tentativi per ottenere la sterilizzazione nei gatti è stato l'uso di vaccini contraccettivi mirati a bersagli riproduttivi che non influenzano altre funzioni fisiologiche assicurando che qualsiasi tipo di comportamento riproduttivo indesiderato venga eliminato. Un importante limite dei vaccini è che essi sono basati su anticorpi il cui effetto deve essere diretto verso un antigene extracellulare a causa della difficoltà degli anticorpi di colpire mediatori ormonali come il GnRH o gli spermatozoi.

I dati attualmente disponibili sono insufficienti per consentire l'uso pratico della vaccinazione contraccettiva. Il periodo più lungo di sterilizzazione raggiunto nei gatti maschi è di 6 mesi.<sup>65</sup>

**Molti studi si stanno concentrando sull'immunocontraccezione, soprattutto nella specie felina, ma a oggi i risultati ottenuti non ne permettono la commercializzazione.**

Vaccinazione contro il GnRH: lo sviluppo di un vaccino contro il GnRH è una scelta logica in quanto la sua soppressione comporta la soppressione di tutti gli ormoni a valle.<sup>66</sup> Poiché il GnRH nativo non è naturalmente immunogenico, deve essere coniugato con vari antigeni per mobilitare le cellule T-helper.<sup>6</sup> Il vaccino prodotto (GonaConTM) è un vaccino immunocontraccettivo contro l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) che ha mostrato un certo successo sia nei gatti maschi che nelle femmine. Nei gatti maschi, una sola somministrazione ha mostrato una forte risposta con concentrazioni sieriche di testosterone rimanenti basali e mancanza di spermatogenesi da 3 a 6 mesi dopo il trattamento, tramite controlli mensili.<sup>65</sup> I gatti non responder hanno mostrato una minore concentrazione di spermatozoi con ridotta motilità mentre il gatto ha mostrato parametri spermatici normali a 6 mesi dopo il trattamento.<sup>65</sup> Si noti che sono state purtroppo segnalate reazioni anche intense al punto di inoculo

che fanno temere una possibile attività nello sviluppo di sarcomi iniettivo-indotti. Per ora, in Europa, non sono commercializzati vaccini anti GnRH.<sup>65</sup>

**Nei gatti, gli antagonisti del GnRH costituiscono una novità promettente per la sterilizzazione chimica sia del maschio che della femmina.**

## 6. GnRH antagonisti

Gli antagonisti del GnRH bloccano i recettori ipofisari del GnRH inibendo così il rilascio di LH e FSH. Il più noto è l'acylina. Nella cagna quest'ultima è riuscita a bloccare il ciclo estrale, l'ovulazione e la gestazione. Se viene somministrata durante l'inizio del proestro (< 3 giorni) a dosi di 110 ug/kg o 330 ug/kg, l'estro e l'ovulazione vengono inibiti intorno a 3 giorni post iniezione con ripresa del ciclo a 19 o 25 giorni rispettivamente.<sup>67</sup>

Nel cane maschio invece, una somministrazione di acylina a 330 ug/kg ha causato l'interruzione della secrezione di testosterone per i successivi 14 giorni senza avere concentrazioni fisiologiche fino il giorno 24 post-terapia.<sup>68</sup> Nei gatti trattati una singola iniezione sottocutanea di acylina (330 mg/kg) ha causato un danno marcato ma reversibile all'epitelio germinale e agli spermatozoi epididimali con conseguente compromissione della spermiogenesi, della spermatocitogenesi e della motilità degli spermatozoi per 2 settimane. Nonostante le alterazioni germinali (assottigliamento dell'epitelio tubolare) e l'aumentata presenza di spermatidi e spermatozoi morti, non è stata osservata alcuna alterazione delle caratteristiche testicolari grossolane e nessuna evidenza istologica di danno delle cellule di Sertoli e Leydig, indicando un'azione specifica dell'acylina nel causare la deprivazione androgenica.<sup>69</sup> In considerazione della mancanza di dati clinici sul loro uso nei gatti, gli antagonisti del GnRH costituiscono una novità promettente a condizione che possano essere sviluppate formulazioni più durature.<sup>4</sup>



## PUNTI CHIAVE

- Nell'ultimo ventennio è cresciuta in modo significativo l'attenzione verso gli effetti della sterilizzazione chirurgica e i suoi effetti benefici e negativi.
- La ricerca di molecole sicure e efficaci per la sterilizzazione medica, nella specie canina e felina, si è molto ampliata di conseguenza.
- In passato i farmaci utilizzati per la gestione dell'attività sessuale sia nei maschi che nelle femmine sono stati analoghi sintetici del progesterone, di cui sono noti tuttavia gli effetti collaterali.
- Le molecole più studiate e utilizzate recentemente sono agonisti sintetici del GnRH.
- La deslorelin è il farmaco a oggi più utilizzato sia nella specie canina che felina per il controllo della riproduzione.
- Nella specie felina, a attività riproduttiva stagionale, la melatonina può essere una buona soluzione temporanea per la gestione dell'attività riproduttiva nella femmina e dei comportamenti legati al testosterone nel maschio.

