



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUÇÃO EM REPRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

LEONARDO REIS SILVA

**EFEITOS DO USO DA CASTRAÇÃO IMUNOLÓGICA NO EPITÉLIO
SEMINÍFERO DE MACHOS BUBALINOS**

BELÉM

2023

LEONARDO REIS SILVA

**EFEITOS DO USO DA CASTRAÇÃO IMUNOLÓGICA NO EPITÉLIO
SEMINÍFERO DE MACHOS BUBALINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em reprodução animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: **Reprodução animal**.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho

BELÉM

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586e Silva, Leonardo Reis
EFEITOS DO USO DA CASTRAÇÃO IMUNOLÓGICA NO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE MACHOS
BUBALINOS / Leonardo
Reis Silva. - 2023.
34 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Reprodução Animal na AMAZÔNIA
(ReproAmazon), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém,
2023.
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho
1. búfalos. 2. andrologia. 3. castração imunológica. I. , Sebastião Tavares Rolim Filho, *orient.* II. Título

CDD 636.08926

LEONARDO REIS SILVA

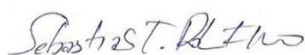
**EFEITOS DO USO DA CASTRAÇÃO IMUNOLÓGICA NO EPITÉLIO
SEMINÍFERO DE MACHOS BUBALINOS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em reprodução na Amazônia da
Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Reprodução Animal

Aprovado em: 16/01/2023

Banca examinadora



Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho
Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho
Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr. Washigton Luiz Assunção
Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo
Universidade Estadual do Maranhão

Este trabalho de pesquisa é inteiramente dedicado aos meus pais. Os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos.

Aos meus pais e irmão, por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Sebastião Rolim, pelos ensinamentos, cobranças contínuas de minhas responsabilidades durante o período da graduação e pós graduação, ao senhor toda minha admiração e respeito.

Aos professores Haroldo, Ohashi e Simone que foram grandes pontes para que este estudo fosse realizado.

A todos os meus colegas de classe que fizeram parte da minha vida durante o período da pós-graduação.

À equipe do laboratório de Fertilização *in vitro* da UFPA pelo acolhimento, ensinamentos e fornecimento de tudo que foi preciso para o estudo.

À Universidade Federal Rural da Amazônia, essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos da graduação e mestrado.

Ao meu filho de quatro patas Theo que foi meu melhor amigo em todos os altos e baixos a mais de 5 anos.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

“Qualquer fracassado
lhe dirá que sucesso não
passade sorte”.

(Autor desconhecido)

RESUMO

O procedimento de imunocastração vem sendo utilizado como técnica alternativa amplamente favorável ao bem-estar animal, por ser indolor, pouco invasiva e com eficácia semelhante à da castração cirúrgica, que causa maior estresse aos animais, principalmente quando realizada de forma inadequada. A imunocastração estimula a produção de anticorpos contra o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), bloqueando temporariamente a produção da testosterona pelas gônadas masculinas e consequentemente a espermatogênese. Por causa da escassez de informações sobre este procedimento em touros bubalinos, o estudo teve como objetivo analisar os possíveis efeitos da imunocastração no testículo desses animais. Vinte touros bubalinos, com idade entre 4 a 6 anos, oriundos da ilha do Marajó – PA, foram avaliados e divididos aleatoriamente em dois grupos composto por dez animais no grupo controle (GC) e dez do grupo imunocastrado (GIM). O produto utilizado foi a vacina anti-GnRH Bopriva® (Zoetis, SP, Brasil). O GIM recebeu duas doses de 1,0ml contendo 400µg da vacina Bopriva® com intervalo de 60 dias e o grupo controle recebeu 1,0 ml de solução fisiológica. Após 14 dias da última dose, os animais foram abatidos para consumo e foi coletado os 20 pares de testículos para análises de parâmetros macroscópicos como: comprimento, largura, circunferência e peso. Além disso, foi realizada a retirada de fragmentos do parênquima testicular na porção medial para confecção de lâminas histológicas. Para comparação dos dados foi aplicado o teste *t* de Student considerando a significância com $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Foi observado diferença significativa entre os dois grupos para peso (direito $p < 0,0001$; esquerdo $p \leq 0,0001$), circunferência (direito $p < 0,0001$; esquerdo $p < 0,0001$), largura (somente lado direito $p < 0,0372$) e comprimento (direito $p \leq 0,0013$; esquerdo $p < 0,0437$). Na avaliação microscópica, os animais do GC não apresentaram alterações. Nos animais do GIM houve degeneração em todas as amostras, sendo visualizado descamação, tortuosidade e espessamento da membrana basal do túbulo seminífero, assim como vacuolização e atrofia das células de Sertoli. Foi observado também uma redução do número de células de Leydig, núcleos picnóticos e azoospermia. Conclui-se vacina anti-GnRH pode comprometer a fertilidade de búfalos, provavelmente pela supressão da função testicular. A provável supressão na função testicular foi demonstrada através da análise das alterações macroscópicas e degeneração e atrofia testicular a nível histológico observadas em animais imunocastrados.

Palavras-chave: atrofia gonadal, degeneração testicular, bubalinos, Bopriva.

ABSTRACT

The immunocastration procedure has been used as an alternative technique that is widely favorable to animal welfare, as it is painless, little invasive and with similar effectiveness to surgical castration, which causes greater stress to animals, especially when performed improperly. Immunocastration stimulates the production of antibodies against the Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), temporarily blocking the production of testosterone by the male gonads and consequently spermatogenesis. Due to the scarcity of information about this procedure in buffalo bulls, the study aimed to analyze the possible effects of immunocastration on the testis of these animals. Twenty buffalo bulls, aged 4 to 6 years, from the island of Marajó - PA, were evaluated and randomly divided into two groups consisting of ten animals in the control group (CG) and ten in the immunocastrated group (GIM). The product used was the Bopriva® anti-GnRH vaccine (Zoetis, SP, Brazil). The GIM received two doses of 1.0 ml containing 400µg of the Bopriva® vaccine with an interval of 60 days and the control group received 1.0 ml of saline solution. Fourteen days after the last dose, the animals were slaughtered for consumption and the 20 pairs of testicles were collected for analysis of macroscopic parameters such as: length, width, circumference and weight. In addition, fragments of the testicular parenchyma were removed from the medial portion to make histological slides. For data comparison, Student's t test was applied considering significance with $p < 0.05$ and 95% confidence interval. A significant difference was observed between the two groups for groups for weight (right $p < 0.0001$; left $p \leq 0.0001$), circumference (right $p < 0.0001$; left $p < 0.0001$), width (only right-side $p < 0.0372$) and length (right $p \leq 0.0013$; left $p < 0.0437$). In the microscopic evaluation, the animals of the CG did not present alterations. In the animals from the GIM, there was degeneration in all samples, with desquamation, tortuosity and thickening of the basement membrane of the seminiferous tubule being visualized, as well as vacuolation and atrophy of Sertoli cells. A reduction in the number of Leydig cells, pyknotic and azoosperm nuclei was also observed. It is concluded that anti-GnRH vaccine may compromise fertility in buffaloes, probably by suppressing testicular function. Probable suppression of testicular function was demonstrated through the analysis of macroscopic changes and testicular degeneration and atrophy at the histological level observed in immunocastrated animals.

