

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**  
**Programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* em**  
**Medicina e Bem-Estar Animal**

**Cristiano Silva Ferreira**

**EFEITO DA IMUNIZAÇÃO ANTI-HORMÔNIO LIBERADOR DE  
GONODATROFINAS (GnRH) SOBRE O DESENVOLVIMENTO  
TESTICULAR, ESPERMATOGÊNESE E GANHO DE PESO DE  
BOVINOS PRÉ-PÚBERES**

**São Paulo**  
**2016**

**Cristiano Silva Ferreira**

**Programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* em Medicina e Bem-Estar  
Animal, Universidade de Santo Amaro/UNISA**

**EFEITO DA IMUNIZAÇÃO ANTI-HORMÔNIO LIBERADOR DE  
GONODATROFINAS (GnRH) SOBRE O DESENVOLVIMENTO  
TESTICULAR, ESPERMATOGÊNESE E GANHO DE PESO DE  
BOVINOS PRÉ-PÚBERES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como pré-requisito para a obtenção de título de Mestre em Medicina Veterinária, sob orientação do professor Dr. André Maciel Crespilho.

**SÃO PAULO  
2016**

**Cristiano Silva Ferreira**

**EFEITO DA IMUNIZAÇÃO ANTI-HORMÔNIO LIBERADOR DE  
GONODATROFINAS (GnRH) SOBRE O DESENVOLVIMENTO  
TESTICULAR, ESPERMATOGÊNESE E GANHO DE PESO DE  
BOVINOS PRÉ-PÚBERES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* da  
Universidade de Santo Amaro – UNISA, como pré-requisito para a obtenção do título  
de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho

São Paulo, 11 de Março de 2016.

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. André Maciel Crespilho \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Kleber da Cunha Peixoto Junior \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Gustavo Mendes Gomes \_\_\_\_\_

Conceito Final: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. André Maciel Crespilho pela orientação, confiança e apoio durante o desenvolvimento do experimento e para execução e concretização desta dissertação.

Ao Coordenador do programa de Mestrado em Medicina e Bem Estar Animal da UNISA, Prof. Dr. Kleber da Cunha Peixoto Jr., pela paciência e tempo dedicado nas orientações estatísticas.

A pós-graduação da UNISA, em nome de todos os seus funcionários, pelo grande apoio e auxílio para concretização dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Pedro Antônio Muniz Malafaia pela amizade, confiança e incentivo desde os tempos da graduação.

Ao excelentíssimo Senador Ronaldo Cesar Coelho, ao amigo Marcos Nogueira e funcionários da Fazenda São Fernando pela confiança, disponibilizando a estrutura e animais da propriedade para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Aos grandes amigos Diogo Bandeira, Yolanda Bastos e Afonso Caldas pelo apoio, incentivo e companhia.

A minha família e amigos que me apoiaram e me incentivaram no decorrer de meu projeto de pesquisa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho...

**DEDICO, HOMENAGEIO e AGRADEÇO.**

## RESUMO

As diferentes técnicas convencionalmente empregadas para castração de bovinos provocam dor e estresse, podendo gerar perdas de produtividade. Nesse contexto, métodos alternativos de castração como o uso de vacinas que promovem a inibição do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) tem se popularizado. Embora diversos trabalhos tenham comprovado a eficácia da vacinação anti-GnRH para imunocastração de machos bovinos adultos, questões como a reversibilidade dos efeitos clínicos da vacinação, especialmente quando utilizada em animais pré e peri púberes, permanece sem uma definição clara na literatura. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da imunização anti-GnRH sobre a espermatogênese, desenvolvimento testicular e ganho de peso de bezerros mestiços pré púberes criados a pasto. Para o estudo foram selecionados 18 animais 1/2 sangue Holandês/Gir com idade média de 5 meses. Os animais foram divididos em 03 grupos: Controle (GC; n=6), animais não submetidos à vacinação; Grupo tratamento pré-púbere (G1; n=6), administração de 1 ml da vacina anti-GnRH Bopriva®/sc 1 vez ao mês por 3 meses; Grupo tratamento peri-púbere (G2; n=6) tratamento iniciado apenas quando os animais atingiram 9 meses de idade, na mesma dose e frequência do G1. Todos os bezerros foram avaliados mensalmente pelo período de 9 meses, considerando o efeito do tratamento e do momento em que as vacinações foram iniciadas sobre a contagem diferencial de células de linhagem espermática, circunferência escrotal, ecogenicidade testicular e ganho médio de peso diário (GPD) e total (GPT). A aplicação da vacina anti GnRH retardou o desenvolvimento testicular inicial dos animais do G1 ( $p < 0,05$ ), porém não comprometeu a circunferência escrotal dos animais ao atingirem 14 meses de idade. A ecotextura do parênquima testicular foi semelhante entre os grupos estudados, com exceção do G1 que apresentou menor ecogenicidade testicular a partir da terceira dose da vacina. Menor percentual de espermatogônias foi observado para os grupos que receberam a vacina anti-GnRH em relação ao GC, porém sem diferenças entre os grupos ao final do experimento. Animais que receberam a vacina anti-GnRH alcançaram maior ganho de peso total no período avaliado (em média 2

arrobas acima do GPT em relação ao grupo controle). Conclui-se que a vacinação anti GnRH exerce influencia temporária e transitória sobre o desenvolvimento gonadal, ecotextura testicular e espermatogênese de tourinhos em fase pré púbere, sendo que os efeitos vacinais são mais expressivos nos animais que iniciam o protocolo com 5 meses de idade. A vacinação foi capaz de promover maior ganho de peso nos animais tratados.

**Palavras-chave:** Bopriva®, Bovinos, Espermatogênese, GnRH, Imunocastração.

## ABSTRACT

The different techniques conventionally employed for cattle castration provokes pain and stress, and may generate losses of productivity. In this context, alternative methods of castration as the use of vaccines which promote the inhibition of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) have been popularized. Although several studies have proven the effectiveness of vaccination anti-GnRH for imunocastração of bulls, some aspects such as the reversibility of the clinical effects of vaccination especially when used in pre- and peri-pubescent animals remains without a clear definition. This study aimed to evaluate the effect of immunization anti-GnRH on spermatogenesis, testicular development and weight gain of pre pubescent crossbred calves. For the study were selected 18 animals 1/2 Holstein/Gir with average age of 5 months. The animals were divided into 03 groups: Control (GC, n=6), animals not subjected to vaccination; Pre-pubertal treatment group (G1, n=6), administration of 1 ml of anti-GnRH vaccine (Bopriva®) /sc one time a month for 3 months; Peri-pubertal treatment group (G2, n=6) vaccination schedule starts when the animals reached 9 months of age, in the same dosis and frequency of G1. All calves were evaluated monthly for 9 months for elucidate the treatment effect and interaction with the initial vaccination protocol on variables number of spermatogenic lineage cells, scrotal circumference, pixel intensity and average daily (ADG) and total (ATG) weight gain. Application of the anti-GnRH vaccine delayed the initial testicular development of G1 animals ( $p < 0.05$ ), but there were no differences in scrotal circumference when compared animals of 3 groups at the end of the experimental period ( $p > 0.05$ ). The testicular parenchyma echotexture was similar among the groups studied, with the exception of the G1 that showed lower echogenicity after the third dose of the vaccine. Differences were observed for the average percentage of spermatogonia cells when compared the vaccinated groups and GC. Animals that received the anti-GnRH vaccine achieved greater ATG in the period evaluated. In conclusion, the anti-GnRH vaccination exerts a temporary and transient influence on the gonadal development, testicular ecotexture and spermatogenesis of pre-pubertal bulls, and the vaccine effects are more

expressive in the animals that initiate the protocol at 5 months of age. Vaccination promotes greater weight gain in treated animals.

**Keywords:** Bopriva®, Bulls, GnRH, Immunocastration, Spermatogenesis.

## Lista de Figuras

- Figura–1:** Bovinos machos, mestiços Holandês e Gir, utilizados durante todas as etapas da pesquisa conduzida na fazenda São Fernando, Vassouras, RJ.....25.
- Figura–2:** Exemplificação da metodologia utilizada para mensuração da circunferência escrotal de bovinos.....26.
- Figura–3:** Exemplificação de exame ultrassonográfico em plano longitudinal do testículo bovino utilizando probe linear com frequência de 5 MHz.....27.
- Figura–4:** Exemplificação de imagem ultrassonográfica de testículo bovino gerada em plano longitudinal.....28.
- Figura–5:** Imagem ultrassonográfica do parênquima testicular (retângulo de 450 mm<sup>2</sup>), sem visualização do Mediastino Testicular (MT), onde foram analisadas, à homogeneidade da ecotextura testicular e a Intesidade Pixels (IP).....28.
- Figura–6:** Técnica de PAAF realizada em plano perpendicular ao parênquima testicular bovino.....29.
- Figura–7:** Citologia obtida a partir de punção biópsia aspirativa testicular de bovinos.....30.

## Lista de Tabelas

**Tabela-1:** Percentual médio de espermatogônias obtidas a partir de punção biópsia aspirativa (PBA) testicular (n=5) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 (G1) ou aos 9 meses de idade (G2).....33.

**Tabela-2:** Percentual médio de espermatócitos primários obtidos a partir de punção biópsia aspirativa testicular (n=5) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente).....34.

**Tabela-3:** Percentual médio de espermátides iniciais obtidas a partir de PBA testicular (n=5) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente).....34.

**Tabela-4:** Percentual médio de células de Sertolli obtidas a partir de punção biópsia aspirativa testicular dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 meses ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente).....35.

## Lista de Gráficos

**Gráfico-1:** Circunferência escrotal média dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 (G1) ou aos 9 meses de idade (G2). Letras diferentes (a,b) indicam as diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ), de acordo com cada momento experimental. Onde: “\*” vacinação do grupo G1 e “\*\*” vacinação do grupo G2.....32.

**Gráfico-2:** Ecotextura testicular (intensidade de pixels) média dos animais dos grupos controle (GC) e que receberam a vacina anti GnRH aos 5 ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente). Onde “\*” representa os momentos em que os animais do G1 (1, 2 e 3) e G2 (5, 6 e 7) foram vacinados.....32.

**Gráfico-3:** Ganho de peso médio diário (GPD) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 meses ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente). Letras diferentes <sup>(a,b)</sup> indicam as diferenças encontradas em cada um dos momentos avaliados ( $p < 0,05$ ). \* Vacinação do grupo G1 e \*\* vacinação do grupo G2.....36.

**Gráfico-4:** Ganho de peso total (GPT) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti-GnRH aos 5 ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente). Letras diferentes <sup>(a,b)</sup> indicam as diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ).....37.

## Lista de Abreviaturas

FSH: Hormônio folículo estimulante

GC: Grupo controle

G1: Grupo tratamento 1 (início vacinação anti GnRH aos 5 meses de idade)

G2: Grupo tratamento 2 (início vacinação anti GnRH aos 9 meses de idade)

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

HPB: Holandês preto e branco

LH: Hormônio luteinizante

Mm: Milímetro

mm<sup>2</sup>: Milímetro quadrado

MHz: Mega-hertz

ml: Mililitro

MT: Mediastino testicular

ng/ml: Nano grama por mililitro

PAAF: Punção aspirativa por agulha fina

PBA: Punção biópsia aspirativa

PIB: Produto interno bruto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISAO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Espermatogênese.....	16
2.2 Circunferência escrotal.....	17
2.3 Imunocastração de bovinos com o uso de vacinas anti GnRH...18	
2.4 Ultrassonografia testicular.....	20
2.5 Citologia por biopsia aspirativa testicular.....	21
2.6 Ganho de peso.....	22
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1 Local.....	24
4.2 Animais e tratamentos.....	24
4.3 Avaliação da circunferência escrotal.....	25
4.4 Avaliação da ecogenicidade testicular.....	26
4.5 Avaliação da citologia por biopsia aspirativa testicular.....	27
4.6 Avaliação do ganho de peso.....	31
4.7 Análise estatística.....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	31
5.1 Circunferência escrotal.....	31
5.2 Ecogenicidade testicular.....	32
5.3 Citologia testicular.....	33
5.4 Ganho de peso.....	36
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	45
<b>8 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	46
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

Impulsionado por fatores como o posicionamento geográfico privilegiado em termos de extensão territorial e diversidade climática, o Brasil vem se destacando ao longo das últimas décadas como um dos maiores produtores de bovinos do Mundo, possuindo aproximadamente 215 milhões de cabeças. Mais de  $\frac{3}{4}$  dos bovinos de corte do Brasil correspondem a animais *Bos taurus indicus*, que embora sejam considerados mais tardios quando comparados aos animais Europeus (*Bos taurus taurus*) tem sido cruzados para obtenção de animais mestiços, garantindo o melhoramento genético e desenvolvimento da pecuária de corte nacional <sup>(1)</sup>.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)<sup>(2)</sup> a carne representa um dos principais produtos de exportação nacional, sendo responsável pela geração de boa parte do produto interno bruto (PIB) representando, uma das mais importantes commodities do país.