## Reversible contraception in companion animals

## Summary

*Historically, the control of straying, fertility and sexual behaviour or the modification of the estrous cycle has been based on surgical castration. However, the increase in the number of pets, of breeding subjects and the progression of scientific knowledge has meant that alternative solutions to the surgical procedure were studied, which are not without risks and irreversible. Historically, the most widely used medical therapy in pets for reproductive control has been that based of progestogens. Their widespread use has revealed numerous adverse effects in both males and females. More recent research has highlighted new drugs such as gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists. In the photoperiod-sensitive species, cats, melatonin also showed promising results.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Asa CS, Contraception in Dogs and Cats, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 48, 733-742, 2018.
2. Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE *et al.* Canine and Feline Endocrinology: 2014, Fourth Edition.
3. Plumb DC, Plumb's veterinary drug handbook. Wiley-Blackwell, 2005 Ames, IA.
4. Goericke-Pesch S, Wehrend A, Georgiev P. Suppression of fertility in adult cats, Reproduction in Domestic Animals 49, 33-40, 2014.
5. Romagnoli S, Progestins to control feline reproduction: Historical abuse of high doses and potentially safe use of low doses, Journal of Feline Medicine and Surgery 17 743-752, 2015.
6. Kutzler M, Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization, Theriogenology. 66 514-525, 2006.
7. Van Os JL, Evans JM. False pregnancy and proligestone, Veterinary Record, 106 36. doi:10.1136/VR.106.2.36, 1980.
8. Maenhoudt C, Santos NR, Fontbonne A. Manipulation of the oestrous cycle of the bitch-what works... for now, Reproduction in Domestic Animals 53 Suppl 3, 44-52, 2018.
9. Evans JM, Sutton DJ. The use of hormones, especially progestagens, to control oestrus in bitches, Journal of Reproduction and Fertility Supplement 39 163-173, 1989.
10. Romagnoli S, Concannon PW. Clinical use of progestins in bitches and queens: a review, Recent Advances in Small Animal Reproduction 17 p. 2003.
11. Burke TJ, Reynolds HA. Megestrol acetate for estrus postponement in the bitch, Journal American Veterinary Medical Association 167, 285-287, 1975
12. Payan-Carreira R, Borges P, Fontbonne A, *et al.* Alternative Strategies for Healthier Medical Contraception in Dogs, Canine Medicine. - Recent Topics and Advanced Research: Chapter 7, 2016.
13. Romagnoli LC, Ettinger's Textbook of veterinary Internal Medicine Expert Consult, 8th ed., 2017.
14. England GC, Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs, Journal of Reproduction and Fertility Supplement 51, 123-138, 1997.
15. Romagnoli S & Sontas H, BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology, 2010.
16. Forsberg CL, Reynaud K, Biology of reproduction and modern reproductive technology in the dog, in: The genetics of the dog 2nd Ed., 2012: pp. 295-320. doi:10.1079/9781845939403.0295.
17. Concannon PW, Meyers-Wallen VN, Current and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats, Journal American Veterinary Medical Association 198 1214-1225, 1991.
18. Olson PN, Nett TM, Bowen RA, *et al.* A need for sterilization, contraceptives, and abortifacients: abandoned and unwanted pets. III. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian. 8 235-237, 240, 1986.
19. Root Kustritz MV, Managing the reproductive cycle in the bitch, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 42 423-437, 2012.
20. Dixit VP, Bhargava SK, Reversible contraception like activity of embelin in male dogs (Canis indicus Linn), Andrologia. 15, 486-494, 1983.
21. Polisca A, Orlandi R, Troisi A, *et al.* Clinical efficacy of the GnRH agonist (Deslorelin) in dogs affected by benign prostatic hyperplasia and evaluation of prostatic blood flow by doppler ultrasound, Reproduction in Domestic Animals. 48, 673-680, 2013.
22. Ferré-Dolcet L, Carniello L, Ferro S, *et al.* Interval between removal of a 4,7 mg deslorelin implant after a 3-, 6-, and 9-month treatment and restoration of testicular function in tomcats, Animals. 10 1-12, 2020.
23. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Antonov A, *et al.* Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4,7 mg deslorelin, Suprelorin®, regarding suppression of reproductive function in tomcats, Theri-