Keywords: gonadal atrophy, testicular degeneration, buffaloes, Bopriva.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.1.1 Objetivo específicos.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.2 Endocrinologia da reprodução do touro.....	13
3.2.1 Puberdade e maturidade sexual	14
3.3 Tipos de castração.....	15
3.3.1 Castração química.....	15
3.3.2 Castração cirúrgica	16
3.3.3 Castração imunológica.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Considerações éticas, local de desenvolvimento da pesquisa, animais experimentais e modelo de imunocastração.....	18
4.2 Fixação do material e análises microscópicas.....	18
4.3 Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS	19
5.1 Macroscopia.....	19
5.1 Microscopia.....	20
5. Discussão	22
6. Conclusão	24
REFERÊNCIAS.....	25
Anexo A	34

1. INTRODUÇÃO

Na bubalinocultura de corte, existem técnicas que servem para aumentar o desempenho produtivo dos animais e abatê-los com menor idade e maior peso, semelhantes as utilizadas em bovinos, como é o caso da castração cirúrgica. Dentre alguns benefícios está a produção de carcaças de melhor qualidade, com uma maior deposição de gordura de cobertura (protegendo a carcaça durante seu resfriamento), produzindo assim, carne mais macia, com textura mais fina e sabor mais agradável (JANETT et al., 2012). Além disso, outras vantagens também incluem o controle de fertilidade, redução de manchas na carne, controle de agressividade e acasalamentos indesejados (MARTI et al., 2015).

Entretanto, o procedimento cirúrgico tem sido questionado do ponto de vista do bem-estar animal, por ser realizado em muitos casos, sem o uso de analgésicos e anestésicos, sem assistência do médico veterinário, ou em condições precárias de higiene e manejo (MACHADO et al., 2019). Outras desvantagens dos procedimentos cirúrgicos, são os traumas associados a prática, estresse animal, redução na taxa de crescimento e mortes (D'OCCHIO, 1993; BIAGINI E LAZZARONI, 2007).

Por outro lado, novas técnicas estão sendo implementadas como alternativa favorável ao bem-estar dos animais, como é o caso da castração imunológica, que reduz o comportamento sexual e agressivo em touros inteiros (MARTI et al., 2015). A técnica baseia-se no uso da vacina Anti-GnRH que é composta por uma forma modificada do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) conjugada a uma proteína, na qual, estimula o sistema imunológico do animal a produzir anticorpos específicos contra o GnRH. Desta forma, ocorre a interrupção do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal através de uma barreira imunológica, pois a vacina impede a passagem de GnRH do local de liberação no hipotálamo ao local de ação na adeno-hipófise, ocasionando a supressão da espermatogênese e diminuição na síntese de testosterona (BAUER et al., 2008; JANETT et al., 2012; MONLÉON et al., 2020).

A vacina provoca redução no tamanho total dos testículos (atrofia gonadal), diminuição do diâmetro de túbulos seminíferos em consequência da inibição da função das células de Leydig e Sertoli e parada na gametogênese levando a um quadro de infertilidade reversível (FERRO et al., 2001; HAYDEN, 2008; KAUFFOLD et al., 2010).

Portanto, a castração imunológica traz inúmeros benefícios, como: impedir a dor associada aos procedimentos de castração cirúrgica, ausência do risco de feridas que causem infecção e complicações no processo de cicatrização, redução das incidências de morbidade, mortalidade e cooperando para o bem-estar animal (NEEDHAM et al., 2017). Assim como

impedir o estresse do manejo inadequado da castração cirúrgica que é implantado na rotina da pecuária, aumento na massa corporal para o abate, maior proporção de músculo e gordura na carcaça em comparação a animais inteiros ou castrados cirurgicamente (AMATAYAKUL-CHANTLER et al., 2013).

O mercado brasileiro apresenta somente a vacina Bopriva® (ZOETIS, BR), de ação anti-GnRH que é usado em duas doses, onde a primeira dose sensibiliza o sistema imunológico e a segunda ativa a resposta imune em sete a quatorze dias após a administração (ASSUMPCÃO et al., 2017). O protocolo da vacinação em bovídeos consiste na administração de duas doses, de 1,0 ml cada (400µg), com intervalo de aplicações variando entre 3 até 12 semanas (AMATAYAKUL-CHANTLER et al., 2013).

Até o presente momento, não existem estudos prévios que utilizem o procedimento de imunocastração com a vacina Anti-GnRH em touros bubalinos, bem como seus efeitos e benefícios sobre o sistema reprodutor do animal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da castração imunológica com vacina anti-GnRH Bopriva ® sobre testículos de bubalinos.

2.1.1 Objetivo específicos

- Avaliar os efeitos da castração imunológica com vacina anti-GnRH Bopriva ® sobre a morfologia do parênquima testicular;
- Identificar as possíveis alterações histológicas de amostras do parênquima testicular de bubalinos imunocastrados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomofisiologia do sistema genital de machos bubalinos

Morfoanatomicamente, o sistema reprodutor masculino dos búfalos assemelha-se aos dos bovinos (OHASHI et al., 1988). Os testículos, as glândulas sexuais acessórias e o pênis são menores que dos bovinos (HAFEZ, 2004). A bolsa escrotal localizada na região inguinal, apresenta reduzida quantidade de pelos e é menos pêndulosa que nos bovinos, ocasionada pela constrição do colo da bolsa escrotal ser pouco pronunciada (OHASHI et al., 2011).

A circunferência escrotal está correlacionada com a produção espermática diária, com a presença de espermatozoides viáveis no ejaculado e com a fertilidade. Foi observado que búfalos com maior circunferência escrotal produzem sêmen de melhor qualidade (BRITO et al., 2004; HAFEZ, 2004). Em bubalinos, dados sobre a biometria testicular são escassos e com grande variação entre eles, e, tendo em vista a diferença das raças e de manejo nutricional, a obtenção da padronização do tamanho testicular para a referida espécie é dificultada (OHASHI et al., 2011).

De uma forma geral, estima-se que touros bubalinos entre 12 e 36 meses possuam de 23 cm a 32 cm de circunferência escrotal e animais acima de três anos, considerados sexualmente maduros, apresentem circunferência acima de 32 cm (VALE et al., 2004; CBRA, 2013).

Os testículos são envoltos por camadas de tecidos que também compõem a bolsa: pele externa, túnica Dartos (camada subcutânea), fáscia espermática externa e músculo cremaster, constituindo o escroto; fáscia espermática interna e lâmina parietal, constituindo o processo vaginal. O testículo propriamente dito possui uma cápsula de tecido fibroso e, abaixo dela, uma membrana serosa. A cápsula é responsável pela lobulação piramidal que divide o parênquima testicular em septos e, no centro do testículo, formará o mediastino. O parênquima testicular é constituído de túbulos seminíferos (células de sustentação e manutenção, de Sertoli, e espermatogônias), que possuem a função espermatogênica do órgão, cercados de estroma (vascularização, inervação e células secretoras de testosterona, de Leydig). (HAFEZ, 2004; KÖNIG e LIEBICH, 2016). Em geral os túbulos seminíferos ocupam de 60 a 80% do volume testicular total, correspondendo a aproximadamente 82% do parênquima testicular em búfalos (PAWAR e WROBEL, 1991).

As células de Sertoli apresentam a função de secretar testosterona para o interior das veias testiculares e vasos linfáticos, assim como produzir também os hormônios ativinas e inibinas, que atuam como moduladores autócrinos e parácrinos da produção de esteroides e

outros hormônios. Já as células de Leydig contribuem para a produção de fluídos pelo túbulo e podem produzir o fator inibidor mulleriano encontrado nos machos adultos. (HAFEZ, 2004). Morfologicamente as células de Leydig são arredondadas, com seu núcleo central e citoplasma eosinofílico, com gotículas de lipídeos presentes, nos quais, são utilizadas como fonte de colesterol para produção de testosterona e diidrotestosterona (PELLENIEMI et al., 1993).

O desenvolvimento destas células ocorre ao longo do desenvolvimento fetal, sofrendo ação das gonadotrofinas, as quais respondem ao eixo hipotalâmico-hipofisário- gonadal (MENDONÇA et al., 2019). Os hormônios LH e FSH controlam a proliferação e a diferenciação das células de Sertoli e Leydig desde a fase pós-natal, de modo que os esteroides e fatores de crescimento secretados por estas células têm ação direta ou indireta sobre o desenvolvimento das células germinativas (AGUIAR et al., 2006).