Embora exista uma série de diferenças quando comparados os diversos sistemas de produção de bovinos de corte, a castração dos machos destinados ao abate representa uma das principais técnicas de manejo empregadas no Brasil e no Mundo<sup>(3,4)</sup>. Uma das indicações para a prática de castração representa o manejo de engorda conjunto de machos e fêmeas na mesma pastagem ou confinamento, situação que só é possível se a atividade sexual e fertilidade forem suprimidas em pelo menos um dos grupos sexuais<sup>(5)</sup>. Já como estratégia de manejo, a orquiectomia reduz os problemas relacionados à agressividade e ao comportamento sexual<sup>(6)</sup>, fatores que podem comprometer o ganho de peso e performance produtiva de bovinos de corte.

No entanto, maior incidência e magnitude de desconforto e estresse estão associados às castrações conduzidas após a puberdade dos bovinos, afetando o consumo e conversão alimentar e, conseqüentemente, a taxa de crescimento, ganho médio de peso diário (GPD) e bem-estar animal <sup>(7)</sup>.

De acordo com Knight et al.<sup>(8)</sup> a castração reduz a movimentação e o tempo de pastejo dos bovinos, influenciando o ganho de peso e, conseqüentemente, a performance produtiva dos rebanhos.

A castração de bovinos exerce influência sobre a anatomia e fisiologia animal, modificando a expressão das características sexuais primárias e secundárias<sup>(9)</sup>. No entanto, a idade com que a castração é realizada influencia diretamente o tempo de exposição e a influência dos andrógenos endógenos sobre os diferentes sistemas orgânicos dos animais<sup>(7)</sup>.

De acordo com Wolf et al.<sup>(10)</sup>, um macho bovino atinge a puberdade no momento em que é capaz de produzir no mínimo  $5 \times 10^7$  espermatozoides totais, apresentando motilidade progressiva igual ou superior a 10%.

Em bezerros pré púberes ocorre um aumento transitório da secreção de gonadotrofinas entre 10 a 20 semanas de idade, sendo comprovado que animais sexualmente mais precoces apresentam maior produção e secreção de LH<sup>(11)</sup>. De acordo com Lazzaroni e Biagini<sup>(12)</sup>, em raças mais precoces a puberdade é alcançada ao redor de 5 meses, enquanto nas mais tardias ao redor dos 10 a 11 meses de idade. Nesse sentido, a variação da idade à puberdade deve ser considerada como estratégia de manejo para a escolha do melhor momento para realização da castração de bovinos.

Dentre as principais técnicas utilizadas para realização da orquiectomia destacam-se o uso de emasculador, aplicação de constrição por meio de elásticos de borracha e ablação cirúrgica dos testículos<sup>(5)</sup>, esta última representando o procedimento mais utilizado em criatórios extensivos<sup>(13)</sup>. Embora a orquiectomia seja de rápida e fácil execução, de acordo com Ferreira et al.<sup>(14)</sup> diversas complicações podem ocorrer após a castração cirúrgica, como o edema e instalação de miíases, retenção de coágulos, formação de granulomas e hemorragia, que corresponde à complicação mais comum e pode ocorrer nos momentos intra ou pós-operatório.

Diante de todas as intercorrências relacionadas às técnicas convencionais de castração, inúmeras pesquisas recentes têm avaliado a viabilidade e eficiência de técnicas de imunocastração para bovinos<sup>(1,15,16)</sup>, ovinos<sup>(17)</sup>, suínos<sup>(18,19)</sup> e equinos<sup>(20)</sup>, apresentando resultados promissores quanto à melhora de características produtivas e supressão das funções testiculares e do comportamento sexual.

Nesse contexto, em maio de 2011 foi implementada no Brasil a técnica de imunocastração, resultado de 24 estudos clínicos realizados Mundialmente envolvendo um total de 4620 animais.

O produto para imunocastração disponível comercialmente no país representa a Bopriva® (Zoetis, São Paulo, SP, Brasil), que corresponde a uma vacina anti-Hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) para uso em bovinos inteiros que se encontram em período reprodutivo.

Embora diversas vantagens possam ser apontadas para a utilização da vacina anti GnRH, questões como a indução de degeneração testicular e esterilidade dos animais tratados, interação entre o número de aplicações e a reversibilidade dos efeitos da imunocastração e efetividade para a promoção de esterilização quando utilizada em bovinos pré púberes permanecem sem uma definição clara na literatura, motivando a realização de novos estudos nessa importante área da reprodução e produção animal.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Espermatogênese**

Espermatogênese corresponde ao processo de produção intratesticular de espermatozoides. Este processo ocorre de maneira contínua nos testículos durante a fase ativa da vida sexual dos animais <sup>(21)</sup>.

A espermatogênese consiste em um processo de diferenciação no qual os gonócitos, que são as primeiras células germinativas a habitarem os túbulos seminíferos, multiplicam-se e diferenciam-se em espermatogônias tipo A1. A multiplicação mitótica das células A1 leva a formação das espermatogônias do tipo B. Estas, por sua vez, sofrem meiose, formando os espermatócitos primários e as espermatídes arredondadas, que se diferenciam posteriormente em espermatozoides capazes de realizar o processo de fertilização ovocitária <sup>(22)</sup>.

Tais modificações metamórficas sofridas pelas células testiculares primordiais são conhecidas também como espermiogênese. As células germinativas em desenvolvimento estão intimamente associadas às grandes células de Sertoli ou células sustentaculares que as envolvem durante o processo de diferenciação. O desenvolvimento da espermatogênese depende de vários fatores como suporte funcional das células de Sertoli, dos

níveis adequados de esteróides, gonadotrofinas e de fatores de crescimento <sup>(23)</sup>.

O processo de multiplicação, meiose e diferenciação das células germinativas em estádios mais avançados de desenvolvimento estão sincronizados com as mudanças morfológicas e a expressão gênica nas células de Sertolli e Leydig <sup>(24, 25)</sup>, além de importantes interações hormonais.

As gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) controlam a proliferação e a diferenciação das células de Sertolli e Leydig desde a fase pós-natal, de modo que os esteróides e fatores de crescimento secretados por estas células têm ação direta ou indireta sobre o desenvolvimento das células germinativas <sup>(22)</sup>.

Especificamente na espécie bovina, o início da puberdade está associado à habilidade das células de Leydig em responder ao estímulo do LH <sup>(26)</sup> produzindo quantidades crescentes de testosterona que, por sua vez, controlam a diferenciação das células de Sertolli e, conseqüentemente, várias de suas funções no desenvolvimento da espermatogênese <sup>(27)</sup>.

## **2.2 Circunferência escrotal (CE)**

De acordo com Dias et al. <sup>(28)</sup> a circunferência escrotal é um importante parâmetro de mensuração testicular para avaliação andrológica de touros, assumindo grande importância principalmente como ferramenta de seleção de reprodutores.

Pereira et al. <sup>(29)</sup> observaram correlações positivas e favoráveis entre os valores de CE de touros e as características reprodutivas de suas futuras filhas, demonstrando que a circunferência escrotal indiretamente também possui aplicabilidade como importante parâmetro de seleção reprodutiva de fêmeas.

A avaliação de CE é de fácil execução e alta repetibilidade, possuindo grande importância na determinação da fertilidade dos rebanhos, especialmente daqueles que utilizam a monta natural como estratégia de acasalamento <sup>(28)</sup>.

Segundo Kanazawa et al. <sup>(30)</sup> a mensuração de CE representa uma técnica precisa e altamente repetitiva quando executada com fita flexível própria, e suas medidas estão relacionadas com a quantidade de parênquima

testicular e túbulos seminíferos de um reprodutor, estruturas responsáveis pela produção de células de linhagem espermatogênica, nutrição e sustentação das células germinativas, síntese de proteínas e sinalizadores moleculares, além da produção de hormônios esteróides.

Em estudo conduzido por Silva et al.<sup>(31)</sup> foram observadas correlações negativas ( $p < 0,05$ ) entre CE e patologias espermáticas, demonstrando que a avaliação de circunferência permite não apenas a seleção de reprodutores com maior potencial de produção de espermatozoides, como também a seleção qualitativa de touros. No mesmo estudo foi observado que até os 18 meses de idade as medidas de CE tem correlação positiva com a motilidade espermática progressiva, demonstrando a aplicabilidade da avaliação para seleção de jovens reprodutores.

Resultados semelhantes foram reportados por Martinez et al.<sup>(32)</sup> que concluíram que a CE pode ser utilizada como parâmetro para a estimativa da quantidade e da qualidade do sêmen, porém não deve ser a única avaliação para a conclusão final sobre a qualidade de um reprodutor.

### **2.3 Imunocastração de bovinos com o uso de vacinas anti-hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).**

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é secretado pelo hipotálamo e se une ao seu receptor na hipófise, estimulando a secreção do hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). Estes são responsáveis pela atividade dos testículos e ovários e conseqüentemente, pelas funções reprodutivas<sup>(23)</sup>.

A vacina anti GnRH atua promovendo a formação de anticorpos que se ligam aos receptores hipofisários responsáveis pelo desencadeamento da liberação do LH e FSH, levando à queda dos níveis séricos de testosterona<sup>(16)</sup>. De acordo com Thun et al.<sup>(33)</sup>, o bloqueio da produção de testosterona persiste muito além do efeito antigênico promovido pela vacinação, sugerindo que a imunização não é baseada apenas na neutralização da atividade do GnRH, mas também pela diminuição da capacidade de resposta dos receptores testiculares aos efeitos das gonadotrofinas hipofisárias.

Claus et al.<sup>(34)</sup> reportaram que o retorno da atividade testicular em suínos imunizados contra o GnRH é precedido pelo aumento da pulsatilidade de LH. No entanto, mesmo com o aumento das concentrações séricas de LH, a retomada da esteroidogênese ocorre de maneira mais tardia e altamente variável entre os animais estudados, sugerindo a refratariedade das células de Leydig testiculares após a imunocastração.

Em estudo conduzido por Janett et al.<sup>(35)</sup> foi avaliada a resposta imune e endócrina de bezerros (3 a 6 semanas de vida) imunizados com vacina anti GnRH. Nesse trabalho foi observado que todos os bezerros tratados apresentaram baixos títulos de anticorpos anti-GnRH após a primeira imunização havendo, no entanto, um aumento significativo na concentração imunoglobulinas após a segunda aplicação (dose de reforço).

Amatayakul-Chantler et al.<sup>(15)</sup> observaram que após a aplicação da segunda dose da vacina anti GnRH, houve aumento significativo da titulação de anticorpos anti GnRH e paradoxalmente diminuição expressiva dos níveis séricos de testosterona nos bovinos imunizados. A manutenção de concentrações de testosterona abaixo de 0,5 ng/ml pode se manter por até 22 semanas após a vacinação de bezerros com vacinas anti-GnRH<sup>(35)</sup>.

Dessa forma, em virtude da imunoneutralização do hormônio liberador de gonadotrofinas ocorre à diminuição significativa dos níveis séricos de hormônios esteróides, bloqueio da gametogênese e atrofia gonadal<sup>(36)</sup>, trazendo uma série de benefícios como a melhora no comportamento animal (redução significativa da agressividade e comportamento de dominância), diminuição na manifestação das características sexuais masculinas (libido e sodomia) e melhora no rendimento e acabamento de carcaça<sup>(15)</sup>.