- ogenology. 75, 803-810, 2011.
24. Novotny R, Vitasek R, Bartoskova A. Azoospermia with variable testicular histology after 7 months of treatment with a deslorelin implant in toms, *Theriogenology*. 83 1188-1193, 2015.
25. Goericke-Pesch S, Long-term effects of GnRH agonists on fertility and behaviour, *Reproduction in Domestic Animals* 52, 336-347, 2017.
26. Stempel S, Körber H, Reifarth L, *et al.* What Happens in Male Dogs after Treatment with a 4,7 mg Deslorelin Implant? I. Flare up and Down-regulation, *Animals* 12 2379, 2022.
27. Novotny R, Cizek P, Vitasek R, *et al.* Reversible suppression of sexual activity in tomcats with deslorelin implant, *Theriogenology*. 78, 848-857, 2012.
28. Romagnoli S, Baldan A, Ferro S, *et al.* Length of efficacy and effect of implant location in adult tom cats treated with a 9,4 mg deslorelin subcutaneous implant, *Journal of Feline Medicine and Surgery* 21, 507-519, 2019.
29. Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, *et al.* A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction, *Theriogenology*. 66, 1507-1512, 2006.
30. Junaidi A, Williamson PE, Trigg TE, *et al.* Morphological study of the effects of the GnRH superagonist deslorelin on the canine testis and prostate gland, *Reproduction in Domestic Animals* 44 757-763, 2009.
31. Pisu MC, Romagnoli S, Impiego clinico di un impianto di deslorelin nel gatto, *Veterinaria*. 26, 9-15, 2012.
32. Furthner E, Roos J, Niewiadomska Z, *et al.* Contraceptive implants used by cat breeders in France: a study of 140 purebred cats, *Journal of Feline Medicine and Surgery* 22 984-992, 2020.
33. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Antonov A, *et al.* Reversibility of germinative and endocrine testicular function after long-term contraception with a GnRH-agonist implant in the tom-a follow-up study, *Theriogenology*. 81 941-946, 2014.
34. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Antonov A, *et al.* Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4,7 mg deslorelin, Suprelorin®, regarding suppression of reproductive function in tomcats, *Theriogenology*. 75 803-810, 2011.
35. Nuñez Favre R, García MF, García Mitacek MC, *et al.* Reestablishment of sperm quality after long-term deslorelin suppression in tomcats, *Animal Reproduction Science* 195 302-308, 2018.
36. Romagnoli S, Baldan A, Righetti C, *et al.* Semen quality and interval to sterility in tom cats treated with a 9,4 mg deslorelin implant, *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19, 194-199, 2017.
37. Fontaine E, Mir F, Vannier F, *et al.* Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist, *Theriogenology*. 76, 1561-1566, 2011.
38. Kutzler MA, Estrus induction and synchronization in canids and felids, *Theriogenology*. 68 354-374, 2007.
39. Kutzler M, Lamb SV, Volkmann D. Comparison between vestibular and subcutaneous insertion of deslorelin implants for oestrus induction in bitches, in: *Reproduction of Domestic Animals*, pp. 83-86, 2009.
40. Walter B, Otzdorff C, Brugger N, *et al.* Estrus induction in Beagle bitches with the GnRH-agonist implant containing 4,7 mg Deslorelin, *Theriogenology*. 75 1125-1129, 2011.
41. Fontaine E, Fontbonne A. Clinical use of GnRH agonists in canine and feline species, *Reproduction in Domestic Animals* 46 344-353, 2011.
42. Von Heimendahl A, Miller C. Clinical evaluation of deslorelin to induce oestrus, ovulation and pregnancy in the bitch, *Reproduction in Domestic Animals* 47 Suppl 6 398-399. doi:10.1111/RDA.12080, 2012.
43. Borges P, Fontaine E, Maenhoud C, *et al.* Fertility in Adult Bitches Previously Treated with a 4,7 mg Subcutaneous Deslorelin Implant, *Reproduction in Domestic Animals* 50 965-971, 2015.
44. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Atanasov A, *et al.* Treatment of queens in estrus and after estrus with a GnRH-agonist implant containing 4,7 mg deslorelin; hormonal response, duration of efficacy, and reversibility, *Theriogenology*. 79 640-646, 2013.
45. Ferré-Dolcet L, Ferro S, Contiero B, *et al.* Resumption of ovarian activity following removal of a 4,7 mg deslorelin implant in queens, *Reproduction in Domestic Animals* 57 3-9, 2022.