Os espermatozoides se formam nos túbulos seminíferos pelo processo de espermatogênese, que ocorre através da dinâmica de diferenciação das células germinativas, localizadas na periferia dos túbulos seminíferos, migrando e se diferenciando no sentido da periferia para o lúmen (KUDRYAVTSEV et al., 2003). A espermatogênese é um processo no qual os gonócitos, primeiras células germinativas a habitarem os túbulos seminíferos, multiplicam-se e diferenciam-se em espermatogônias (AGUIAR et al., 2006).

3.2 Endocrinologia da reprodução do touro

Dada a semelhança anatômica e fisiológica entre as espécies bovina e bubalina, os hormônios reprodutivos envolvidos no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal são os mesmos (TERZANO et al., 2012). O hipotálamo sintetiza e secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) de forma pulsátil, o GnRH age diretamente nas células gonadotróficas da adenoipófise (CUNNIGHAM, 2003). O GnRH ao ser liberado, liga-se ao seu receptor (receptor GnRH) e modula a síntese e a liberação do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) na hipófise (HAN et al., 2017).

O FSH atua nas células germinativas e nos túbulos seminíferos, sendo responsável pela espermatogênese até o estágio de espermatócitos secundários, atua também na secreção da Inibina. A inibina tem efeito de retroalimentação negativa sobre a secreção de FSH, mas não sobre LH (HAFEZ, 2004). O LH induz a produção de testosterona pelas células intersticiais de Leydig (PALHANO, 2008)

Em touros, a testosterona é apresentada na forma biologicamente ativa, a diidrotestosterona. As funções principais deste hormônio são: estimular os estágios finais da espermatogênese e prolongar a vida útil do espermatozóide epididimário; promover crescimento, desenvolvimento e atividade secretora das glândulas sexuais acessórias; e realizar a manutenção

das características sexuais secundárias e do comportamento sexual do macho (HAFEZ, 2004).

3.2.1 Puberdade e maturidade sexual

A puberdade é o período em que o sistema reprodutor como um todo se apresenta funcional, no entanto os componentes continuam se desenvolvendo para atingir a maturidade (BRITO, 2018). A puberdade no macho é identificada quando este contém espermatozoides suficientes no ejaculado para emprenhar uma fêmea ou em torno de 50 milhões de espermatozoides com 10% de motilidade (MENEGASSI et al., 2015). O animal apresenta também aumento nos níveis séricos de testosterona, produção de gametas e desprendimento do frênulo peniano, sendo possível observar espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos, na cauda do epidídimo e conseqüentemente no ejaculado. (GUIMARÃES et al., 2011).

Outra maneira para se identificar idade á puberdade é analisando cortes histológicos do testículo, verificando o estabelecimento da espermiogênese ou ainda pelo cálculo da produção espermática diária por grama de parênquima testicular (BRITO, 2018).

Já a maturidade sexual é atingida no momento em que o sêmen apresenta parâmetros desejáveis para um reprodutor, como concentração, vigor, motilidade espermática, volume de ejaculado e redução das patologias espermáticas a níveis aceitáveis (VALE et al., 2008), e apresentando também uma redução da taxa de crescimento testicular, expressivas características sexuais secundárias e potencial de libido (HENRY et al., 2017).

Os búfalos entram na puberdade aproximadamente aos 12 meses, com peso corporal médio de 300 a 350kg, e apresentam circunferência escrotal de 22 a 25 cm (VALE et al., 2002). Pelo que se pode observar os touros bubalinos atingem a puberdade mais tardiamente que os touros bovinos, quando comparados com raças europeias (OHASHI et al., 2011). Já faixa etária mais frequentemente descrita na literatura para a maturidade sexual no touro bubalino do tipo Rio é de 22 a 24 meses (VALE et al., 2008).

3.3 Tipos de castração

A castração é uma técnica de manejo utilizada na rotina da pecuária de corte, com a vantagem de tornar o animal mais dócil, facilitando assim o manejo, além de melhorar a qualidade final da carcaça, aumento da lucratividade do sistema e com maior aceitação do produto pelo mercado (ÍTAVO et al., 2008). Quanto ao desempenho os resultados indicam que animais não-castrados crescem mais rápido, com maior porcentagem de carne comercializável e com menos gordura deixando a desejar fatores como gordura de cobertura e marmoreio, enquanto os castrados apresentam carcaça com melhor acabamento, carne macia e de aspecto superior (VITORRI et al., 2006).

Os métodos de castração podem ser classificados em três grupos: físicos, químicos e hormonais, divididos ainda pela técnica, que em geral é realizada através de remoção cirúrgica dos testículos, ou danificando-os ocasionado pela morte dos tecidos ou levando-os a atrofia (MOREIRA, 2013). Considera-se como melhor método ou de eleição aquele que resultar em complicações mínimas no pós-operatório (no caso cirúrgico), menor estresse no animal, e conseqüentemente um maior ganho em peso na fase de recuperação do pós-operatório (YAMADA, 2019).

3.3.1 Castração química

Este método de castração caracteriza-se pela injeção de fármacos ou tóxicos no parênquima testicular gerando inflamação, fibrose e dano físico definitivo no aparelho reprodutor masculino, principalmente nos ductos deferentes, epidídimos e testículos, causando a redução da espermatogênese e concentração sérica de andrógenos, levando a um quadro de infertilidade por azoospermia (KUTZLER e WOOD, 2006; YAMADA, 2019).

A castração química pode ser classificada em três categorias levando em consideração o local de aplicação da solução esterilizante, podendo ser, intratesticular, intraepididimal ou intraductal. O mecanismo de ação varia com as categorias, na intratesticular o agente químico compromete a espermatogênese pela ação que exerce nos túbulos seminíferos; na intraepididimal ocorre comprometimento no transporte de espermatozoides e na intraductal ocorre obstrução no lúmen do ducto. (VIVACQUA, 2013).

A castração química, em muitas das vezes induz um pós-operatório delicado com dobro do tempo de recuperação total, quando comparado à castração cirúrgica (ALMEIDA, 2010). A papaína e o ácido láctico são os principais fármacos utilizados, não sendo necessário o uso de outros medicamentos (VIVACQUA, 2014).

As vantagens da castração química em relação a cirúrgica em animais mantidos em sistema de criação intensivo pode-se verificar menor trauma no pós-operatório, conseguem atingir o peso de abate semelhante aos animais não castrados e apresentam maior produção de carne de boa qualidade (MOURA e LUCHIARI FILHO, 1996).

3.3.2 Castração cirúrgica

A castração cirúrgica ou, tecnicamente conhecida por orquiectomia, é utilizada tradicionalmente nos sistemas de produção. (CIVIEIRO, 2017). É também a forma de castração mais utilizada no Brasil, caracterizada pela remoção dos testículos através de duas incisões laterais na bolsa escrotal, ou por meio da remoção do ápice do escroto, por ablação (SILVA et al., 2003).

A técnica tem como objetivo a produção de carcaças de melhor qualidade, devido à maior deposição de gordura de cobertura na carcaça, produzindo uma carne mais macia, com textura mais fina e melhor sabor (JANETT et al., 2012). Outras vantagens da castração cirúrgica também incluem o controle de fertilidade, redução de manchas na carne, controle de agressividade e acasalamentos indesejados (MARTI et al., 2015).

Quanto ao método de castração, o procedimento cirúrgico tem sido questionado, do ponto de vista do bem-estar animal, na exploração de animais de produção, por ser realizado, em muitos casos, sem o auxílio veterinário, sem uso de analgésicos e anestésicos e condições precárias de higiene (MACHADO et al., 2019). Outras desvantagens dos procedimentos cirúrgicos, particularmente em animais de produção, são os traumas associados a prática, o contratempo da produção e as ocasionais mortes durante os procedimentos (D'OCCHIO, M. J., 1993).