Andreo et al.<sup>(37)</sup> concluíram que a imunocastração realizada com a vacina Bopriva® é uma alternativa viável para evitar a orquiectomia cirúrgica convencional e para melhorar a qualidade da carne, favorecendo maior deposição de gordura e redução da força de cisalhamento da carne em relação aos animais inteiros.

A vacina Bopriva® destina-se à supressão imunológica temporária da atividade testicular de bovinos adultos e inteiros. No entanto, em estudo conduzido por Janett et al.<sup>(35)</sup> foi avaliado a resposta imune e endocrinológica de bezerros imunizados anti GnRH, onde o uso de duas doses de vacina

anti GnRH não foram capazes de induzir o quadro irreversível de degeneração testicular e esterilidade nos animais tratados, que entraram na fase de puberdade em média 3 semanas após o grupo controle não vacinado (50 v.s. 47 semanas, respectivamente).

De acordo com Amatayakul-Chantler et al.<sup>(38)</sup> a eficácia e duração da supressão de testosterona após a imunização de bovinos com vacinas experimentais anti-GnRH tem sido relatada como variável havendo, portanto, a necessidade de desenvolvimento de novos estudos nessa área.

## **2.4 Ultrassonografia testicular**

A ultrassonografia testicular tem se popularizado como técnica complementar ao exame andrológico de touros, sobretudo para avaliação de desordens subclínicas que podem comprometer a fertilidade<sup>(39)</sup>. A frequência do ultrassom utilizado em exames do trato reprodutivo de touros varia entre 5,0 a 7,5 MHz<sup>(40)</sup>.

A ultrassonografia de Modo-B é conhecida como “modo de brilho” ou “modo bidimensional”, sendo que a intensidade do eco pode ser visibilizada como pontos luminosos em um monitor de vídeo. Dessa forma, quanto maior a reflexão da onda sonora, mais intenso será o brilho do ponto luminoso, sendo a escala de cinzas, ou intensidade de pixels (IP), determinada pelas diferentes intensidades de brilho que são emitidas<sup>(41)</sup>.

A ultrassonografia testicular tem sido utilizado na avaliação andrológica, sendo a ecotextura testicular associada com a área e volume dos túbulos seminíferos, produção espermática e qualidade do sêmen de touros<sup>(40)</sup>.

Eilts e Pechman<sup>(42)</sup> demonstraram que a avaliação ultrassonográfica dos testículos bovinos fornece informações que contribuem para o aprimoramento da avaliação andrológica bovina, como a caracterização da morfologia testicular e análise objetiva das dimensões gonadais, que favorece a obtenção de informações relativas ao peso e volume testicular.

Através da análise computadorizada das imagens ultrassonográficas é possível à determinação da intensidade luminosa dos pontos brancos que formam a imagem (ecotextura e ecogenicidade), fornecendo informações

ainda mais detalhadas sobre a funcionalidade e integridade dos testículos (40,41).

Segundo Gabor et al.<sup>(39)</sup> o parênquima testicular encontra-se homogêneo e moderadamente ecogênico em animais pré-púberes; com a chegada da puberdade ocorre um aumento gradativo da ecogenicidade.

De acordo com Kastelic e Brito<sup>(40)</sup>, os pontos luminosos que formam as imagens ultrassonográficas podem ser classificados em uma escala de tons de cinza, onde cada unidade de imagem representa um pixel. Os conjuntos de pixels que representam a densidade do parênquima testicular podem ser agrupados na forma de histogramas, classificados em uma escala de tons de cinza que varia de 1 a 255, onde 1 corresponde a cor preta e 255 ao branco.

Para avaliação computadorizada dos histogramas e número de pixels de imagens ultrassonográficas podem ser utilizados softwares próprios para esse tipo de avaliação ou até mesmo pacotes computacionais destinados à avaliação e editoração de material fotográfico. Em estudo conduzido por Silva et al.<sup>(43)</sup> foi utilizado o software Adobe Photoshop 8.0 (San Jose, CA USA), que possui o recurso “histograma” para análise da intensidade de pixels de imagens em formato JPG. Nesse trabalho, tal recurso foi utilizado com sucesso para avaliação da densidade de imagens radiográficas de ossos de codorna recebendo diferentes níveis de fósforo na dieta. O mesmo recurso foi utilizado para avaliação de radiografias relacionadas à problemas endodônticos em humanos (CARVALHO et al., 2007)<sup>(44)</sup> e imagens ultrassonográficas de glândula tireoide de cães (MULLER, 2011)<sup>(45)</sup>, mostrando-se uma técnica precisa e de baixo custo para avaliação da ecogenicidade de imagens.

## **2.5 Biopsia aspirativa testicular**

De acordo com Papa e Leme<sup>(46)</sup>, a punção biopsia aspirativa (PBA) ou punção aspirativa por agulha fina (PAAF) corresponde a um método objetivo para o exame complementar do aparelho reprodutor masculino, recomendado para avaliação da saúde testicular e da espermatogênese. De acordo com os mesmos autores, o método é pouco invasivo, rápido e de fácil execução, permitindo a análise quantitativa dos diferentes tipos celulares que compõe a gônada masculina.

De acordo com Bastos et al.<sup>(47)</sup> a técnica de PBA é realizada através de punções testiculares com agulhas hipodérmicas, onde são realizadas leves escarificações para a colheita de material que é utilizado para produção de esfregaços em lâminas de vidro para avaliação sob microscopia de luz.

Além da análise celular quantitativa, a citologia por agulha fina permite a avaliação de danos e patologias testiculares, especialmente àquelas relacionadas a alterações neoplásicas ou degenerativas que resultam em quadros de oligospermia ou azoospermia<sup>(48)</sup>.

Com o objetivo de se determinar o impacto de punções sucessivas no testículo de gatos Gouletsou et al.<sup>(49)</sup> realizaram PAAF em 27 animais movimentando a agulha em 3 direções diferentes no testículo esquerdo e em 8 direções diferentes após a introdução no testículo direito. Através dos achados histológicos os autores concluíram que a punção representa um método seguro para a avaliação testicular e que o maior número de punções não aumentou a incidência ou severidade de lesões, restritas apenas há edema, hematoma e a dilatação do epidídimo, alterações restritas apenas ao trajeto percorrido pela agulha. Utilizando a ultrassonografia como método de avaliação e identificação das possíveis lesões causadas por punções testiculares em humanos Raviv et al.<sup>(50)</sup> concluíram que a PAAF é segura e pode ser utilizada repetidamente a cada 6 a 8 semanas. Resultados semelhantes foram reportados por Leme e Papa<sup>(46)</sup> que também concluíram que a PBA é segura para avaliação andrológica de garanhões.

A partir de esfregaços citológicos confeccionados com material recuperado de PBAs todas as células de linhagem espermatogênica podem ser visualizadas. No entanto, de acordo com Bastos et al.<sup>(47)</sup> os tipos celulares mais frequentes no exame citológico dos testículos de bovinos adultos e hípidos são as células de Sertoli e espermátides finais (31,15% e 61,05%, respectivamente) representando, portanto, marcadores da higidez e da maturidade reprodutiva de touros.

## 2.6 Interação entre ganho de peso e castração de bovinos

Muitos fatores como até mesmo o gênero do animal podem influenciar o ganho de peso e a qualidade da carne dos bovinos destinados ao abate <sup>(51)</sup>.

Ao avaliar o desenvolvimento de bovinos inteiros (que naturalmente produzem maiores quantidades de hormônios naturais como a testosterona) em condições de pastejo Restle et al. <sup>(52)</sup> observaram que os animais não castrados apresentaram maior ganho de peso médio diário (GPD) quando comparados aos animais castrados, resultados provavelmente associados ao efeito anabólico proporcionado pelos hormônios esteroides.

No entanto, a remoção total ou inibição temporária da função testicular proporcionada pela castração ou imunocastração podem proporcionar maior taxa de deposição de gordura na carcaça, trazendo benefícios qualitativos à produção de bovinos destinados ao abate. Nesse sentido, Amatayakul-Chantler et al. <sup>(38)</sup> observaram maior grau de marmoreio na carcaça de animais imunocastrados com Bopriva® em relação ao grupo controle composto por animais inteiros. Da mesma forma Andreo et al. <sup>(37)</sup> também observaram uma maior espessura de gordura em animais imunocastrados com Bopriva® em relação a bovinos não castrados, diferenças que foram atribuídas à supressão dos efeitos da testosterona proporcionada pela vacinação. Dessa forma, em virtude de exigências mercadológicas ou mesmo como estratégia para o aumento da deposição de gordura e melhora das características físicas e sensoriais da carne a imunocastração tem se tornado uma alternativa altamente viável do ponto de vista econômico, biológico e do bem-estar animal para terminação de bovinos de corte <sup>(38,53)</sup>.

## 3 OBJETIVOS

O experimento avaliou o efeito da vacina anti-GnRH sobre a circunferência e ecogenicidade testicular, além da produção e atividade espermatogênica de tourinhos mestiços que iniciaram a imunização aos 5 (G1) ou aos 9 meses de idade (G2), testando-se a hipótese de que a vacinação anti GnRH pode comprometer o desenvolvimento e diminuir o número de células primordiais testiculares, levando ao quadro irreversível de esterilidade quando realizadas 3 aplicações do produto. Adicionalmente, os possíveis efeitos da imunização e sua interação com a idade em que os

protocolos vacinais foram iniciados sobre o ganho de peso e performance produtiva de bovinos foram avaliados nesse estudo.

## **4 MATERIAL e MÉTODOS**

### **4.1 Local**

A pesquisa foi desenvolvida de forma multicêntrica junto ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade de Santo Amaro (UNISA) Campus I, São Paulo, SP, Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Severino Sombra (USS) Campus Experimental Vassouras, RJ, a empresa privada VetSemen® situada na Rua Capricórnio 64, Alphaville Conde I, Barueri, SP e a Fazenda São Fernando, Vassouras, RJ. Além disso, o projeto contou com o patrocínio do laboratório farmacêutico Zoetis (São Paulo, SP, Brasil) que forneceu as vacinas que foram utilizadas no estudo.

### **4.2 Animais e Tratamentos**

Foram selecionados 18 animais mestiços  $\frac{1}{2}$  Holandês preto e branco (HPB) e  $\frac{1}{2}$  Gir com idade média de 5 meses. Ao início do experimento todos os animais foram desmamados e agrupados em um mesmo piquete, tendo livre acesso à pastagem, fonte de água e suplemento mineral próprio para a idade e época do ano (creep feeding).

Durante a fase inicial de triagem os animais foram submetidos a exame clínico geral para constatação do estado físico e foram coletadas amostras de sangue por venopunção jugular para realização de hemograma completo. Adicionalmente, todos os bezerros receberam aplicação profilática de endectocida de amplo espectro de ação no início dos trabalhos experimentais.

Após a identificação através de brincos auriculares os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: Grupo Controle 5 meses de idade (GC, n=6), administração de 1 ml de solução salina pela via subcutânea (sc), 1 vez ao mês por 3 meses; Grupo tratamento 5 meses de idade (G1, n=6), administração de 1 ml de Bopriva®/sc 1 vez ao mês por 3 meses, com início imediato das vacinações; Grupo tratamento 9 meses (G2, n=6): vacinação

iniciada no momento em que os animais do G2 atingiram 9 meses de idade, recebendo administração de 1 ml de Bopriva®/sc 1 vez ao mês por 3 meses.



**Figura–1:** Bovinos machos, mestiços Holandês e Gir, utilizados durante todas as etapas da pesquisa conduzida na fazenda São Fernando, Vassouras, RJ. Fonte: O autor (2015).

#### **4.3 Avaliação da circunferência escrotal**

Todos os animais foram submetidos a exame clínico específico do aparelho reprodutor através de inspeção direta e palpação, de acordo com Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal <sup>(54)</sup>, além da medida de circunferência escrotal (CE) através de mensuração por meio de fita métrica posicionada na região de maior diâmetro do escroto. As mensurações de CE foram conduzidas mensalmente durante os 9 meses da fase de pesquisa de campo.