46. Romagnoli S, Ferré-Dolcet L. Reversible Control of Reproduction in Queens: Mastering the use of reproductive drugs to manipulate cyclicity, *Journal of Feline Medicine and Surgery* 24 853-870, 2022.
47. Ackermann CL, Volpato R, Destro FC, *et al.* Ovarian activity reversibility after the use of deslorelin acetate as a short-term contraceptive in domestic queens, *Theriogenology*. 78 817-822, 2012.
48. Toydemir TSF, Kiliçarslan MR, Olgaç V. Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats, *Theriogenology*. 77 662-674, 2012.
49. Ferré-Dolcet L, Ferro S, Contiero B, *et al.* Clinical use of Anti-Müllerian Hormone to monitor resumption of ovarian activity following removal of a 4,7 mg deslorelin implant in queens, *Veterinary Research Communications* 46 917-924, 2022.
50. Ferré-Dolcet L, Ferro S, Contiero B, *et al.* Resumption of ovarian activity following removal of a 4,7 mg deslorelin implant in queens, *Reproduction in Domestic Animals*, 2021.
51. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Atanasov A, *et al.* Treatment with Suprelorin in a pregnant cat, *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15 357-360, 2013.
52. Munson L, Bauman JE, Asae CS, *et al.* Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats., *Journal of reproduction and fertility. Supplement*. 57, 269-273, 2001.
53. Inaba T, Umehara T, Mori J, *et al.* Reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained-release formulation of a GnRH agonist (Leuprolide acetate) in dogs, *Theriogenology*. 46 671-677, 1996.
54. Goericke-Pesch S, Reproduction control in cats. New developments in non-surgical methods, *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12, 539-546, 2010.
55. Hoffmann B, 2005: New drugs to control canine and feline reproduction. FECAVA Voorjaarsdagen: International Congress, 15-17 April 2005: EVS-SAR Precongress Day, April 14, p11-14. NTH, Amsterdam. pp. 11-14.
56. Leyva H, Addiego L, Stabenfeldt G, The effect of different photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin, and cortisol in the domestic cat, *Endocrinology*. 115, 1729-1736, 1984.
57. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 39 135-142, 1989.
58. Concannon D, Lein P, Feline reproduction, *Current Veterinary Therapy Small Animals Practice*. 8 932-936, 1983.
59. Blottner S, Jewgenow K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat, *Reproduction in Domestic Animals* 42 536-540, 2007.
60. Nuñez-Favre R, Bonaura MC, Tittarelli CM, *et al.* Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic Cat (*Felis silvestris catus*), *Reproduction in Domestic Animals*, 2012.
61. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, *et al.* Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats (*Felis catus*), *Reproduction in Domestic Animals* 44 Suppl 2, 287-290, 2009.
62. Nuñez Favre R, Bonaura MC, Tittarelli CM, *et al.* Effect of refractoriness to long photoperiod on sperm production and quality in tomcats, *Reproduction in Domestic Animals* 47 Supplement 6 235-237, 2012.
63. Cohen M, Roselle D, Chabner B, *et al.* Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor, *Nature*. 274 894-895, 1978.
64. Nuñez Favre R, Bonaura MC, Praderio R, *et al.* Effect of melatonin implants on spermatogenesis in the domestic cat (*Felis silvestris catus*), *Theriogenology*. 82 851-856, 2014.
65. Levy JK, Miller JK, Cynda Crawford P, *et al.* GnRH immunocontraception of male cats, *Theriogenology*. 62 1116-1130, 2004.
66. Rhodes L, New approaches to non-surgical sterilization for dogs and cats: Opportunities and challenges, *Reproduction in Domestic Animals* 52 327-331, 2017.
67. Valiente C, Romero GG, Corrada Y, *et al.* Interruption of the canine estrous cycle with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline, *Theriogenology*. 71 408-411, 2009.
68. García Romero G, Valiente C, Aquilano D, *et al.* Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs, *Theriogenology*. 71 1234-1237, 2009.
69. García Romero G, Fernández PE, Gimeno E, *et al.* Effects of the GnRH antagonist acyline on the testis of the domestic cat (*Felis catus*), *The Veterinary Journal* 193 279-282, 2012.