3.3.3 Castração imunológica

Nos últimos anos a castração utilizando vacina contra a liberação do Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) tem sido usada como uma alternativa a castração cirúrgica em machos, reduzindo assim, a dor e angústia causada no animal. (JANNET et al., 2012; MONLEON et al., 2020). Assim como uma alternativa favorável para reduzir o comportamento sexual e agressivo em touros intactos. (MARTI et al., 2015).

Na imunocastração, o próprio sistema imune suprime o GnRH, interrompendo o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal através de uma barreira imunológica e impedindo a passagem de GnRH do local de liberação no hipotálamo ao local de ação na hipófise (BAUER et al.,

2008). Ocasionalmente a inibição da secreção de FSH e LH, resultando na supressão da espermatogênese e produção de testosterona. (NEEDHAM et al., 2017).

A vacina Anti-GnRH induz a supressão da secreção de gonadotrofina, que reduz a produção de testosterona, desta forma, provoca a redução no tamanho dos testículos (atrofia gonadal), diminuição do diâmetro de túbulos seminíferos em consequência da inibição da função das células de Leydig e Sertoli, parada na gametogênese ocasionando um quadro de infertilidade reversível (FERRO et al., 2001; HAYDEN, 2008; KAUFFOLD et al., 2010).

Os benefícios da imunocastração são: impedir a dor causada pelos procedimentos de castração (irregulares) e o risco de infecção e implicações no processo de cicatrização, reduzindo dessa forma, as incidências de morbidade e mortalidade animal, cooperando para o bem-estar animal. (NEEDHAM et al., 2017). Além de promover ganho produtivos como aumento na proporção de músculo na carcaça, maior proporção de gordura na carcaça, em comparação animais castrados cirurgicamente, resultando em menos obstáculos produtivos e melhor rentabilidade (AMATAYAKUL-CHANTLER, S. et al., 2013).

A vacina utilizada para imunocastração em bovinos é a Bopriva®, a qual foi desenvolvida na Nova Zelândia pela Pfizer Saúde animal, hoje denominada Zoetis (CIVEIRO, 2017). O produto está disponível no Brasil desde maio de 2011, ela corresponde a uma vacina anti-GnRH para uso em bovinos inteiros em período reprodutivo (YAMADA, 2019).

cada, com intervalo de aplicações variando entre 3 a 4 semanas aproximadamente, 8 ou 12 semanas (AMATAYAKUL-CHANTLER, S. et al., 2013). A imunidade se estabelece em 1 (uma) ou 2 (duas) semanas após a aplicação da segunda dose da vacina, sendo que a primeira aplicação serve para sensibilizar o sistema imunológico do animal (DUNSHEA et al., 2011; Bopriva, 2017). Quando o intervalo entre doses for de aproximadamente 30 dias o efeito da castração se estende por 90 dias, com 60 dias entre doses o efeito castrado é de 120 dias, com intervalo aproximado de 90 dias o efeito castrado é de 150 dias que é o protocolo mais utilizado (PALU, 2018).

Outras vacinas para imunocastração em outros mamíferos estão disponíveis no mercado como: Improvac® (Zoetis TM) para suínos (HAN et al., 2017) e Equity® (Pfizer Animal Health, Austrália) (JANETT et al., 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas, local de desenvolvimento da pesquisa, animais experimentais e modelo de imunocastração.

Esse estudo foi conduzido pelo Laboratório de Reprodução animal da Universidade Federal Rural do Pará e Universidade Federal do Pará em parceria com uma fazenda criadora de bubalinos na Ilha do Marajó - PA. Todos os procedimentos veterinários foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA- UFRA 1566230421. Foram utilizados 20 animais, de quatro a seis anos, raça murreh, clinicamente sadios e divididos aleatoriamente em 2 grupos: grupo controle (GC) e imunocastrados (GIM). O GIM recebeu duas doses (via subcutânea) de 1,0 ml da vacina anti-GnRH Bopriva[®] contendo 400µg com intervalo de 60 dias, enquanto que o GC recebeu duas doses de solução fisiológica durante o mesmo período que o GIM. Ao término da segunda dose, foi contabilizado quatorze dias e todos os animais deste estudo foram abatidos no matadouro SOCIPE (localizado na cidade de Belém-PA, Brasil) e destinados ao consumo. Durante o período experimental, todos os animais foram mantidos em sistema extensivo, com fornecimento de sal mineral/água ad *libitum*.

4.2 Fixação do material e análises microscópicas

A coleta dos 40 testículos aconteceu na linha de abate imediatamente após a sangria, seguido de análise morfométrica, peso das amostras e registro fotográfico. As amostras foram mensuradas com paquímetro de precisão digital, fita métrica flexível na maior curvatura do testículo e balança digital. Cada testículo foi analisado e mensurado individualmente. Os parâmetros analisados foram comprimento (cm), largura (cm), peso (g) e circunferência (cm) de cada testículo de ambos os grupos (VIU et al., 2006).

Após as mensurações macroscópicas foram retirados fragmentos da porção medial do parênquima testicular e armazenados em frascos coletores contendo solução fixadora ALFAC (Álcool 90% 85 ml - Formol puro 10 ml - Ácido acético glacial 5 ml) por 12h. Em seguida, as amostras foram processadas histologicamente, incluídas em blocos de parafina e coradas em hematoxilina e eosina para análise histológica.

De uma forma geral, a análise histológica foi realizada para examinar possíveis alterações em células testiculares intersticiais (células de Leydig) e dos túbulos seminíferos (células de Sertoli, espermatogônias, espermatídes e espermatócitos). As análises histopatológicas foram realizadas utilizando-se microscópio Nikon Eclipse E500 com o Moticam 2500[®] acoplado a ele.

4.3 Análise estatística

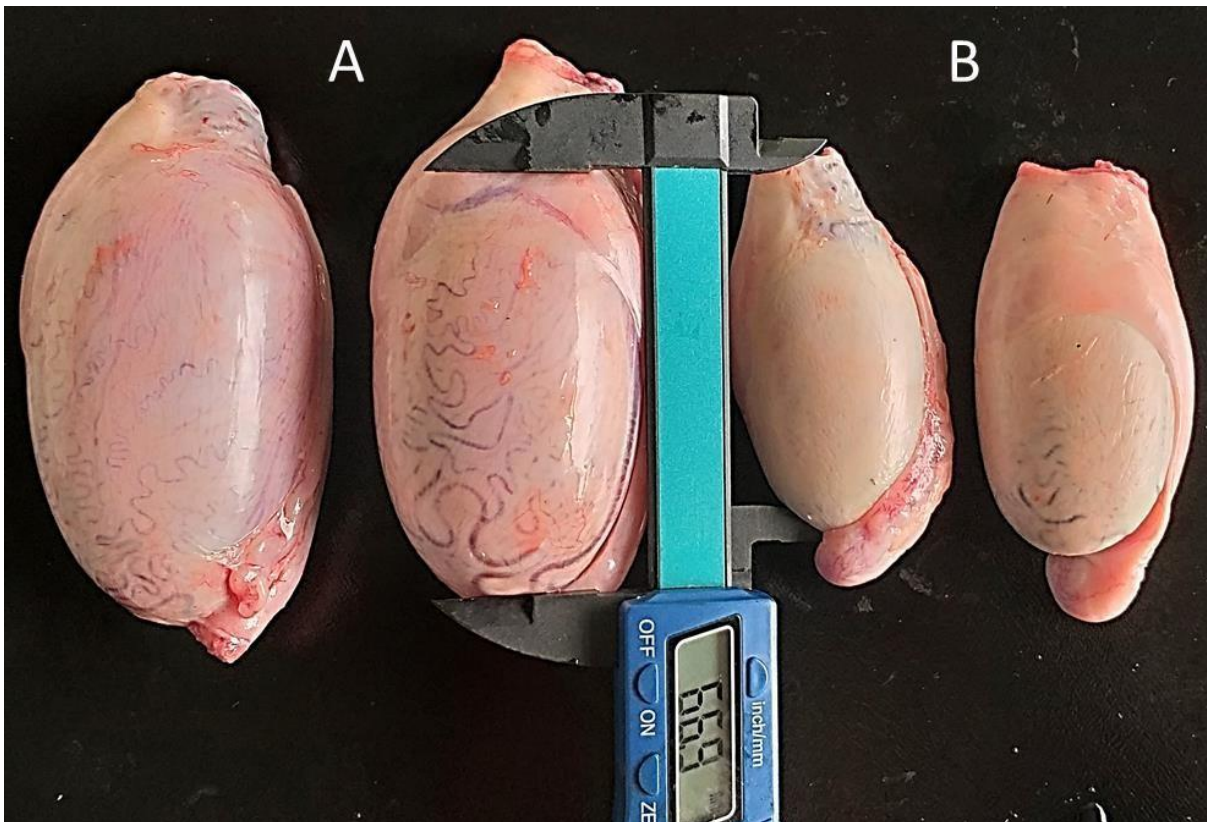
As análises foram realizadas através do processador de dados software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para a diferença estatística significativa entre os grupos, foi aplicado o teste *t* de Student (Nonparametric Test) considerando a significância com $P < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Todos os resultados foram expressos com média \pm e desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Macroscopia