**Figura–2:** Exemplificação da metodologia utilizada para mensuração da circunferência escrotal de bovinos. Fonte: o autor (2015).

#### **4.4 Avaliação da ecogenicidade testicular**

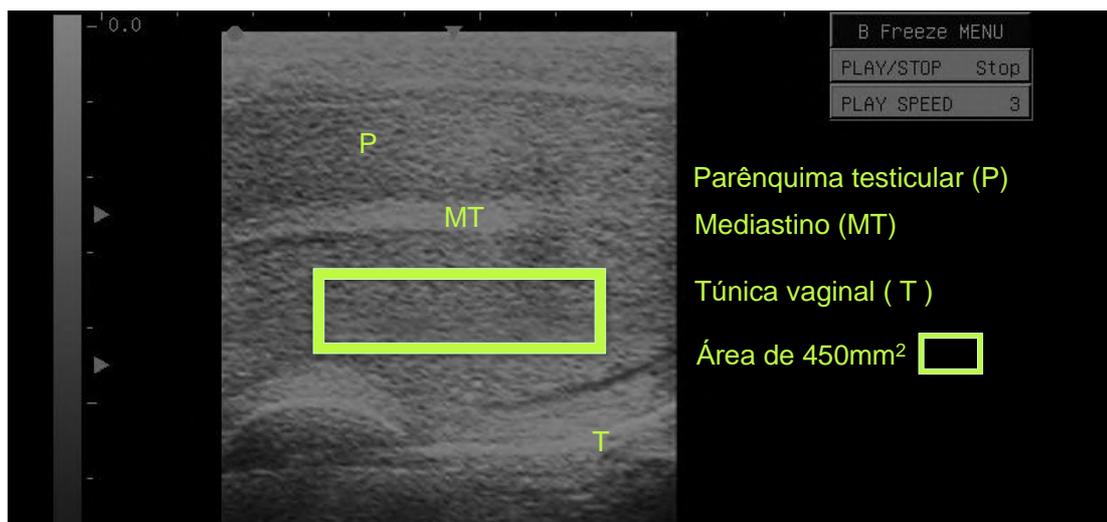
Avaliações ultrassonográficas foram conduzidas mensalmente durante 9 meses utilizando aparelho CHISON 600D (Wuxi, Jiang Su, China) dotado de probe linear com frequência de 5 MHz. Após a imobilização em tronco de contenção, foi aplicado gel acústico sobre o escroto para realização das varreduras ultrassonográficas em planos frontais de ambos os testículos.

As imagens geradas foram salvas no hardware do equipamento de ultrassonografia e posteriormente transferidas e salvas em formato JPEG para um computador.



**Figura–3:** Exemplificação de exame ultrassonográfico em plano longitudinal do testículo bovino utilizando probe linear com frequência de 5 MHz. Fonte: o autor (2015).

A avaliação de cada imagem recuperada foi realizada através do software computacional Corel Photo Paint X4® (Ottawa, Canadá) através do recurso “Histograma”. Dessa forma, em cada imagem ultrassonográfica foi selecionado um retângulo de  $450 \text{ mm}^2$ , paralelo ao mediastino testicular (Figuras 4 e 5), que foi submetido à análise de homogeneidade de ecotextura e quantificação da intensidade de pixels (IP), esta última variável definida como a média mais desvio padrão do número de pontos luminosos que compõe a escala de tons de cinza gerada pelo equipamento de ultrassonografia, podendo variar de 1 a 255, de acordo com Brito et al. <sup>(55)</sup> e Cardilli et al. <sup>(56)</sup>.



**Figura–4:** Exemplificação de imagem ultrassonográfica de testículo bovino gerada em plano longitudinal. Fonte: O autor (2015).

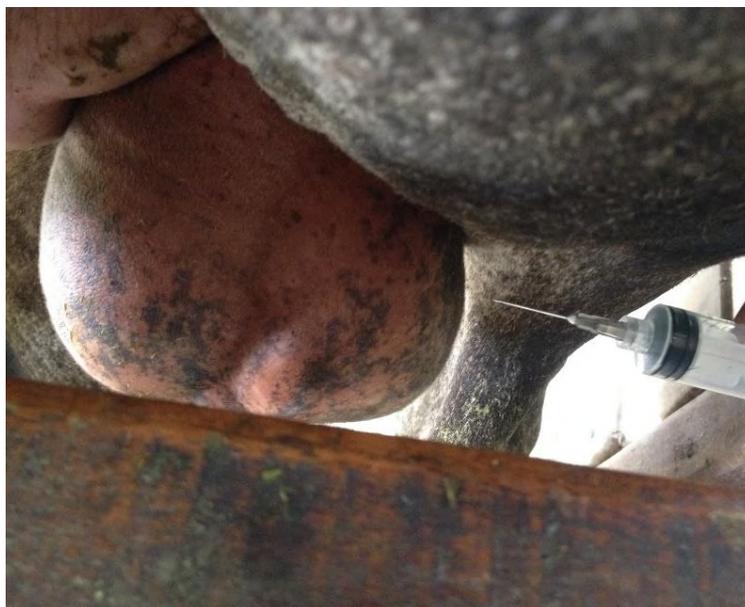


**Figura–5:** Exemplificação da imagem de área de parênquima testicular (retângulo de 450 mm<sup>2</sup>) obtida através de exame ultrassonográfico para análise da homogeneidade da ecotextura testicular e intensidade de pixels. Fonte: o autor (2015).

#### 4.5 Avaliação da citologia testicular

Para a avaliação da espermatogênese foram realizadas punções biópsias aspirativas testiculares através de agulhas finas (PAAF). As punções foram realizadas a cada 2 meses (n=5 PAAFs), sendo a 1<sup>a</sup> delas conduzida nos bezerros com 5 meses de idades (início do estudo), e subsequentemente com, sete, nove, onze e treze meses de vida em todos os animais incluídos na pesquisa. Para realização do procedimento os bovinos foram contidos em tronco próprio para a espécie e após a antissepsia da bolsa escrotal com solução de iodo povidine (Riodeíne®, São José do Rio Preto, SP, Brasil) foram conduzidas as PBAs através da inserção de agulhas 25x7 acopladas a

seringas descartáveis de 20 ml perpendicularmente ao parênquima testicular, em direção à região crânio lateral de cada testículo <sup>(46,47)</sup>.



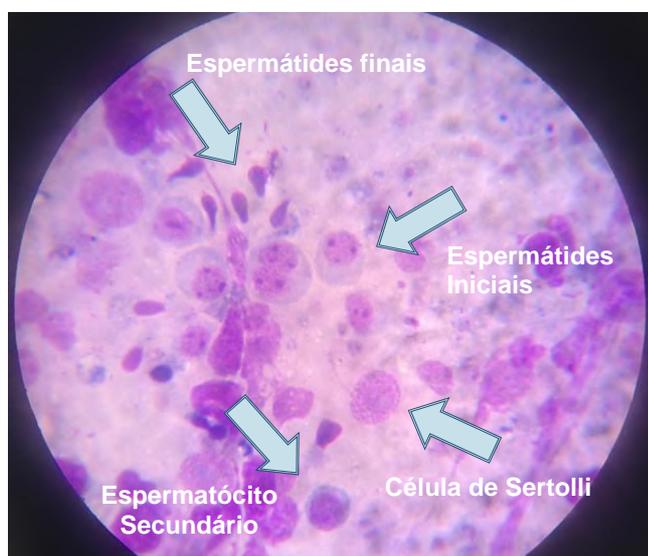
**Figura–6:** Técnica de PAAF realizada em plano perpendicular ao parênquima testicular bovino. Fonte: O autor (2015).

Após a completa inserção das agulhas no parênquima testicular foi realizada a completa tração do êmbolo das seringas para criar o vácuo necessário para a aspiração das células da linhagem espermatogênica. Após a introdução a agulha foi movimentada para fora e para dentro dos testículos duas a três vezes por aproximadamente quatro segundos, de acordo com protocolo descrito por Leme e Papa et al.<sup>(57)</sup>. Segundo os mesmos autores, essa técnica é eficiente para promover desalojamento celular, facilitando a sucção do material para dentro do canhão da agulha.

O conteúdo aspirado foi utilizado para confecção de esfregaços em lâminas foscas de vidro que posteriormente foram coradas com Giensa para avaliação em microscopia de luz <sup>(47)</sup>.

Cada amostra foi avaliada em duplicata onde foram contadas de forma consecutiva 200 células de linhagem espermatogênica que foram classificadas como espermatogônias; espermatócitos primários; espermatócitos secundários; espermátides iniciais; espermátides maduras

(células na fase de alongamento durante a espermiogênese); e células de Sertoli <sup>(46)</sup>.



**Figura–7:** Citologia obtida a partir de punção biópsia aspirativa testicular de bovinos. Aumento de 100x. Coloração: Giemsa. Fonte: O autor (2015).

#### 4.6 Avaliação do ganho de peso

Todos os animais foram pesados mensalmente durante os 9 meses de duração da pesquisa através do uso de balança eletrônica instalada na saída do tronco de contenção, sendo avaliado o ganho de peso médio diário (GPD) entre indivíduos de cada grupo. A partir da subtração da média de peso do início da pesquisa em relação ao peso ao final do experimento foi gerada a medida de ganho de peso total (GPT) para cada grupo experimental.

#### 4.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, USA, 2001), sendo primeiramente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e a homogeneidade das variâncias comparadas pelo Teste Qui-Quadrado (Comando SPEC do PROC GLM). Os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo (PROC GLM) onde foi verificado o efeito do tratamento e do momento do início do protocolo vacinal sobre as variáveis número de células de linhagem

espermática, circunferência escrotal, intensidade de pixels, ganho médio de peso diário e total. A média obtida para cada variável foi comparada entre os grupos utilizando o comando “LSMEANS” do SAS. Foi adotado o nível de significância de 5% para todas as análises realizadas.

## 5 RESULTADOS

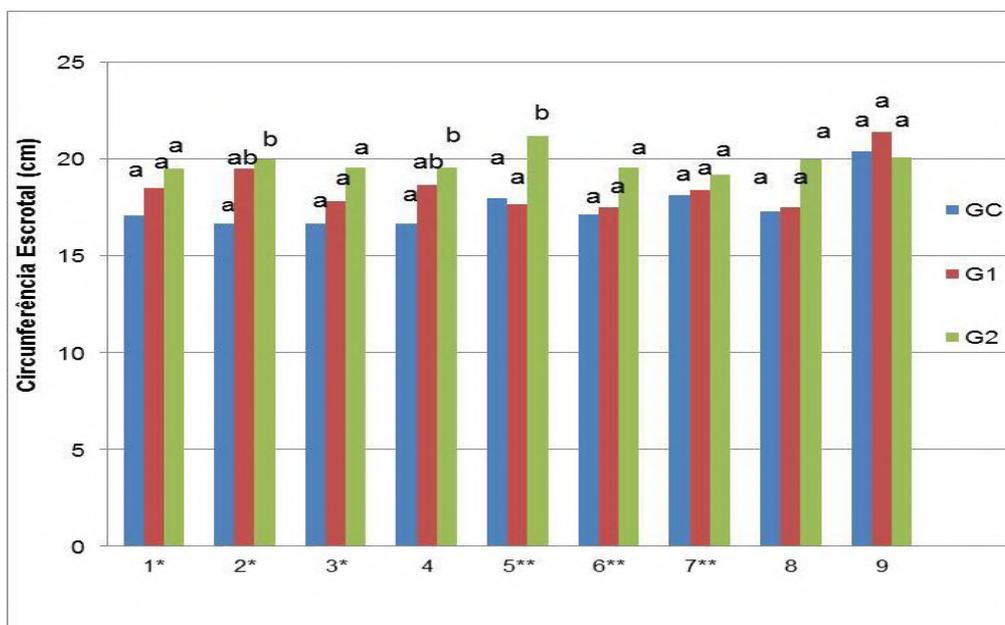
### 5.1 Circunferência Escrotal

Não foram observadas diferenças para a CE na primeira avaliação comparativa de circunferência ( $17,08 \pm 3,16^a$ ,  $18,50 \pm 1,51^a$  e  $19,50 \pm 2,23^a$ , respectivamente para GC, G1 e G2). No entanto, menores valores médios foram observados para os animais do grupo controle ( $17,66 \pm 1,75^a$ ) e do G1 ( $17,91 \pm 1,53^a$ ) em relação ao G2 ( $21,70 \pm 4,32^b$ ,  $p = 0,0286$ ) 5 meses após o início do experimento (Gráfico-1), período representado pelo término do protocolo vacinal dos animais pré-púberes do Grupo 1. Ao final das nove avaliações (animais com 14 meses de idade) não foram observadas diferenças entre os três grupos experimentais para a CE.