Em relação às variáveis macroscópicas, os animais do GIM possuíam testículos menores (Figura 1) e houve diferença significativa entre os dois grupos para peso (direito $p < 0,0001$; esquerdo $p \leq 0,0001$), circunferência (direito $p < 0,0001$; esquerdo $p < 0,0001$), largura (somente lado direito $p < 0,0372$) e comprimento (direito $p \leq 0,0013$; esquerdo $p < 0,0437$). As médias obtidas para cada variável de ambos os grupos se encontram na Tabela 1. Os animais do GIM começaram a demonstrar diminuição nas variáveis a partir da segunda semana pós segunda dose da vacina anti-GnRH.

Figura 1. Comparação macroscópica visual entre o tamanho do par de testículos de bubalinos do grupo controle (A) e bubalinos imunocastrados (B).



Fonte: arquivo pessoal

Tabela 1. Médias de variáveis macroscópicas correspondentes a peso, circunferência, largura e comprimento em bubalinos submetidos à imunocastração e não castrados.

Mensuração	Controle		Imunocastrados	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
Peso (g)	176,60 ± 26,73 ^a	170,10 ± 25,33 ^a	79,40 ± 35,41 ^b	80,30 ± 30,58 ^b
Circunferência (cm)	16,30 ± 2,26 ^a	16,90 ± 1,39 ^a	10,50 ± 2,22 ^b	10,70 ± 2,35 ^b
Largura (cm)	45,60 ± 4,76 ^a	45,20 ± 5,00	39,80 ± 10,15 ^b	40,60 ± 9,02
Comprimento (cm)	79,90 ± 3,84 ^a	79,40 ± 5,58 ^a	72,20 ± 13,23 ^b	72,70 ± 10,91 ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

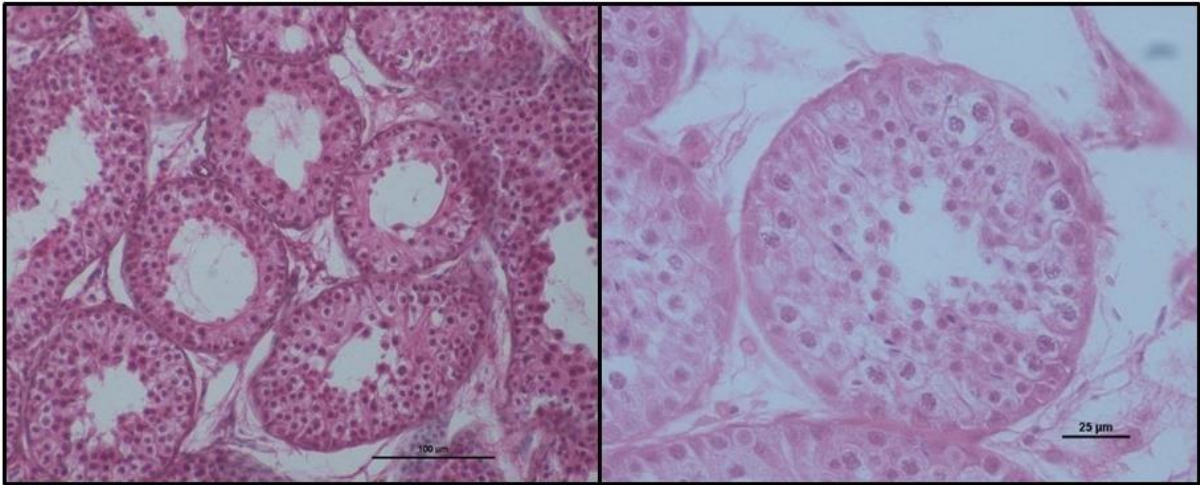
5.1 Microscopia

Os animais do grupo controle não apresentaram alterações. O tecido epitelial testicular do grupo controle apresentou aparência normal, com a presença e distribuição das células de Sertoli, bem como normalidade dos túbulos seminíferos, com produção de espermatozoides e células germinativas. O padrão de arquitetura fisiológica foi observado em todas as amostras (figura 2).

Nos animais do grupo imunocastrado, entretanto houve alteração no epitélio seminífero de todas as amostras, sendo visualizado descamação, tortuosidade, e espessamento da membrana basal do túbulo seminífero. Observou-se também uma redução na quantidade de túbulos seminíferos, apresentando aspecto atrofiado e hialinizado.

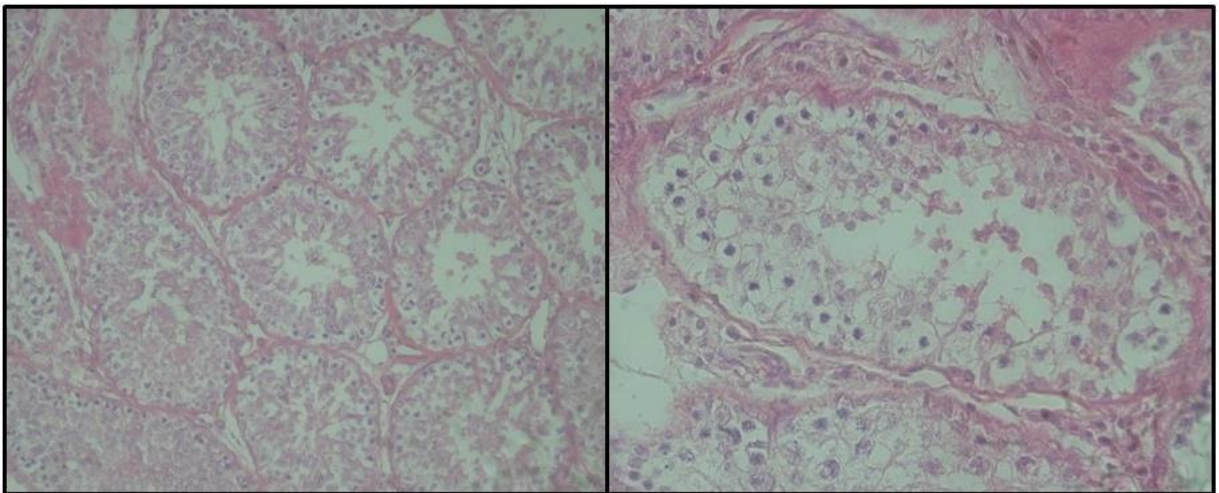
Em relação a população e proliferação das células do epitélio seminífero, foi observado vacuolização acentuada das células de Sertoli, redução do número de células de Leydig, redução ou ausência das células germinativas, núcleos picnóticos em células tubulares, azoospermia e células multinucleadas no interior dos túbulos (figura 3). A ausência de espermatozoides (azoospermia) no lúmen dos túbulos seminíferos dos búfalos do grupo imunocastrado foi significativa e ocorreu em todas as amostras.

Figura 2. Microfotografias de luz dos testículos de Búfalos do GC [HE; 25 μm -100 μm]. O grupo controle apresentou morfologia e distribuição normal dos túbulos seminíferos, epitélio germinativo intacto, presença de células no interstício, normalidade de células germinativas e presença de espermatozoides no lúmen tubular.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 3. Microfotografias de luz dos testículos de Búfalos submetidos a castração imunológica, [HE; 25 μm - 100 μm]. Pode ser observado com mais frequência a descamação do epitélio germinativo, núcleos picnóticos, vacuolização das Células de Sertoli e Células Germinativas e azoospermia.



Fonte: arquivo pessoal

5. Discussão

Pela primeira vez na literatura o estudo traz resultados importantes a respeito das alterações morfométricas e histológicas através da ação da vacina Anti-GnRH, utilizada em touros bubalinos. É possível evidenciar que a vacina Bopriva, foi capaz de alterar diâmetro, comprimento, largura e peso total dos testículos dos animais tratados, tão quanto as alterações microscópicas no parênquima testicular.

A imunocastração utilizando vacina Anti-GnRH tem sido proposta como uma alternativa favorável à castração cirúrgica e representa um importante avanço no controle da fertilidade em animais domésticos (MACHADO, 2015; NAZ et al., 2015; APONTE et al., 2017). De acordo com os autores Marti et al. (2015); Janett et al., (2012); Amatayakul- chantler et al. (2012) esse fato pode estar diretamente associado com a supressão de testosterona devido ao bloqueio do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que gera uma diminuição na funcionalidade ou mesmo o bloqueio total da espermatogênese.

Quanto ao intervalo entre doses da vacina, a maioria dos estudos de imunocastração em bovinos utilizou duas doses de 1,0 ml (400 µg) com intervalo entre doses variando de quatro a treze semanas e, que demonstraram resultados promissores para supressão de testosterona e bloqueio da espermatogênese (JANETT et al., 2012; AMATAYAKUL-CHANTLER et al., 2013; MAZON, 2016; CIVEIRO, 2017).

A respeito do peso dos testículos dos búfalos do GIM, houve diminuição bilateral significativa, sugerindo atrofia gonadal. A atrofia testicular pode ocorrer por influências sistêmicas ou ambientais (CAIXETA, 2019). As principais causas são privação de hormônios reprodutivos, administração de andrógenos ou estrógenos exógenos, radiação, desnutrição, deficiência de vitaminas, febre ou hipertermia prolongada, patologias vasculares infecciosas ou neoplásicas (JONES et al., 2000). Verificou-se no estudo a ação bloqueadora do anti-GnRH na secreção de GnRH em bubalinos. O bloqueio se manifestou pela diminuição dos valores de comprimento, largura, circunferência e peso testicular. Ação demonstrada no estudo de Ferro et al., (2001).

O presente resultado foi semelhante ao observado por Cook et al. (2000), com bovinos mestiços a partir de nove meses de idade, aonde os autores observaram que animais inteiros apresentaram, uma média de 324,0 (g) de peso testicular, enquanto imunocastrados apresentaram, 171,4 (g).

Em virtude da escassez de dados na literatura para a presente espécie, com relação a peso testicular, optou-se pela comparação desse dado com a espécie suína. Logo, os resultados corroboraram também ao de Einarsson et al. (2009) em suínos com improvac®. Segundo o

autor os suínos apresentaram uma diminuição no peso testicular significativa. Em contrapartida, o mesmo padrão percentual de diminuição no peso testicular não foi observado por Wicks et al., (2013), nesse estudo foi utilizado Bopriva® e Improvac® em suínos e foi percebido uma redução maior respectivamente, o que explica isso seria a diferença entre as espécies utilizadas, idades reprodutivas e doses ministradas.

A atrofia gonadal foi evidente no grupo imunocastrado. Os valores de comprimento, circunferência e largura foram bem menores com relação ao grupo controle. Tal fato foi comprovado por Withofet et al. (2019), que usaram vacina anti- GnRH em bovinos mestiços Angus-limousin e apresentaram diminuição nos parâmetros de comprimento (cm) e largura (cm), conseqüentemente tamanho total, em relação ao grupo controle.

Na atrofia testicular e degeneração há uma redução na quantidade dos túbulos seminíferos, apresentando aspecto atrofiado e hialinizado, bem como com atrofia de epitélio germinativo, presença de células de Sertoli vacuolizadas, diminuição da espermatogênese ou ausência devido à morte das células da linhagem germinativa e conforme o processo avança, ocorre um acúmulo destas na luz dos túbulos. Estes aspectos são dos resultados dos estudos de Garcia; (2013) e Jubb et al. (2007). Além disso, é observado que as células tubulares apresentaram núcleo picnótico característico de tecidos em estágios degenerativos (CELEGHINI et al., 2017).

O mesmo padrão histológico de degeneração testicular com epitélio seminífero vacuolizado, descamado e diminuto com perda da arquitetura celular e ausência/redução de espermatozoides do estudo, foi observado em um por Zanella et al. (2009) que utilizou 26 touros bovinos da raça Nelore com dois anos de idade aproximadamente, submetidos a castração imunológica o qual apresentaram 85% das amostras com ausência total de espermatozoides, o que mostra a disfunção das células de Sertoli, causada, provavelmente, pela ação da vacina.

A ausência total de espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero ocorreu provavelmente em consequência da inibição parcial da espermatogênese. Efeito semelhante foi observado por Robertson et al. (1982), que imunizaram bezerros com uma vacina anti-LHRH e verificaram a supressão das funções gonadais e do comportamento sexual dos animais na maioria percentual dos animais, porém o restante permaneceu com presença pequena de espermatozoides. Rocha et al. (2018) observou também a azoospermia, assim como número reduzido de células intersticiais e descamação do epitélio germinativo, em um estudo utilizando dozes burros submetidos a castração imunológica com Bopriva, utilizando a mesma dose de bovinos.

6. Conclusão

Finalmente, os resultados mostram que a vacina anti-GnRH pode comprometer a fertilidade de búfalos, tão quanto demonstrado em outras espécies de mamíferos, provavelmente pela supressão da função testicular. A provável supressão na função testicular foi demonstrada através da análise das alterações macroscópicas e degeneração e atrofia testicular a nível histológico observadas em animais imunocastrados.

Entretanto, é importante ressaltar que outros estudos devem ser realizados para comprovar a eficácia definitiva da vacina, como a marcação e quantificação de células do epitélio seminífero e intersticial, avaliação dos níveis de testosterona sérica em períodos de tempo entre a sua administração e o abate do animal e período de reversibilidade da técnica.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G.V.; ARAÚJO, A.A.; MOURA., A.A.A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1629-1638, 2006.

ALMEIDA, K. B.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, V. A. Orquiectomia em bovinos. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, v. 6: n. 9, p. 1-14, 2010.

AMATAYAKUL-CHANTLER, S.; HOE, F.; JACKSON, J.A.; ROCA, R.O.; STEGNER, J.E.; KING, V.; HOWARD, R.; LOPEZ, E.; WALKER, J. Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine Bopriva or surgical castration of *Bos indicus* bulls raised on pasture in Brazil. **Meat Science**, v. 95, n. 1, p. 78-84, set. 2013.

AMATAYAKUL-CHANTLER, S.; JACKSON, J. A.; STEGNER, J.; KING, V.; RUBIO, L. M. S.; HOWARD, R.; LOPEZ, E.; WALKER, J. Immunocastration of *Bos indicus* × Brown Swiss bulls in feedlot with gonadotropin-releasing hormone vaccine Bopriva provides improved performance and meat quality. **Journal Of Animal Science**, v. 90, n. 11, p. 3718-3728, 1 nov. 2012.