### 5.2 Ecogenicidade Testicular

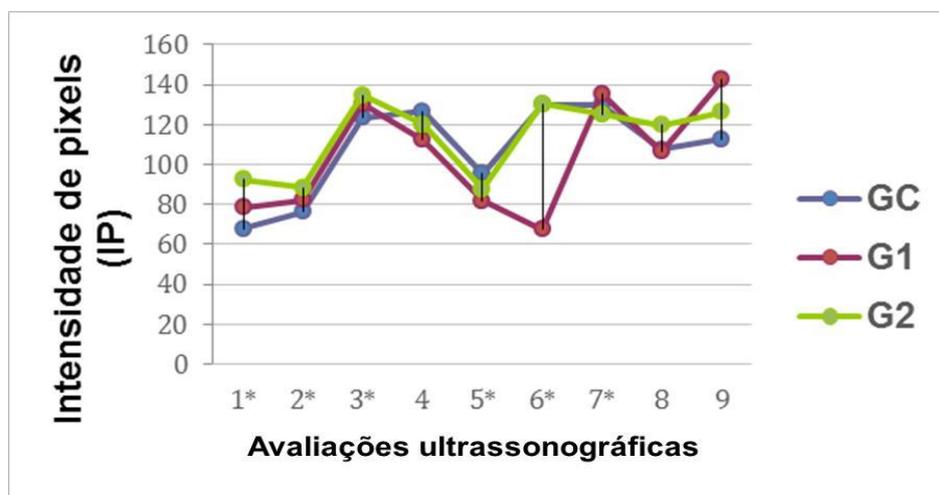
Com relação às avaliações ultrassonográficas não foram observadas diferenças entre os grupos no período inicial do estudo. Aos 6 meses de idade a ecogenicidade testicular média foi de  $77,00 \pm 15,84^a$ ,  $68,66 \pm 13,33^a$  e  $86,40 \pm 26,90^a$ , respectivamente para os grupos GC, G1 e G2 ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na ecotextura testicular dos animais quando alcançaram 7 meses de idade ( $123,50 \pm 12,88^a$ ;  $130 \pm 14,19^a$  e  $134,80 \pm 13,51^a$ ; respectivamente GC, G1 e G2  $p > 0,05$ ), independente do grupo experimental. Após a elevação inicial todos os grupos experimentais sofreram queda gradativa na intensidade de pixels, que teve maior amplitude nos animais do G1, coincidindo com o momento da 3ª dose da vacina anti-GnRH ( $67,66 \pm 12,95^a$ ,  $129,83 \pm 16,00^b$  e  $130,20 \pm 13,55^b$ , respectivamente para G1, GC e G2;  $p < 0,05$ ), de acordo com o Gráfico-2 (momento “6”).

**Gráfico-1:** Circunferência escrotal média dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 (G1) ou aos 9 meses de idade (G2). Letras diferentes (a,b) indicam as diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ), de acordo com cada momento experimental. Onde: “\*” vacinação do grupo G1 e “\*\*” vacinação do grupo G2.



Fonte: O autor (2015).

**Gráfico-2:** Ecotextura testicular (intensidade de pixels) média dos animais dos grupos controle (GC) e que receberam a vacina anti GnRH aos 5 ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente). Onde “\*” representa os momentos em que os animais do G1 (1, 2 e 3) e G2 (5, 6 e 7) foram vacinados.



Fonte: O autor (2015).

### 5.3 Citologia Testicular

Foram observadas variações no percentual médio de espermatogônias, espermatócitos primários, espermátides e células de Sertoli dentro de cada grupo experimental ao longo dos 9 meses da pesquisa ( $p < 0,05$ ).

Não foram observadas diferenças no percentual de espermatogônias testiculares comparando-se os três grupos experimentais durante a primeira PBA. No entanto, os animais que receberam a vacinação anti-GnRH com 5 meses de idade apresentaram menor proporção de espermatogônias recuperadas a partir da 2ª e 3ª punções (aos 7 e 9 meses de vida) em relação ao GC, enquanto que os animais vacinados no G2 apresentaram menor contagem para essa célula primordial na 2ª, 3ª e 4ª avaliações (animais com 7, 9 e 11 meses de idade; Tabela-1). Não foram observadas diferenças entre os grupos para o percentual de espermatogônias ao final do experimento.

**Tabela-1:** Percentual médio de espermatogônias obtidas a partir de punção biopsia aspirativa (PBA) testicular (n=5) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 (G1) ou aos 9 meses de idade (G2).

Número PBA	GC	G1	G2
1ª (início estudo)	19,25±3,34 <sup>a</sup>	20,41±3,92 <sup>a*</sup>	16,16±2,88 <sup>a</sup>
2ª (7 meses)	15,80±1,72 <sup>a</sup>	13,83±3,88 <sup>b*</sup>	10,50±3,75 <sup>b</sup>
3ª (9 meses)	16,91±2,15 <sup>a</sup>	11,41±2,45 <sup>b</sup>	11,30±5,85 <sup>b*</sup>
4ª (11 meses)	18,13±2,48 <sup>a</sup>	12,62±2,07 <sup>a</sup>	11,43±5,91 <sup>b*</sup>
5ª (13 meses)	14,83±3,20 <sup>a</sup>	13,50±4,84 <sup>a</sup>	11,37±5,88 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ( $p < 0,05$ ).

\*Animais submetidos à imunização anti-GnRH, de acordo com cada grupo experimental.

Fonte: O autor (2015).

Foram observadas diferenças significativas para a contagem de espermatócitos primários obtidos a partir da 3ª punção testicular, havendo uma menor proporção dessa linhagem celular no G1 (12,83±4,96) em relação ao G2 (30,34±19,65) e GC (22,91±4,17).

**Tabela-2:** Percentual médio de espermatócitos primários obtidos a partir de punção biópsia aspirativa testicular (n=5) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente).

Número PBA	GC	G1	G2
1 <sup>a</sup> (início estudo)	19,25±5,50 <sup>a</sup>	20,41±7,43 <sup>a*</sup>	20,48±5,45 <sup>a</sup>
2 <sup>a</sup> (7 meses)	24,26±4,72 <sup>a</sup>	18,08±4,70 <sup>a*</sup>	26,60±14,22 <sup>a</sup>
3 <sup>a</sup> (9 meses)	22,91±4,17 <sup>a</sup>	12,83±4,96 <sup>b</sup>	30,34±19,65 <sup>a*</sup>
4 <sup>a</sup> (11 meses)	21,10±5,68 <sup>ab</sup>	18,70±6,05 <sup>b</sup>	32,33±21,54 <sup>a*</sup>
5 <sup>a</sup> (13 meses)	25,66±7,69 <sup>a</sup>	22,50±7,83 <sup>a</sup>	31,37±20,60 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ( $p < 0,05$ ).

\*Animais submetidos à imunização anti-GnRH, de acordo com cada grupo experimental.

Fonte: O autor (2015).

Embora ao final do estudo não tenham sido observadas diferenças para a proporção de espermátides iniciais, houve uma grande variação inter grupos para o percentual médio dessa linhagem celular, apresentou maior variação média para animais que receberam a imunização anti-GnRH em relação aos bovinos pertencentes ao grupo controle não vacinado (Tabela-3).

**Tabela-3:** Percentual médio de espermátides iniciais obtidas a partir de PBA testicular (n=5) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente).

Número PBA	GC	G1	G2
1 <sup>a</sup> (início estudo)	28,57±5,56 <sup>a</sup>	26,08±4,24 <sup>a*</sup>	25,14±5,58 <sup>a</sup>
2 <sup>a</sup> (7 meses)	26,85±4,07 <sup>a</sup>	29,00±6,15 <sup>a*</sup>	29,60±3,52 <sup>a</sup>
3 <sup>a</sup> (9 meses)	28,83±3,32 <sup>ab</sup>	33,08±3,08 <sup>a</sup>	24,00±14,91 <sup>b*</sup>
4 <sup>a</sup> (11 meses)	32,83±2,78 <sup>a</sup>	29,31±3,60 <sup>ab</sup>	24,16±14,90 <sup>b*</sup>
5 <sup>a</sup> (13 meses)	26,91±5,05 <sup>a</sup>	27,16±10,53 <sup>a</sup>	24,08 <sup>a</sup> ±14,91 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ( $p < 0,05$ ).

\*Animais submetidos à imunização anti-GnRH, de acordo com cada grupo experimental.

Fonte: O autor (2015).

Não foram observadas diferenças para a contagem de células de Sertolli entre os grupos experimentais estudados, independente do momento experimental (Tabela-4).

**Tabela-4:** Percentual médio de células de Sertolli obtidas a partir de punção biopsia aspirativa testicular dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 meses ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente).

Número PBA	GC	G1	G2
1 <sup>a</sup> (início estudo)	23,89±8,99 <sup>a</sup>	29,50±10,46 <sup>a*</sup>	28,10±8,58 <sup>a</sup>
2 <sup>a</sup> (7 meses)	28,91±7,99 <sup>a</sup>	37,16±4,73 <sup>a*</sup>	33,30±12,53 <sup>a</sup>
3 <sup>a</sup> (9 meses)	29,25±4,27 <sup>a</sup>	35,15±4,73 <sup>a</sup>	31,90±8,92 <sup>a*</sup>
4 <sup>a</sup> (11 meses)	34,67±4,09 <sup>a</sup>	35,12±3,64 <sup>a</sup>	28,59±1,11 <sup>a*</sup>
5 <sup>a</sup> (13 meses)	32,50±4,89 <sup>a</sup>	36,83±5,56 <sup>a</sup>	30,25±5,02 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma linha indicam as diferenças estatísticas encontradas ( $p < 0,05$ ).

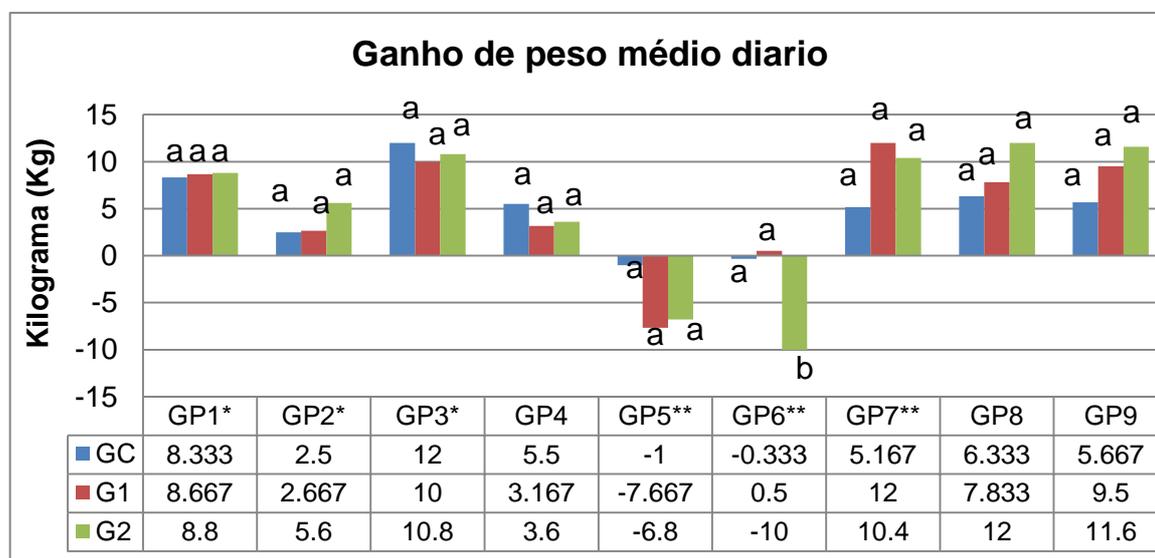
\*Animais submetidos à imunização anti-GnRH, de acordo com cada grupo experimental.

Fonte: O autor (2015).

#### 5.4 Ganho de peso

Animais dos três grupos experimentais iniciaram o estudo com mesma faixa de peso ( $p > 0,05$ ), vivenciando 3 meses subsequentes de GPD positivo e não sendo observadas diferenças entre os bovinos que receberam ou não a vacinação anti-GnRH. Foram observados valores negativos para o GPD nos dois meses subsequentes (momentos 5 e 6; Gráfico-3), fase em que os bezerros atingiram 9 a 10 meses de idade, sendo constatada perda expressiva de peso dos animais do G2 ( $p < 0,05$ ). Já durante o período final do experimento os três grupos apresentaram valores semelhantes para GPD.

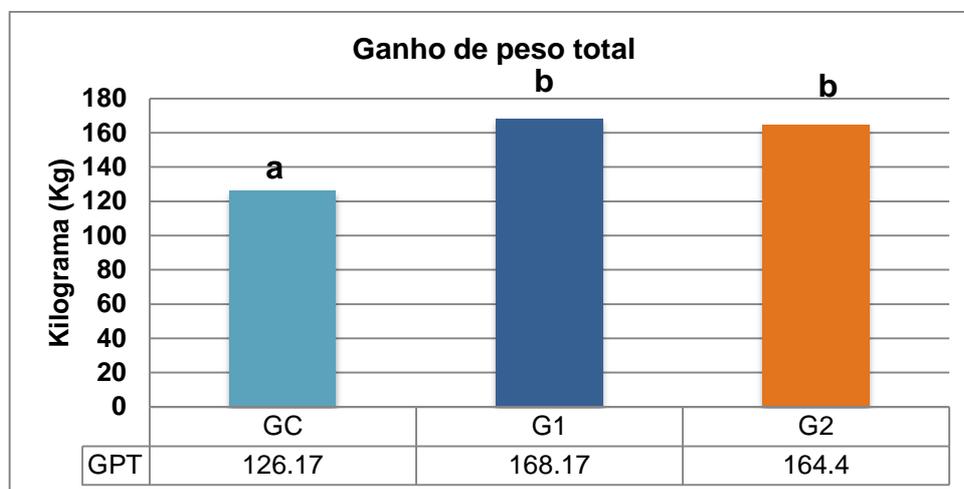
**Gráfico-3:** Ganho de peso médio diário (GPD) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti GnRH aos 5 meses ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente). Letras diferentes <sup>(a,b)</sup> indicam as diferenças encontradas em cada um dos momentos avaliados ( $p < 0,05$ ). \* Vacinação do grupo G1 e \*\* vacinação do grupo G2.



Fonte: O autor (2015).

Com relação ao ganho de peso total houve diferença significativa quando comparados os grupos G1 e G2 em relação ao controle, que apresentou o menor GPT no período ( $126,17 \pm 26,6^a$  Kg) em relação aos demais grupos avaliados (Gráfico-4).

**Gráfico—4:** Ganho de peso total (GPT) dos animais dos grupos controle (GC) e vacinados anti-GnRH aos 5 ou aos 9 meses de idade (G1 e G2, respectivamente). Letras diferentes <sup>(a,b)</sup> indicam as diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ).



Fonte: O autor (2015).

## 6 DISCUSSÃO

No presente experimento foi avaliado o efeito da vacina anti-GnRH sobre o desenvolvimento, arquitetura e ecogenicidade testicular, perfil espermatogênico e ganho médio de peso de bovinos pré (5 meses de idade) e peri-púberes (9 meses de idade) submetidos ao protocolo vacinal.

De acordo com Silva et al.<sup>(58)</sup>, para avaliar a capacidade reprodutiva de touros podem ser utilizados vários parâmetros como a mensuração testicular e a avaliação da qualidade do sêmen. Dentre estes parâmetros, a circunferência escrotal é o que possui maior correlação com o tamanho dos testículos e à quantidade em volume da área ocupada pelo parênquima testicular, responsável pela produção de andrógenos e espermatozoides.

O desenvolvimento testicular de bovinos durante a fase posterior a desmama é associado a diversos fatores como idade, raça, condições ambientais e regime nutricional, havendo correlação positiva entre o desenvolvimento do testículo e qualidade seminal na vida adulta (VASQUES et al., 2003).

De acordo com revisões de Thundathil et al.,<sup>(68)</sup> o desenvolvimento reprodutivo de bovinos envolve 3 períodos: fase de infância, pré-puberal e puberal. De acordo com os autores, as concentrações plasmáticas de LH e FSH atingem um pico em bovinos ao redor de 3 a 5 meses de idade, havendo um declínio expressivo até o nadir em animais ao redor de 25 semanas; esse declínio pode ser atribuído à produção de grandes quantidades de testosterona durante a fase pré-púbere, que exerce feedback negativo sobre o hipotálamo e hipófise. A elevação dos níveis de testosterona, por sua vez, possui correlação positiva e significativa com as concentrações plasmáticas<sup>(67)</sup>, demonstrando a dependência endócrina relacionada ao crescimento e diferenciação das células germinativas testiculares.

Nesse contexto, os menores valores médios para CE encontrados nos animais do G1 logo após o término do protocolo vacinal podem ser justificados pelos efeitos da própria vacinação anti-GnRH, que provavelmente levou à queda significativa das concentrações plasmáticas de testosterona e gonadotrofinas justamente na fase de maior importância desses hormônios para o desenvolvimento testicular inicial.

Tais resultados encontram-se em conformidade aos reportados por Janet et al.<sup>(35)</sup>, que concluíram que bovinos pré-púberes que receberam vacina anti-GnRH apresentaram menor circunferência testicular média em relação ao grupo de animais não vacinados. Janet et al.<sup>(20)</sup>, também associaram a diminuição nos níveis séricos de LH (e conseqüente diminuição da secreção de testosterona) com a interferência no desenvolvimento gonadal de animais imunocastrados.

O uso da vacina anti GnRH promove efeito sobre a espermatogênese através de uma diminuição dos níveis séricos de gonadotrofinas LH e FSH<sup>(20)</sup>. Segundo Adams et al.<sup>(59)</sup>, as gonadotrofinas atuam em várias etapas da espermatogênese. O LH atua no crescimento das gônadas e na secreção de testosterona e também age sobre a proliferação de espermatogônias; já o FSH promove auxílio na maturação dos espermátócitos, sendo essencial para o processo de diferenciação das células de linhagem espermática.

Possivelmente os efeitos da vacinação sobre a CE não foram observados nos animais do G2 em função do período em que o protocolo vacinal foi instituído. De acordo com Thundathill et al.,<sup>(68)</sup> crescimento testicular expressivo associado à diferenciação das células de Leydig adultas e células de Sertoli ocorre apenas por volta dos 8 a 10 meses de idade em bovinos. Dessa forma, como os animais do G2 receberam a 1ª dose da vacina anti-GnRH apenas aos nove meses de idade, a interferência da supressão endócrina foi menos evidente nesse grupo de animais, justificando os resultados obtidos em nossa pesquisa.

Adicionalmente os animais do grupo controle apresentaram menor circunferência escrotal em relação ao G2 em diversos momentos experimentais. Possivelmente esses resultados podem ser atribuídos a falhas na divisão dos grupos amostrais, já que os animais do GC apresentaram medidas de circunferência escrotal inicial inferior aos demais grupos experimentais. No entanto, tais diferenças foram transitórias, não sendo evidenciadas ao término do experimento.

O exame ultrassonográfico dos testículos corresponde a um método rápido e não invasivo que vem sendo implementado na rotina da avaliação andrológica de bovinos<sup>(71)</sup>. De acordo com Cardilli<sup>(56)</sup> representa um método valioso para o exame complementar à avaliação andrológica tradicional, correspondendo à técnica de maior importância para investigação de desordens subclínicas de bovinos.

Durante as avaliações ultrassonográficas iniciais (bezerros com 5 e 6 meses de idade) os animais dos 3 grupos experimentais apresentaram ecogenicidade moderada e ecotextura testicular homogênea ocorrendo, subsequentemente, o aumento significativo na intensidade de pixels na avaliação dos animais de todos os grupos. Resultados semelhantes foram reportados por Kastelic e Brito<sup>(40)</sup> e Brito et al.<sup>(55)</sup> que observaram o aumento significativo da ecogenicidade testicular de tourinhos de corte a partir de 26 a 30 meses de idade. Dessa forma, como nas duas primeiras avaliações de nosso estudo os animais se encontravam com cerca de 20 - 24 meses de idade e na 3ª e 4ª avaliações os bovinos já possuíam entre 28 a 32 meses de idade, conclui-se que o aumento de ecogenicidade do parênquima testicular ocorreu de forma fisiológica e semelhante ao reportado anteriormente pela

literatura, não havendo nenhum indicativo de influencia da vacinação anti-GnRH sobre a avaliação ultrassonográfica do testículo de bovinos pré-púberes.

Segundo Cardilli et al.<sup>(56)</sup> o parênquima testicular de bovinos jovens da raça Nelore é homogêneo e tem baixa ecogenicidade até o início da puberdade. Nesse sentido Brito et al.<sup>(55)</sup> destacaram que o aumento da ecogenicidade testicular em bovinos ocorre em função da diferenciação de células de Sertolli, formação da barreira hemato-testicular, aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos e rápida expansão de todas as linhagens de células germinativas responsáveis pelo estabelecimento da espermatogênese e início da puberdade. Dessa forma, pode-se concluir que os animais de todos os grupos experimentais encontravam-se em fase peri-púbere por volta do 7 ao 8 mês de vida.

De acordo com Brito et al.<sup>(55)</sup> e Aravindakshan et al.<sup>(11)</sup> a ecogenicidade testicular não sofre mudanças significativas após a puberdade. No entanto, menores valores médios de IP foram observados para os animais do G1 após a 3ª dose de vacina anti GnRH em relação ao GC e G2. Tais resultados nos permitem concluir que os animais que receberam a vacinação no período pré-púbere apresentaram um atraso no desenvolvimento do parênquima testicular, justificando a menor ecotextura da gônada masculina no mês subsequente ao término do protocolo vacinal do G1.

Avaliando histogramas testiculares Kastelic<sup>(40)</sup>, Brito<sup>(55)</sup> e Cardilli<sup>(56)</sup> propuseram que animais adultos que apresentam normalidade do parênquima testicular possuem ecotextura média  $\geq 100$  pixels. Nesse sentido, como todos os animais, independente do grupo experimental, apresentaram ecogenicidade testicular  $\geq 100$  pixels nas avaliações conduzidas no 11º, 12º e 13º mês de vida, conclui-se que os efeitos da vacinação sobre o desenvolvimento testicular foram transitórios mesmo nos animais pré-púberes, que ao final do experimento apresentaram similaridade na densidade testicular em comparação aos animais não vacinados.

Uma das maneiras de se estudar a origem de possíveis falhas reprodutivas relacionadas à queda na produção espermática e espermatogênese corresponde ao emprego da análise citológica testicular a partir de punção biópsia aspirativa (PBA), recurso que permite a obtenção de

material celular diretamente do testículo, sem a necessidade de coleta do sêmen<sup>(46)</sup>.

Ao longo do experimento foram observadas diferenças para a contagem de células espermatogênicas obtidas pela PBA quando comparados os diferentes grupos em cada uma das 4 punções realizadas, como também para o percentual médio dos diferentes tipos celulares avaliados dentro de cada grupo.

De acordo com Aguiar et al.<sup>(22)</sup>, animais taurinos, saudáveis e pré-púberes (26 semanas de idade) apresentam proporção média de  $24,5 \pm 8,2\%$  de espermatogônias, valores que se assemelham aos resultados obtidos em nosso estudo durante a primeira avaliação citológica testicular conduzida nos bovinos com 5 meses de idade, independente do grupo experimental. De acordo com Bagu et al., (2006), fisiologicamente ocorre uma rápida proliferação de pré-espermatogônias e espermatogônias testiculares até o 5<sup>o</sup> mês de vida de bezerras, havendo posterior queda gradativa na contagem dessa linhagem testicular. Tais resultados também se assemelham ao padrão observado em nosso estudo, onde todos os grupos experimentais exibiram queda significativa da contagem de espermatogônias em relação à primeira avaliação conduzida aos 5 meses de idade.

Embora não tenham sido observadas diferenças para o percentual de espermatogônias testiculares comparando-se os três grupos experimentais durante a primeira rotina de PBA, queda significativa na contagem dessa linhagem celular foi associada à utilização da imunização anti-GnRH tanto no grupo que recebeu a vacinação na fase pré-púbere quanto no G2 onde a primeira aplicação ocorreu apenas aos 9 meses de idade.

De acordo com Bangu et al., 2006 naturalmente a concentração plasmática de testosterona aumenta em bovinos da 8<sup>a</sup> a 20<sup>a</sup> semana de vida, declinando até a 28<sup>a</sup> e subsequentemente aumentando significativamente a partir da 28<sup>a</sup> a 32<sup>a</sup> semana. Dessa forma, é possível concluir que os efeitos da vacinação coincidiram com o provável início da ascensão fisiológica dos níveis de testosterona dos animais do G1 (animais receberam a última dose de vacina com 28 semanas ou 7 meses) e com o platô de produção e secreção desse hormônio nos animais do G2. Nesse sentido, levando-se em consideração que a espermatogênese não se processa de forma integral e

fisiológica na ausência de concentrações adequadas de testosterona (O'Hara e Smith, 2015), se justificam os menores valores médios para a contagem de espermatogônias para os animais que receberam a imunização anti-GnRH.

Conclusões semelhantes podem ser estabelecidas para justificar os menores valores para a contagem de espermatócitos secundários (após o final do protocolo vacinal do G1) e espermátides finais (início e fim do protocolo de imunização dos animais do G2) obtidos a partir da PBA testicular de animais que receberam a vacinação anti-GnRH.

De acordo com Aguiar et al. <sup>(22)</sup>, fisiologicamente ocorre aumento do percentual de espermatócitos primários entre 26 a 30 semanas de vida de bovinos, sendo um parâmetro importante que serve como marcador para a normalidade do processo de espermatogênese <sup>(53)</sup>. Dessa forma, fica claro que a interferência na espermatogênese em relação aos espermatócitos secundários foi mais evidente no grupo G1, que naturalmente recebeu a vacinação anti-GnRH no período coincidente com o aumento fisiológico da proporção dessa linhagem espermatogênica.

Por outro lado, não houve efeito da administração de vacina anti-GnRH quando conduzida em animais pré-púberes em relação à contagem de espermátides finais. Provavelmente como essa linhagem celular naturalmente se torna prevalente no testículo bovino a partir de 11 a 13 meses de idade (APONTE et al., 2005), a inibição esteroideogênica promovida pela vacinação não foi capaz de alterar o grau de maturação dessas células após a puberdade. Por outro lado, a vacinação do G2, por coincidir justamente com a fase de maior produção de espermátides, promoveu queda significativa dessa linhagem de célula germinativa em relação aos demais grupos estudados, demonstrando haver interação entre o efeito da imunização em relação ao período em que a vacina foi utilizada.

Nesse sentido, como a formação de espermátides representa um importante marcador para a normalidade da espermatogênese e saúde testicular<sup>(60)</sup>, pode-se concluir que a vacinação anti-GnRH foi capaz de alterar a diferenciação desse padrão celular apenas em animais imunizados próximo ao período esperado para ocorrência da puberdade.

De acordo com Xu et al.<sup>(61)</sup> as células de Sertoli provem suporte nutricional e hormonal aos túbulos seminíferos e espermatídes em desenvolvimento, sendo imprescindíveis para a espermatogênese .

Sinowatz e Amselgruber <sup>(62)</sup> postularam que as células de Sertoli não sofrem diferenciação após os 5 meses de idade na espécie bovina, havendo, segundo Curtis e Amann <sup>(63)</sup> o decréscimo dessa linhagem celular a partir da 20ª semana de idade em touros holandeses. Contraditoriamente em nosso estudo não foi observado o decréscimo na contagem de células de Sertoli, que se mantiveram estáveis e com tendência a pequena elevação em todos os grupos estudados. De acordo com revisões de Bagu et al., (2006) se supõe que a testosterona promova o estímulo para a diferenciação das células diploides imaturas (células de Sertoli imaturas) para células de Sertoli maduras no testículo de bezerros. No entanto, em virtude da dificuldade de realização da diferenciação do grau de maturidade celular das células de Sertoli através do exame citológico obtido por PBA a redução fisiológica (grupo controle) ou alteração induzida pela vacinação anti-GnRH (G1 e G2) não foram observadas, justificando a leve tendência de elevação no percentual médio dessa célula espermatogênica.

Muitos aspectos relacionados ao efeito da imunização anti-GnRH sobre a espermatogênese de bovinos, especificamente sobre o grau de interferência na diferenciação de cada linhagem celular, ainda não apresentam uma definição clara na literatura. Nesse contexto, outra explicação possível para a estabilidade no percentual de células de Sertoli mesmo nos grupos de animais tratados pode estar relacionada à menor dependência esteroidogênica dessa linhagem celular e/ou maior resistência mesmo em condições de baixo aporte de hormônios gonadotróficos.

Utilizando irradiação como método de preparo de receptores para células tronco testiculares Herrid et al.,<sup>(69)</sup> observaram maior redução do número de espermatogônias em relação à contagem de células de Sertoli de animais submetidos à radioterapia, demonstrando maior resistência das células estruturais em relação às células germinativas primordiais mesmo frente a um desafio degenerativo.

De acordo com Leng<sup>(64)</sup>, com a chegada da estação seca as pastagens tropicais apresentam rápido decréscimo em seus teores de

digestibilidade e conteúdo total de nitrogênio, levando a uma perda de produtividade. Durante os três meses iniciais do estudo os animais dos três grupos apresentaram GPD positivo. No entanto durante os dois meses subsequentes os animais apresentaram valores negativos para essa variável. Essa redução nas taxas de desenvolvimento corpóreo coincidiu com o início da estação de seca (meses de outono/inverno), interferindo negativamente no desempenho dos animais do experimento.

Embora não tenha sido analisada a qualidade bromatológica e os níveis nutricionais das pastagens, os valores negativos para GPD justificariam a suplementação dos animais nessa fase do estudo, permitindo a manutenção do escore de condição corporal e ganhos positivos de peso nesse período. No entanto, tendo em vista que o aumento da densidade energética e aporte nutricional de bezerros pode acelerar a entrada na puberdade, aumentando as secreções de LH hipofisário e garantindo maior desenvolvimento testicular <sup>65</sup>, optou-se por não realizar uma suplementação, evitando-se possíveis interferências no protocolo experimental.

Após o sétimo mês do experimento os três grupos apresentavam GPD positivo e ao final do experimento os animais imunocastrados (grupos G1 e G2) apresentaram um maior ganho de peso total em relação aos animais do grupo controle.

Comparando animais imunocastrados com bovinos castrados cirurgicamente Amatayakul-Chantler et al. <sup>(38)</sup> observaram maior ganho de peso e também maior área de olho de lombo para animais vacinados em relação aos submetidos à orquiectomia convencional. Como convencionalmente se realiza a imunização anti-GnRH em animais adultos, os níveis séricos de testosterona permanecem elevados durante a maior parte da vida produtiva do animal, exercendo efeito anabólico direto sobre o crescimento corpóreo e produção de fibras musculares, o que justifica os benefícios da vacinação como estratégia para promover maior ganho de peso animal. Nesse sentido, como em nosso experimento os animais do grupo G2 foram vacinados apenas aos 9 meses de idade, houve o máximo benefício em termos de crescimento corpóreo e ganho de peso em relação aos animais do G1, onde a supressão da testosterona ocorreu mais precocemente.

De acordo com Freitas et al.,<sup>(70)</sup> o propósito da castração é reduzir os problemas de manejo relacionados à agressividade e comportamento sexual, tornando os animais mais dóceis e mitigando condutas sexuais como a sodomia, que podem comprometer a produção de bovinos do ponto de vista qualitativo e quantitativo. Tal comprometimento produtivo dos animais inteiros ficou evidente em nosso estudo, já que os bovinos do grupo controle apresentaram o pior desempenho para ganho de peso durante o período avaliado. De acordo com Andreo et al.,<sup>(37)</sup> maior maciez e quantidade de gordura podem ser atribuídos a carne de animais imunocastrados, o que justifica os benefícios da vacinação anti-GnRH não apenas em termos quantitativos mas também qualitativos da produção de bovinos de corte.

## **7 CONCLUSÕES**

A vacinação anti GnRH exerce influencia temporária e transitória sobre o desenvolvimento gonadal e espermatogênese de bovinos pré púberes, sendo que os efeitos vacinais são mais expressivos nos animais com 5 meses de idade em relação àqueles que iniciam o protocolo vacinal apenas aos 9 meses de vida. A interferência sobre o desenvolvimento reprodutivo pode ser avaliada objetivamente através da mensuração de circunferência escrotal, ultrassonografia testicular e punção aspirativa para avaliação da espermatogênese. A vacinação pode promover maior ganho de peso animal possivelmente por inibir a atividade sexual após a puberdade, resultando em maior direcionamento animal para engorda em detrimento à expressão de libido e características sexuais secundárias.

## 8 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA




**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**  
 Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais

---

**PARECER N.º 04 /2014**

**REGISTRO CEP UNISA N.º 04 /2014 – PROJETO DE PESQUISA**

**Projeto de Pesquisa:** "Efeito da Imunização Anti Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GNRH) sobre o desenvolvimento Testicular, Perfil Endócrino e Espermatogênese de Bovinos Pré Púberes"

**Pesquisadores Responsáveis:** André Maciel Crespilho  
 Cristiano Silva Ferreira

**Curso:** Medicina Veterinária

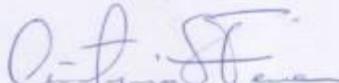
Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), esta de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca) que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, manifestando-se pela **APROVAÇÃO AD REFERENDUM** do Projeto "Efeito da Imunização Anti Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GNRH) sobre o desenvolvimento Testicular, Perfil Endócrino e Espermatogênese de Bovinos Pré Púberes"

**\* Prezados Pesquisadores o CEUA solicita:**

- Relatório da pesquisa ao término do prazo estipulado no cronograma do projeto.



## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miguel GZ, Roca, RO, Suman SP, Faria MH, Santos CT, Resende FD, Siqueira GR, Su LS. Immunocastration and surgical castration improves color attributes of beef from Nellore males. *Meat Science*. 2014; 96: 884-891.
2. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brasil). Censo. Agropecuário. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). 2010; 5
3. Coetzee JF, Edwards LN, Mosher RA, Bello NM, O'connor A, Wang B, Kukanich B, Blasi DA. Effect of oral meloxicam on health and performance of beef steers relative to bulls castrated on arrival at the feedlot. *Journal of Animal Science*. 2012; 90: 1026-1039.
4. Silva LAF, Costa AC, Soares LK, Borges NC, Ferreira JL, Cardoso LL. Orquiectomia em bovinos empregando abraçadeira de nylon na hemostasia preventiva: Efeito da estação do ano, método de contenção e técnica cirúrgica. *Ciência Animal Brasileira*. 2009; 10: 1 261-270.
5. Pieler D, Wohlsein P, Peinhopf W, Aurich JE, Erber R, Ille N, Baumgärtner W, Aurich C. Endocrine testicular function and spermatogenesis persists in calves after partial scrotal resection but not burdizzocastration. *Theriogenology*. 2014; 81: 9 1300-1306.
6. D'occhio MJ, Aspen WJ, Trigg T E. Sustained testicular atrophy in bulls actively immunized against GnRH: potential to control carcass characteristics. *Animal Reproduction Science*. 2001; 66: 47-58.
7. Biagini D, Lazzaroni C. Effect of pre- and post-pubertal castration on piemontese male calves: I. live and slaughtering performances. *Livestock Science*. 2007; 110:181–186.

8. Knight TW, Cosgrove GP, Lambert MG, Death AF. Effects of method and age at castration on growth rate and meat quality of bulls. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 1999; 42: 255–269.
9. Bretschneider G. Effects of age and method of castration on performance and stress response of beef male cattle: A review. *Livestock Production Science*. 2005; 97:89-100.
10. Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on high nutrition allowance. *Journal of Animal Science*. 1965; 24: 761–765.
11. [Aravindakshan JP](#), [Honaramooz A](#), [Bartlewski PM](#), [Beard AP](#), [Pierson RA](#), [Rawlings NC](#). Of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology*. 2000; [54: 339–354](#).
12. Lazzaroni C, Biagini D. Effect of pre- and post-pubertal castration on Piemontese male cattle II: Carcass measures and meat yield. *Meat Science*. 2008; 80: 442 – 448.
13. Capucille DJ, Poore MH, Rogers GM. Castration in cattle: techniques and animal welfare issues. *Compendium of Continued Education*. 2002; 24:66-72.
14. Ferreira CS, Caldas AFS, Abreu APM, Sartori F, Ferreira AP, Gomes GM, Junior KCP, Crespilho AM. Evaluation of nylon cable ties as an alternative method of preventive hemostasis for bovine orchiectomy. *Andrology*. 2015; 4:149.
15. Amatayakul-Chantler SA, [Jackson JA](#), [Stegner J](#), [King V](#), [Rubio LM](#), [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*. 2012; 90: 3718-3728.

16. Janett F, Gerig T, Tschuor AC, Amatayakul-Chantler S, Walker J, Howard R, Bollwein H, Thun R. Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. *Theriogenology*. 2012; 78:182-188.
17. Kiyama Z, Adams TE, Hess BW, Riley ML, Murdoch WJ, Moss GE. Gonadal function, sexual behavior, feedlot performance, and carcass traits of ram lambs actively immunized against GnRH. *Journal Animal Science*. 2000;78: 2237– 43.
18. Font-I-Furnols M, Gispert M, Soler J, Diaz M, Garcia-Regueiro JA, Diaz I, Pearce MC. Effect of vaccination against gonadotrophin-releasing factor on growth performance, carcass, meat and fat quality of male duroc pigs for dry-cured ham production. *Animal Reproduction Science*. 2009; 115: 88–102.
19. 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*. 2013; 142:3 149-159.
20. 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*. 2009; 115: 88–102.
21. Filho WCM. Espermatogenese em bovinos [monografia]. São Paulo: Universidade estadual de São Paulo, faculdade de Medicina veterinaria e zootecnia da Unesp. 2006; 21p.
22. Aguiar GV, Araújo AA, Moura AAA. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2006; 35: 4 1629-1638.

23. Hafez e Hafez. Reprodução Animal. 7.ed.São Paulo: Manole; 2004: 514.
24. Anway MD, Li Y, Ravindranath N. Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis. *Journal of Andrology*.2003; 24: 2 173-184.
25. Walker WH. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*. 2003; 144: 9 3719-3721.
26. Boockfor FR, Barnes MA, Dickey JF. Effects of unilateral castration and unilateral cryptorchidism of the holstein bull on in vitro leydig cell response. *Journal of Animal Science*.1983; 56: 1386-1392.
27. Griffin JE. Male reproductive function. In: Griffin JE, Ojeda SR. Eds. Text book of endocrine physiology. 1988; 165-185.
28. Dias JC, Andrade VJ, Filho VRV, Silva MA. Biometria testicular e aspectos andrológicos de touros nelore (*bostaurus indicus*), de dois e três anos de idade, criados extensivamente. *Veterinária Notícias*. 2007; 13: 2.
29. Pereira E, Eler JP, Ferraz, JBS. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*.2000; 29: 6 1676-1683.
30. Kanazawa MY, Scott C, Wilges CHM, Dias LGGG, Souza FF. Correlação da circunferência escrotal, citologia testicular e parâmetros do sêmen do epidídimo de touros. *Enciclopédia Biosfera*.2012; 8 15 517-527.
31. Silva AEDF, Unanian MM, Cordeiro CMT, Freitas AR. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2002; 31:3 1157-1165.

32. Martinez MI, Verneque RS, Teodoro R, L Paula LRO, Cruz M, Campos JP, Rodrigues LH, Oliveira J, Vieira F, Bruschi JH, Durã ESMC. Correlações entre características da qualidade do sêmen e a circunferência escrotal de reprodutores da raça Gir. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2000; 29: 700-706.
33. Thun R, Leuch F, Eggenberger E, Zerobin K. Plasma testosterone concentrations in bulls with intact and shortened scrotums during sexual maturation. *Biol. Reprod.* 1980; 22: 765–771.
34. Claus R, Rottner S, Rueckert C. Individual return to Leydig cell function after GnRH-immunization of boars. *Vaccine*. 2008; 26: 4571–4578.
35. Janett F, Gerig T, Tschuor AC, 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 pre pubertal bull calf. *Animal Reproduction Science*. 2012; 131: 72-80.
36. Ferro VA, Khan MAH, Latimer VS, Brown D, Urbanski HF, Stimson WH. 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*. 2001; 51: 109–129.
37. Andreo N, Bridi A M, Tarsitano M A, Peres L M, da Costa BA P A, de Andrade E L, Prohmann P E F. Influência da imunocastração Bopriva® no ganho de peso, características de carcaça e qualidade da carne de bovinos Nelore. *Semina: Ciências Agrárias*. 2013; 34: 6 2 4121-4132.
38. Amatayakul-Chantler S, Hoe F, Jackson JA, Roça RDO, Stegner J E, King V, 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*. 2013; 95:1 78-84.

39. Gabor G, Sasser RG, Kastelic JP, Mezes M, Falkay G, Bozo S, Csik JV, Barany I, Hidas A, Szasz F Jr, Boros G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. *Theriogenology*. 1998; 50: 223–228.
40. Kastelic JP, Brito LFC, *Ultrasound Monitoring of Reproduction in Bulls*. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47: 3 45–51.
41. Chandolia RK, Honaramooz A, Omeke BC, Pierson R, Beard AP, Rawlings NC. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*. 1997; 48: 119- 132.
42. Eilts BE, Pechman RD. B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology*. 1988; 30: 1169-1175.
43. Silva RMD, Furlan AC, Ton APS, Martins EN, Scherer C, Murakami AE. Exigências nutricionais de cálcio e fósforo de codornas de corte em crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2009; 38: 8 1509-1524.
44. Carvalho FB, Gonçalves M, & Tanomaru-Filho, M. Evaluation of chronic periapical lesions by digital subtraction radiography by using Adobe Photoshop CS: a technical report. *Journal of endodontics*. 2007; 33: 4 493-497.
45. Muller T R. Avaliação ultrassonográfica da glândula tireóide em cães hípidos de diferentes faixas etárias. Botucatu, 2011. 72p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2011.

46. Papa FO, Leme DP. Testicular fine needle aspiration cytology from a stallion with testicular degeneration after external genitalia trauma. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2002; 22: 3 121-124.

47. Bastos YHGB, Ferreira CS, Gomes GM, Jr KCP, Gomes LPM, Papa FO, Crespilho AM. Avaliação de diferentes técnicas de coloração para esfregaços obtidos por punção biópsia aspirativa testicular de bovinos. *Revista Saúde*. 2015; 6: 2 5-10.

48. Ahmed BSH. "Testicular Fine Needle Aspiration Cytology versus Open Biopsy in the Evaluation of Azoospermic Men". *Open Journal of Urology*. 2015; 5: 9 133.

49. Gouletsou P G. Galatos A D. Sideri AI. Kostoulas P. Impact of fine needle aspiration (FNA) and of the number of punctures on the feline testis: Clinical, gross anatomy and histological assessment. *Theriogenology*. 2012; 78:172-181.

50. Raviv G, Levron J, Menashe Y, Bider D, Dor J, Ramon J, et al. Sonographic evidence of minimal and short-term testicular damage after testicular sperm aspiration procedures. *Fertility and Sterility* 2004; 82:442– 4.

51. Lawrie R A. *Ciência da carne*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384 p.

52. Restle J, Vaz FN, Feijó GLD, Brondani IL, Alves DCF, Bernardes RAC, Pacheco PS. Características de carcaça de bovinos de corte inteiros ou castrados de diferentes composições raciais charolês x nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2000; 29 5 1371-1379.

53. Freitas AD, Restle J, Pacheco PS, Pádua JT, Lage ME, Miyagi ES, Silva GD. Características de carcaças de bovinos Nelore inteiros vs castrados em duas idades, terminados em confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2008; 37: 6 1055-1062.

54. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

55. Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls. *Theriogenology*. 2012; 78: 69–76.

56. Cardilli DJ, Toniollo GH, Pastore AA, Canola JC, Mercadante ME, Z Oliveira J A. Padrão ultrassonográfico do parênquima, mediastino e túnicas testiculares em bovinos jovens da raça nelore. *Ciência Animal Brasileira*. 2010; 11: 4, 899-905.

57. Leme DP, Papa FO. How to perform and interpret testicular fine needle aspiration an stallions. *Journal Of Equine Veterinary Science*. 2010; 30: 590-596.

58. Silva AEDF, Unanian MM, Cordeiro CMT, Freitas AR. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade does sêmen em touros da raça Nelore, PO. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2002; 31: 3 1157-1165.

59. Adams, Thomas E. "Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. *Animal Reproduction Science*. 2005; 88:1 127-139.

60. Garolla A, Selice R, Engl B, Bertoldo A, Menegazzo M, Finos L, Lenzi A, Foresta C. Spermatid count as a predictor of response to FSH therapy. *Reproductive Biomedicine Online*. 2014; 29: 1102-112.

61. Xu B, Chen M, Ji X, Yao M, Mao Z, Zhou K, Xia Y, Han X, Tang W. Metabolomics profiles reveal key metabolic changes in heat stress-treated mouse sertolli cells. *Toxicology in Vitro*. 2015; 29: 7 1745- 1752.

62. Sinowatz F, Amselgruber W. Post natal development of bovine sertolli cells. *Anatomy and Embriology*.1986; 174: 413- 423.
63. Curtis SK, Amann RP. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Animal Science*.1981; 53:6 1645-1657.
64. Leng R A, Nolan J V. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*.1984; 67: 5 1072-1089.
65. Dance A, Thundathil J, Wilde R, Blondin P, Kastelic J. Enhanced early-life nutrition promotes hormone production and reproductive development in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. 2015; 98:2, 987-998.
66. Vásquez L, Vera O, Arango J. Testicular growth and semen quality in peripuberal Brahman bulls. *Livestock Research for Rural Development*. 2003; 15:10.
67. Moura AA, Souza CEA, Erickson BH. Early prepubertal testis criteria, seminiferous epithelium and hormone concentrations as related to testicular development in beef bulls. *Animal Reproduction Science*. 2011; 124: 39–47.
68. Thundathil JC, Dance AL, Kastelic JP. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology*. 2016; 86: 397–405.
69. Herrid M, Daveya R, Stockwell S, Schmoelzi S, Uphill G, Poirier V, Hope M, Hill JR, Hollanda MK, Lehnert SA. Depletion of testis cell populations in pre-pubertal *Bos indicus* cattle by irradiation. *Animal Reproduction Science*. 2013; 141, 124–130.
70. Freitas VM, Leão KM, Araujo Neto FR, Marques TC, Ferreira RM, Garcia LLF, Oliveira EB. Effects of surgical castration, immunocastration and homeopathy on the performance, carcass characteristics and behaviour of feedlot finished crossbred bulls. *Semina*. 2015; 36:3, 1725-1734.
71. Tomlinson M, Jennings, A, Macrae A, Truylers I. The value of trans-scrotal ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. *Theriogenology*. 2017; 89: 169–177.