APONTE, P. M.; GUTIERREZ-REINOSO, M. A.; SANCHEZ-CEPEDA, E. G.; 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**, v. 12, n. 4, p. 784-793, 24 ago. 2017.

ASSUMPCÃO, T. I.; BARROS, J. P. M. M.; MACEDO, G. G. Efeito da imunocastração sobre o perímetro escrotal e a produção espermática em touros da raça nelore. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 74, n. 3, p. 294-299, 2017.

BAUER, A.; LACORN, M.; DANOWSKI, K.; CLAUS, R. Effects of immunization against GnRH on gonadotropins, the GH-IGF-I-axis and metabolic parameters in barrows. **Animal**, v. 2, n. 8, p. 1215-1222, ago. 2008.

BIAGINI, D.; LAZZARONI, C. Effect of pre- and post-pubertal castration on Piemontese male calves: i. live and slaughtering performances. **Livestock Science**, v. 110, n. 1-2, p. 181-186, jun. 2007.

Bopriva. 2017. Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda. Bula, 2p. Disponível em: <<http://www.bopriva.com.br/>>. [Accessed online in March 2019].

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; DODE, M.A.N.; BARBOSA, R.T.; KASTELIC, J.P. Sexual development in early-and late-maturing Bos indicus and Bos indicus × Bos taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1198- 1217, out. 2004.

BRITO, Mayara Ferreira. **Associação dos fatores bioclimáticos com as características espermáticas pós- descongelamento e com o perfil proteômico do plasma seminal de bubalinos (Bubalus bubalis), criados em clima tropical úmido**. 2018. 116 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

CAIXETA, João Paulo Silveira. **Prevalência das alterações histopatológicas testiculares encontradas na raça curraleiro pé-duro, nelore e seus cruzamentos, criados na região semi-árida do Brasil**. 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Pós- Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, Universidade de Uberaba, Uberaba, 2019.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; SANTOS, F.B.; ALVES, M.B.R.; OLIVEIRA, B.M.M. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 40-45, mar. 2017.

CIVIERO, Maurício. **MÉTODOS DE CASTRAÇÃO DE MACHOS HOLANDESES ALIMENTADOS COM DIETA DE ALTO GRÃO**. 2017. 68 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahi, Itapetinga, 2017.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3 ed, Belo Horizonte: CBRA, 2013.

COOK, R B; POPP, J D; KASTELIC, J P; ROBBINS, S; HARLAND, R. The effects of active immunization against GnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. **Journal Of Animal Science**, v. 78, n. 11, p. 2778- 2783, 2000.

CUNNINGHAM, J. **Tratado de fisiologia veterinária**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2014. 578p.

D'OCCHIO, M.J. Immunological suppression of reproductive functions in male and female mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1-4, p. 345-372, out. 1993.

DUNSHEA, F. R.; CRONIN, G. M.; BARNETT, J. L.; HEMSWORTH, P. H.; HENNESSY, D. P.; CAMPBELL, R. G.; LUXFORD, B.; SMITS, R. J.; TILBROOK, A. J.; KING, R. Immunisation against gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) increases growth and reduces variability in group-housed boars. **Animal Production Science**, v. 51, n. 8, p. 695-702, 2011.

EINARSSON,S.; ANDERSSON, K.; WALLGREN,M.; LUNDSTRÖM, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 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**, v. 71, n. 2, p. 302-310, jan. 2009.

FERRO, V.; KHAN, M.A.H.; LATIMER, V.S.; BROWN, D.; URBANSKI, H.F.; STIMSON, W.H. Immunoneutralisation of GnRH-I, without cross-reactivity to GnRH- II, in the development of a highly specific anti-fertility vaccine for clinical and veterinary use. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 51, n. 2, p. 109-129, ago. 2001.

GARCIA, A.R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 33-39, 2017.

GUIMARÃES, J.D.; GUIMARÃES, S.E.F.; SIQUEIRA, J.B.; PINHO, O.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S.; SILVA, M.R.; BORGES, J.C. Seleção e manejo reprodutivo de touros zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 379-388, jan. 2011.

HAFEZ, B. & HAFEZ, S.E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

HAYDEN, CATHERINE. GnRH analogues: applications in assisted reproductive techniques. **European Journal Of Endocrinology**, v. 159, n. 1, p. 17-25, dez. 2008.

HENRY, M. Exame andrológico de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 188-194, 2017.

ÍTAVO, L.C.V.; DIAS, A.M.; ÍTAVO, C.C.B.F.; EUCLIDES FILHO, K.; MORAIS, M.G.; SILVA, F.F.; GOMES, R.C.; SILVA, J.P.B. Desempenho produtivo, características de carcaça e avaliação econômica de bovinos cruzados, castrados e não- castrados, terminados em pastagens de *Brachiaria decumbens*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1157-1165, out. 2008.

JANETT, F.; GERIG, T.; TSCHUOR, A.C.; AMATAYAKUL-CHANTLER, S.; WALKER, J.; HOWARD, R.; PIECHOTTA, M.; BOLLWEIN, H.; HARTNACK, S.; THUN, R. Effect of vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva® in the prepubertal bull calf. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 131, n. 1-2, p. 72-80, mar. 2012.

JANETT, F.; GERIG, T.; TSCHUOR, A.C.; 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**, v. 78, n. 1, p. 182-188, jul. 2012.

JANETT, F.; STUMP, R.; BURGER, D.; THUN, R. Suppression of testicular function and sexual behavior by vaccination against GnRH (Equity™) in the adult stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 88-102, out. 2009.

JONES, T.C. et al.; **Patologia veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. **Phatology of Domestic Animals**. British, 2007. 3 rd, 5ª Ed, p. 565-618.

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**, v. 74, n. 5, p. 733-740, set. 2010.

KOOGAN HAN, XINGFA; ZHOU, YUQIN; ZENG, YU; SUI, FENFEN; LIU, YACHENG; TAN, YAO; CAO, XIAOHAN; DU, XIAOGANG; MENG, FENGYAN; ZENG, XIANYIN. Effects of active immunization against GnRH versus surgical castration on hypothalamic-pituitary function in boars. **Theriogenology**, v. 97, p. 89-97, jul. 2017.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos**: Texto e Atlas Colorido. 6ª. Ed, p. 417-419: Artmed, 2016.

KUDRYAVTSEV, I. V.; SAFRONOVA, L. D.; KUDRYAVTSEV, P. I. Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 34, n. 6, p. 337-346, 2003.

MACHADO, D.S.; ALVES FILHO, D.C.; ARGENTA, F.M.; BRONDANI, I.L.; VIANA, A.F.P.; VOLPATTO, R.S.; OLIVEIRA, L.M.; KLEIN, J.L.; MOURA, A.F.; FRASSON, J.J. N. Características de carcaça e carne de novilhos Aberdeen Angus submetidos à castração cirúrgica ou imunológica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 71, n. 2, p. 658-666, abr. 2019.

MACHADO, Diego Soares. **Uso da imunocastração como alternativa á castração cirúrgica na produção**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de ciências rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

MARTI, S.; DEVANT, M.; AMATAYAKUL-CHANTLER, S.; JACKSON, J. A.; LOPEZ, E.; JANZEN, E. D.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S. Effect of anti- gonadotropin-releasing factor vaccine and band castration on indicators of welfare in beef cattle^{1,2}. **Journal Of Animal Science**, v. 93, n. 4, p. 1581-1591, 1 abr. 2015.

MAZON, Madeline Rezende. **Efeitos da imunocastração e de agonistas beta- adrenérgicos sobre a qualidade de carne de bovinos**. 2016. 145 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

MENDONÇA, K.A., et al. Importância dos aspectos biométricos na seleção de reprodutores bovinos: revisão. **PUBVET**, v. 13, p. 162, 2019.

MENEGASSI, S. R. O.; PEREIRA, G. R.; LOPES, F. G.; DA ROCHA, M. K. Exame Andrológico. In: MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J. O. J. **Aspectos reprodutivos do touro: teoria e prática**. Guaíba: Agrolivros, 2015. p.45-105.

MONLEÓN, E.; NOYA, A.; GARZA, C.; RIPOLL, G.; SANZ, A. Effects of an anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine on the morphology, structure and function of bull testes. **Theriogenology**, v. 141, p. 211-218, jan. 2020.

MOREIRA, Aline Domingues. **Métodos de castração de machos aberdeen angus x nelore terminados em pastagem**. 2013. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

MOURA, A. C.; LUCHIARI FILHO, A. Castração. **Pecuária de Corte**, São Paulo, v. 6, n. 56, p. 45-47, 1996.

NAZ, RAJESH K.; SAVER, ASHLEY E. Immunocontraception for Animals: current status and future perspective. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 4, p. 426-439, 28 set. 2015.

NEEDHAM, T.; LAMBRECHTS, H.; HOFFMAN, L.C. Castration of male livestock and the potential of immunocastration to improve animal welfare and production traits: Invited Review. **South African Journal Of Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 731-742, 9 nov. 2017.

OHASHI, O. M.; SANTOS, S.D.D.; MIRANDA, M. S.; CORDEIRO, M.S.; COSTA, N.N.; SILVA, T.V.G. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 88-94, 2011.

OHASHI, O.M.; SOUSA J.; RIBEIRO, H.F.L.; VALE, W.G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *Bos taurus* e mestiços, criados em clima amazônico. **Pesq Vet Bras**, v. 8, p. 31-35, 1988.

PALHANO, H.C. **Reprodução em Bovinos: Fisiologia, Terapêutica e Biotecnologia**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2. ed. p. 250, 2008.

PALU, Alan Burin. **Desempenho produtivo de bovinos de corte submetidos a dois métodos de castração na Amazônia ocidental** 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.

PAWAR, H.S.; WROBEL, KARL-HEINZ. The Sertoli cell of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) during the spermatogenic cycle. **Cell and tissue research**, v. 265, n. 1, p. 43-50, 1991.

PELLINIEMI, L. J.; FRÖJDMAN, K.; PARANKO, J. Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. **The Sertoli Cell**, p. 87-113, 1993.

ROBERTSON, I. S. et al. Effect of immunological castration on sexual and production characteristics in male cattle. **The Veterinary Record**, v. 111, n. 23, p. 529-531, 1982.

ROCHA, J M.; FERREIRA-SILVA, J C.; VELOSO NETO, H F.; MOURA, M T; FERREIRA., H N; A SILVA JÚNIOR, V.; MANSO FILHO, H C.; OLIVEIRA, M A L. Immunocastration in donkeys: clinical and physiological aspects. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 34, n. 1, p. 12-16, 2018.

SILVA, L. A. F.; VIANA FILHO, P. R. L.; VERISSIMO, A. C. C.; SILVA, E. B.; SILVA, O. C.; PÁDUA, J. T.; RABELO, R. E.; TRINDADE, B. R.; SOUSA, J. N. Efeito da estação do ano, da idade, do método de contenção e da técnica cirúrgica na recuperação clínica e no ganho de peso de bovinos submetidos à orquiectomia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 4, n. 1, p. 18-29, 2003.

TERZANO, G.M.; BARILE, V.L.; BORGHESE, A. Overview on reproductive endocrine aspects in buffalo. **Journal of Buffalo Science**, v. 1, n. 2, 2012.

VALE W.G.; SILVA A.O.A.; SOUSA J.S.; PEREIRA W.L.A.; MAGALHÃES A.N.; OLIVEIRA C.M.; RIBEIRO H.F.L. Arrested development of the mesonephric ducts in a Murrah buffalo bull. In: **Proceedings of 1st Buffalo Symposium of Americas**, Belém, Pará, Brazil. 2002. p. 479-481.

VALE, W. G. Recent advances in the male buffalo reproduction. In: **VII World Buffalo Congress**. Makati City, Philippines. 2004. p. 105-115.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUZA, J. S.; SILVA, A. O. A.; BARBOSA, E. M.; ROLIM FILHO, S. T. Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, p.141-155, 2008.

VITTORI, A.; QUEIROZ, A.C.; RESENDE, F.D.; GESUALDI JÚNIOR, A.; ALLEONI, G.F.; RAZOOK, A.G.; FIGUEIREDO, L.A.; GESUALDI, A.C.L.d.S. Características de carcaça de bovinos de diferentes grupos genéticos, castrados e não- castrados, em fase de terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 2085- 2092, out. 2006.

VIU, M., MAGNABOSCO, C., FERRAZ, H., GAMBARINI, M., OLIVEIRA FILHO, B., LOPES, D. & VIU, A. Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região centro- oeste do Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n3, p. 53-57, 2006.

VIVACQUA DE LIMA, Diogo. **Castração de machos bovinos em diferentes idades, utilizando ácido láctico e papaína**. 2014. 71 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

VIVACQUA, Marcelo. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UMA SOLUÇÃO À BASE DE PAPAÍNA E ÁCIDO LÁCTICO INDICADA PARA A CASTRAÇÃO QUÍMICA EM BOVINOS**. 2013. 88 f. Tese (Doutorado) – Ciência animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Uenf, Campos dos Goytacazes, 2013.

WICKS, N.; CROUCH, S.; PEARL, C.A. Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. **Animal Reproduction Science**, v. 142, n. 3-4, p. 149-159, nov. 2013.

WITHOEFT, J.A.; CHICOCCA, M.; SANTIANI, F.; COSTA, L.S.; MATEUS, K.A.; SANTOS, M.R.; CASAGRANDE, R.A.; CUCCO, D.d.C. Anatomopathological Evaluation of Young Bulls (*Bos taurus*) Testicles Submitted to Immunocastration. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, 26 nov. 2019.

YAMADA, Paulo Henrique. **Efeitos de diferentes métodos de castração sobre a função testicular, características de carcaça e dor em novilhos zebuínos.** 2019. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019.

ZANELLA, R.; ZANELLA, E.L.; REEVES, J.J.; HERNANDEZ, J.; MOTTA, A.C.; AVILA, D. Características testiculares de touros imunizados com vacina anti-hormônio liberador do hormônio luteinizante. **Pesq. Agropec. Bras**, Br, v. 10, n. 44, p. 1359-1363, out. 2009.

Anexo A



Comissão de Ética no
Uso de Animais CEUA/UFRA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Castração imunológica em bubalinos (*Bubalus bubalis*)", protocolada sob o CEUA nº 1566230421 (ID 000424), sob a responsabilidade de **Sebastião Tavares Rolim Filho e equipe; Leonardo Reis Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) na reunião de 16/02/2022.

We certify that the proposal "Immunocastration in buffaloes (*Bubalus bubalis*)", utilizing 50 Buffaloes (50 males), protocol number CEUA 1566230421 (ID 000424), under the responsibility of **Sebastião Tavares Rolim Filho and team; Leonardo Reis Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal Rural University of Amazonia (CEUA/UFRA) in the meeting of 02/16/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2022 a 06/2022

Área: Reprodução Animal

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Bubalinos

sexo: Machos

idade: 3 a 5 anos

N: 50

Linhagem: Mestiços

Peso: 350 a 600 kg

Local do experimento: Laboratório de Reprodução animal da Universidade Federal Rural do Pará e Fazenda Ilha Nova - Salvaterra/PA

Belém, 27 de maio de 2022

Prof. Dra. Natalia Guarino Souza Barbosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dra. Ernestina Ribeiro dos Santos Neta
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia