



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DE UMA OU DUAS DOSES DA VACINA ANTI GnRH NAS
CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DOS TESTÍCULOS EM TOUROS DA
RAÇA NELORE**

EMANUEL MOURÃO DOROTEU

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
OUTUBRO DE 2020



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE UMA OU DUAS DOSES DA VACINA ANTI GnRH NAS
CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DOS TESTÍCULOS EM TOUROS DA
RAÇA NELORE**

EMANUEL MOURÃO DOROTEU

ORIENTADOR: PEDRO MIGUEL OCAMPOS PEDROSO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 229D/2020

**BRASÍLIA/DF
OUTUBRO DE 2020**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DOROTEU, E.M. **Efeito de uma ou duas doses da vacina anti-GnRH nas características morfofuncionais dos testículos em touros da raça nelore.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2020, 49 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientado. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Doroteu, Emanuel Mourão.

Efeito de uma ou duas doses da vacina anti-GnRH nas características morfofuncionais dos testículos em touros da raça nelore [manuscrito] / Emanuel Mourão Doroteu. – 2020.

x, 49 p. : i

Orientador: Pedro Miguel Ocampos Pedroso
Tese (Doutorado) – Universidade de
Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Animais, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Sêmen. 2. Imunocastração. 3. Vacina. 4. Bovinos

I. Pedroso, Pedro. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE UMA OU DUAS DOSES DA VACINA ANTI GnRH NAS
CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DOS TESTÍCULOS EM TOUROS DA
RAÇA NELORE**

EMANUEL MOURÃO DOROTEU

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADO POR:

**Pedro Miguel Ocampos Pedroso, Prof. Dr. (Universidade de Brasília – UnB)
(ORIENTADOR)**

Rodrigo Arruda de Oliveira, Prof. Dr. (Universidade de Brasília – UnB)

**João Henrique Moreira Viana, Dr. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**Marília Viviane Snell de Oliveira, Prof. Dra. (União Pioneira de Integração Social -
UPIS)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA, 16 DE OUTUBRO DE 2020.

Dedico a Deus, pela força espiritual que me sustenta por essa longa estrada.

À minha esposa amada.

Aos meus heróis, meus pais.

Aos meus avós: Marcelino e Maria do Socorro *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

À minha família que mesmo pequena se mantém forte.

Ao Dr. João Henrique Moreira Viana por ter colaborado de forma fundamental com sua experiência.

Ao meu orientador, Pedro Miguel Ocampos Pedroso, por ter aceitado esta empreitada.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 OBJETIVOS GERAIS	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 APARELHO REPRODUTOR MASCULINO	5
Anatomia e morfologia funcional dos testículos	5
BASES FISIOLÓGICAS	6
Controle neuroendócrino da espermatogênese	6
O mecanismo da espermatogênese	7
Células de Sertoli	8
Células de Leydig	9
Ciclo Espermatogênico	10
2.2 A UTILIZAÇÃO DA VACINA ANTI-GnRH	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO 2	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES	25
2.1.1 Delineamento experimental	25
2.1.2 Biometria testicular e qualidade do sêmen	26
2.1.3 Concentração de testosterona no soro sanguíneo	26
2.1.4 Análise anatomopatológica	27
2.1.5 Análise estatística	27
3. RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 A-D - Parâmetros testiculares e testosterona sérica em touros imunizados contra GnRH uma vez (grupo 1), duas vezes (grupo 2) e controles (Grupo controle) 29

FIGURA 2 A-F - Parâmetros espermáticos e degeneração dos túbulos seminíferos de touros imunizados contra GnRH uma vez (grupo 1), duas vezes (grupo 2) e controles (grupo controle) 30

FIGURA 3 A – Células espermáticas normais no grupo controle. B – Alterações patológicas 90 dias no tratamento 31

FIGURA 4 - Características histológicas dos testículos (A-D) e dos epidídimos (E-F). (A) túbulos seminíferos ausentes de lesão (aumento de 40x). (B) Degeneração leve, grau 1 (aumento de 40x). (C) Degeneração moderada, grau 2 (aumento de 40x). (D) Degeneração severa, grau 3 (aumento de 40x), reduzido número de células germinativas, de Sertoli e de Leydig. (E) Ductos epididimários normais (aumento de 100x); lúmen ocupado por espermatozoides. Degeneração completa, grau 4 (F): Sem espermatozoides detectáveis nos ductos epididimários (aumento de 100x em microscopia óptica). 32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características de peso e carcaça de touros imunizados contra GnRH uma vez (Grupo 1), duas vezes (Grupo 2) e controles (Grupo Controle). 29

TABELA 2 - Associação entre o grau de degeneração dos túbulos seminíferos, após análise histopatológica, e outros parâmetros morfológicos e funcionais dos testículos. 31

RESUMO

EFEITO DE UMA OU DUAS DOSES DA VACINA ANTI GnRH NAS CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DOS TESTÍCULOS EM TOUROS DA RAÇA NELORE

E.M. Doroteu^a

^a Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70636-200, Brasil

As vacinas anti hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) podem reduzir o comportamento agressivo indesejável dos machos, evitando os efeitos colaterais da castração cirúrgica. O objetivo deste estudo foi comparar características morfo-funcionais dos testículos e características de carcaça em touros submetidos a uma ou duas imunizações contra GnRH em touros Nelore (N = 35) e Nelore com idade média de 24 meses. Foram alocados em três grupos experimentais: G1, uma dose única de 400 µg da vacina anti-GnRH no dia 0; G2, uma primeira dose de 400 µg de vacina anti-GnRH no dia 0 seguido por uma segunda dose (reforço) 30 dias depois; Grupo controle (GC), 1 mL de solução salina a 0,9% no dia 0. A cada 30 dias, do dia 0 até o abate no dia 90, os touros foram pesados e submetidos à biometria testicular, coleta e análise de sêmen e coleta de amostras de sangue para medição de testosterona. Imediatamente após o abate, os testículos foram identificados, removidos e transportados a 15 ° C para análise histopatológica. Houve uma diminuição na altura testicular ($p = 0,0476$), largura ($p = 0,0021$) e na circunferência escrotal ($p = 0,0001$), após única (G1) ou duas (G2) imunizações ativas anti GnRH. Tanto o G1 como o G2 apresentaram menores concentrações de testosterona do que o GC a partir do dia 60 ($p < 0,01$), contudo, o G2 também foi menor em relação ao G1 no dia 90 ($p = 0,0006$). Todos os parâmetros espermáticos foram afetados pela imunização ativa anti GnRH ($p < 0,05$), e no G2 as médias foram menores ($p < 0,05$) do que no G1 a partir do dia 60. Não foi encontrados aspectos de degeneração dos túbulos seminíferos em nenhuma amostra do GC, contrastando com 75,0% e 100,0% das amostras do G1 e G2, respectivamente. Em suma, a imunocastração afetou as características morfofuncionais dos testículos em touros de maneira dependente do tempo e da dose.

Palavras chaves: sêmen, imunocastração, vacina, bovinos.

ABSTRACT

EFFECT OF A SINGLE OR TWO DOSES OF AN ANTI GnRH VACCINE ON TESTICLE MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS IN NELORE BULLS

E.M. Doroteu^a

^a Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70636-200, Brazil

Anti-gonadotropin releasing hormone (GnRH) vaccines may reduce undesirable aggressive behavior of males, while avoiding surgical castration side-effects. The objective of this study was to compare testicle morpho-functional characteristics and carcass traits in bulls undergoing a single or two immunizations against GnRH Nelore (n=35) bulls with an average age of 24 months were allocated into three experimental groups: G1(n=12), a single 400 µg dose of anti-GnRH vaccine on day 0; G2 (n=11), a first 400 µg dose of anti-GnRH vaccine on day 0 followed by a second (boost) dose 30 days later; Control group (CG; n=12), 1 mL saline 0.9% at day 0. Every 30 days, from day 0 until slaughter at day 90, the bulls were weighed and underwent testicular biometry, semen collection and analysis, and blood sample collection for testosterone measurement. Immediately after slaughter, the testicles were individually identified, removed, and transport at 15°C to the Laboratory for histopathological analysis. There was a decrease in testicular height (P=0.0476), width (P=0.0021), and in scrotal circumference (P=0.0001), after either a single (G1) or two (G2) active immunizations against GnRH. Both G1 and G2 had lower testosterone concentrations than CG from day 60 on (P<0.01), but in G2 it was also lower than in G1 on day 90 (P=0.0006). All sperm parameters were affected by active immunization against GnRH (P<0.05), and in G2 averages were lower (P<0.05) than in G1 from day 60 on. No sign of seminiferous tubules degeneration was found in any sample from the CG, contrasting with 75.0% and 100.0% of the samples from G1 and G2, respectively. In summary, immunocastration affected testicle morpho-functional characteristics in bulls in a time- and dose-dependent way.

Keywords: semen, immunocastration, vaccine, cattle.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A demanda por proteína de origem animal é crescente em virtude, entre outros fatores, da rápida expansão populacional, do desenvolvimento urbano e melhoria da qualidade de vida na maior parte do mundo (FAO, 2018). O desenvolvimento agropecuário está desempenhando um papel cada vez mais importante na economia global e esse fato vem demandando maior eficiência nos sistemas produtivos, principalmente o da proteína animal. O Brasil tem potencial para suprir o aumento de consumo, pois detém vasto território agricultável, clima favorável, tecnologia e o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 213,5 milhões de cabeças (IBGE, 2018).

A Castração de animais para fins de domesticação, visando trabalho, produção de carne e transporte data de centenas de anos (AMANN et al., 1976). Este procedimento foi adotado visando benefícios como a redução dos níveis de testosterona (COETZEE et al., 2010) e conseqüentemente da agressividade e da atividade sexual, reduzindo o estresse sofrido pelos animais no pré-abate (FISHER et al., 2001). Dentre os efeitos indesejáveis da castração estão perdas de desempenho zootécnico, como redução das taxas de crescimento e da eficiência alimentar, além da dor causada pelo procedimento sem analgesia (STAFFORD et al., 2002). Estas perdas, contudo, podem ser compensadas pelos ganhos em qualidade de carcaça, como acabamento e marmoreio.

Outro aspecto relacionado aos procedimentos de castração é a preocupação com o bem-estar animal. A abordagem cirúrgica ou por estrangulamento com anel de borracha causam dor e estresse nos animais, conforme comprovado pela avaliação das concentrações de cortisol no sangue (STAFFORD et al., 2002), que é o parâmetro de referência para determinar o estresse fisiológico em animais submetidos a estímulos nociceptivos. Independentemente da forma de castração, as concentrações de cortisol aumentam, no entanto, o início, a magnitude e a duração podem variar com o procedimento utilizado (CURRAH et al., 2009; AMATAYAKUL-CHANTLER et al., 2013). Questões relacionadas ao bem-estar animal vem ganhando crescente importância junto a sociedade, o que levou a demanda por métodos alternativos para se obter os efeitos esperados da castração, mas sem o uso de métodos agressivos ou invasivos (NEEDHAM et al., 2019). Assim, estudos a partir do final dos anos 70 (ROBERTSON et al., 1979, 1981, 1982; JEFFCOATE et al., 1982) vêm demonstrando que vacinas imunológicas podem ser uma alternativa à castração cirúrgica em animais de produção.

A resposta imunológica eficiente depende de um esquema de vacinação que não apenas provoque uma intensa resposta supressora de hormônios, mas também que mantenha baixas concentrações até o abate (NEEDHAM et al., 2019). A vacina anti-GnRH é empregada como castração imunológica segura e efetivamente modera o comportamento agressivo, elimina a possibilidade de infecção cirúrgica e dor, e reduz estresse sofrido pelos animais no pré-abate evitando carnes de coloração escura e pH alterado (PRADO et al., 2015; QUARESMA et al., 2017). Contudo, a maioria dos estudos com castração imunológica se concentrou nos aspectos zootécnicos, e a sequência e magnitude das alterações morfofuncionais nos testículos subsequente a diferentes esquemas de imunização nos testículos ainda requer uma melhor elucidação.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de uma ou duas doses da vacina anti GnRH na supressão da secreção de testosterona sérica e os efeitos na qualidade *ante-mortem* do sêmen, viabilidade espermática, morfologia, bem como na histologia tecidual *post-mortem* de touros Nelore imunocastrados. A hipótese nula é que a imunocastração com apenas uma dose não influencia na fisiologia testicular em touros púberes e, portanto, a produção de testosterona, a qualidade espermática e a histologia permanecem semelhantes aos de touros inteiros.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a biometria testicular de touros imunocastrados
- Avaliar a concentração sérica de testosterona
- Conhecer os efeitos da vacina anti GnRH na qualidade seminal
- Analisar os efeitos da vacina anti GnRH na histologia testicular

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 APARELHO REPRODUTOR MASCULINO

Anatomia e morfologia funcional dos testículos

Os testículos são as gônadas masculinas, que tem a dupla função gametogênica e esteroidogênica. Eles se desenvolvem durante a fase embrionária na cavidade abdominal e, na maioria dos mamíferos, migram para a bolsa escrotal após o nascimento. A função gametogênica é exercida pelos túbulos seminíferos, pela produção dos gametas masculinos (os espermatozoides), e a esteroidogênica consiste na produção de hormônios sexuais como, por exemplo, a testosterona produção de testosterona e, em menor quantidade, de estrógenos (CURTIS e AMANN, 1981).

Os testículos estão envoltos pela túnica albugínea, que é recoberta externamente pela lâmina visceral da túnica vaginal. A túnica albugínea é uma cápsula rica em fibras de colágeno e tecido conjuntivo denso, que emite septos para o interior do órgão (mediastino testicular) e subdivide-o em lóbulos. Cada lóbulo contém diversos túbulos seminíferos imersos em tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos, nervos, células de Leydig e células livres como fibroblastos, macrófagos, linfócitos e mastócitos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; DADOUNE e DEMOULIN, 1993).

A localização pendular dos testículos na bolsa escrotal e a túnica dartos, que tem a capacidade de contrair ou relaxar, desempenham papel importante na troca de calor com o ambiente. Nesse processo também estão envolvidos o músculo cremáster, que aproxima ou distancia os testículos da parede abdominal, o plexo pampiniforme, que consiste em um enovelado de vasos sanguíneos localizados ao redor da artéria espermática interna e a pele delgada da bolsa escrotal rica em glândulas (VOGLER et al., 1993; FAYRER-HOSKEN, 1997).

Os túbulos seminíferos são revestidos internamente por um epitélio estratificado composto por duas categorias de células: as de sustentação e as espermatogênicas. As células de Sertoli são as células de sustentação e as espermatogênicas incluem estágios sucessivos de um processo contínuo de diferenciação morfológicamente distinto: espermatogônias, espermatócitos primários e secundários e espermátides (BERNDSTON e DESJARDINS, 1974). Quando as células germinativas se diferenciam, as espermátides maduras são liberadas pelas

células de Sertoli, passam pelo sistema duto coletor, rede testes, entram no epidídimo via dutos eferentes e passam por alterações morfológicas e bioquímicas para tornarem-se espermatozoides (O'DONNELL et al., 2001).

A borda anterior e superior do testículo está recoberta por uma parte da cabeça do epidídimo, na borda posterior encontra-se inserido o corpo e na extremidade inferior está envolta pela cauda do epidídimo. O epidídimo é um órgão composto por um longo tubo enovelado sobre si mesmo que fornece condições favoráveis para a maturação (cabeça) e motilidade espermática (corpo e cauda) (FAYRER-HOSKEN, 1997; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

BASES FISIOLÓGICAS

Controle neuroendócrino da espermatogênese

O hipotálamo secreta de forma pulsátil o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que atua na hipófise anterior liberando o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). O GnRH é um peptídeo de dez aminoácidos com peso de 1.18 kD (kilodaltons) que atua via regulação da liberação dos principais hormônios gonadotróficos. (JIMENEZ-LIÑAN et al., 1997; XU et al., 2018). Gonadotrofos são os únicos tipos celulares que expressam receptores de GnRH e são capazes de responder à estimulação do GnRH provocando a produção e liberação de FSH e LH pela hipófise anterior, estes hormônios estimulam o desenvolvimento testicular e produção de andrógenos, como a testosterona (DUBOIS et al., 2002; MUNK, 2012). O LH estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig, localizadas no espaço intersticial dos túbulos seminíferos, no qual a produção é mediada por processo de retroalimentação negativa com o hipotálamo ou hipófise (CLERMONT 1963; GARNER e HAFEZ, 1980; RITZEN et al., 1982).

A espermatogênese e maturação espermática são eventos andrógenos dependentes. (HANSSON et al., 1974). Aproximadamente 95% da testosterona circulante no sangue são de origem testicular e o restante é liberado pela produção adrenal com a conversão periférica de androstenediona. Outros andrógenos detectados no sangue vêm do testículo, como a dihidrotestosterona e androstenediona (TREMBLAY et al., 2015).

O FSH liga-se a receptores específicos presentes nas células de Sertoli nos túbulos seminíferos, promovendo o seu crescimento e estimulando a secreção de substâncias espermatogênicas: proteína carreadora de andrógeno (ABP), inibina, ativina, estrógeno e

glicoproteínas, como a transferrina, que estão envolvidas na transferência de nutrientes para as células germinativas, na espermição e nas funções das células de Leydig (CURTIS e AMANN, 1981; GILMONT et al., 1990). A ABP favorece o transporte de testosterona e dihidrotestosterona para dentro dos túbulos seminíferos, do interstício e também auxilia o transporte dos andrógenos do testículo para o epidídimo, no qual estes hormônios influenciam no trânsito epididimário e na maturação dos espermatozoides (HANSSON et al., 1974; RITZEN et al., 1982).

O mecanismo da espermatogênese

A gametogênese testicular consiste na produção de gametas altamente diferenciados, os espermatozoides, liberados no lúmen dos túbulos seminíferos e armazenados no epidídimo. A função endócrina é realizada principalmente pelas células de Leydig, localizadas no interstício, estabelecendo principalmente a produção de esteroides (CLERMONT, 1963).

A espermatogênese compreende uma série de divisões celulares que ocorrem no epitélio dos túbulos seminíferos. Transformam uma célula germinativa diploide em gametas haploides altamente especializados. A espermatogênese se estabelece em três etapas distintas: espermatogonial, espermatocitária e espermatogênica (JOHNSON et al., 2000). A etapa espermatogonial ocorre a partir de divisões mitóticas das células germinativas primordiais, iniciada pelas espermatogônias tronco, até a formação dos espermatócitos primários. Durante a prófase da primeira divisão mitótica, as células germinativas diferenciam-se sucessivamente em diferentes estágios (leptoteno, zigoteno, paquíteno, diploteno) antes de passar pelas duas divisões meióticas (BERNDSTON et al., 1987).

A primeira divisão meiótica é reducional (redução do número de cromossomos e separação de cromossomos homólogos), enquanto a segunda divisão meiótica é a equacional (separação de cromátides-filhas). Portanto, a meiose permite a produção de espermátides haploides. Todo processo desde espermatogônia até espermátide leva aproximadamente 45 dias no touro (CLERMONT, 1963). A espermiogênese é o processo que inclui a formação do acrossomo, condensação e alongamento do núcleo, desenvolvimento do flagelo e perda da maior parte do citoplasma. Sendo nesta fase que as espermátides haploides sofrem modificações morfológicas e estruturais e como resultado final, o espermatozoide maduro é liberado no lúmen do túbulo seminífero (BLOM, 1973; HULEIHEL e LUNENFELD, 2004).

Nesse processo de modificações, o núcleo da espermátide forma a cabeça do espermatozoide, ao passo que o aparelho de Golgi produz a vesícula acrossômica. O acrossomo contém hialuronidase, hidrolases, lisossômicas e protease cujo papel é facilitar a penetração dos espermatozoides nos revestimentos do oócito (corona radiata e zona pelúcida) (GARNER e HAFAZ, 1980; CURTIS e AMANN, 1981). De forma concomitante, os dois centríolos migram para o polo caudal do núcleo, sendo que o centríolo proximal se localiza na base do núcleo, estabelecendo o centro cinético do espermatozoide, ao passo que o centríolo distal se subdivide em duas metades: porção proximal que dá origem ao axonema central e a porção distal que se transforma em uma estrutura aneliforme constituindo o limite inferior da peça intermediária (BERNDSTON e DESJARDINS, 1974).

As mitocôndrias das espermátides se associam com a porção anterior do axonema central em desenvolvimento e se organizam em duas camadas que recobrem o complexo axial no nível da peça intermediária. Afinal, dispõem-se pelas extremidades na forma de uma hélice firme, constituindo a bainha mitocondrial que é o delineamento da futura peça intermediária. Uma parte remanescente do aparelho de Golgi se fixa no nível do colo do espermatozoide formando a gota citoplasmática proximal (GARNER e HAFEZ, 1980).

Células de Sertoli

A atividade secretória das células de Sertoli é controlada pelo hormônio folículo estimulante. Estão presentes: os receptores de membrana para FSH, os receptores nucleares e citoplasmáticos para os andrógenos (RUSSEL et al., 1994). As células de Sertoli são grandes, têm nucléolos evidentes e estão situadas de forma basal no túbulo seminífero. Essas células têm longos processos que contornam os espermatócitos, espermátides e provêm de uma estreita interação com as células germinativas durante o seu desenvolvimento. A forma celular e os movimentos ativos do citoplasma, essencial ao acomodamento das constantes mobilidades das células germinativas, são estruturados pelo citoesqueleto (DADOUNE e DEMOULIN, 1993).

Vários estudos citados por Waites et al., 1982 designam que as funções das células de Sertoli podem ser descritas em duas etapas: na fase fetal são responsáveis através da secreção do hormônio anti-Mülleriano a causar a regressão dos ductos de Müller, na puberdade a maturação funcional das células de Sertoli ocorre quando formam junções intercelulares no epitélio seminífero com atividade na espermátogênese como, por exemplo: suporte nutricional

e estrutural das células germinativas, fagocitose de células degeneradas e do acúmulo de citoplasma oriundo da liberação espermatozoides (WONG et al., 2005).

A proliferação e divisão das espermatogônias até espermatócitos em pré-leptóteno ocorrem abaixo das junções entre as células de Sertoli, ou seja, na camada basal. Na fase de leptóteno da primeira meiose, espermatócitos primários migram através das junções oclusivas entre as células de Sertoli, que formam a barreira hematotesticular, para a região interna dos túbulos seminíferos isoladas do sangue e da linfa (RUSSEL et al., 1994).

A barreira hematotesticular protege as células em meiose e pós-meiose à eventuais ações do sistema imunológico, além disso, as células de Sertoli são responsáveis pela produção local de citocinas imunossupressoras e fatores apoptóticos, também com a função de controlar a produção de células germinativas, eliminando as imperfeitas, controlando a produção de espermatócitos em pré-leptóteno e suprimento de hormônios as células que estão no compartimento adluminal (DETTIN et al., 2003).

As células no compartimento basal recebem suprimento hormonal diretamente da rede de capilares sanguíneos ou do fluido intertubular, enquanto aquelas que se encontram no compartimento adluminal o fazem através das células de Sertoli que estabelecem junções especiais com estas células (RUSSEL et al., 1994). Há uma relação positiva na eficiência da espermatogênese entre a puberdade até a maturidade sexual, quando a razão entre as células espermatogênicas e as de Sertoli se estabilizam, já que estas são menos susceptíveis à agentes deletérios (ORTH et al., 1988).

Células de Leydig

As células de Leydig encontram-se em contato com o sistema de capilares e sua principal função é a produção de testosterona, que é controlada pelo hormônio luteinizante. No momento em que o LH liga-se aos receptores de membrana das células de Leydig e ativa a adenosina monofosfato cíclica, provoca o início da ativação das proteínas cinases que catalisam a fosforilação das proteínas intracelulares e a mobilização dos precursores dos esteroides, principalmente da conversão do colesterol e pregnolonona (JOHANISSON et al., 2000; O'DONNELL et al., 2001).

Existem duas populações de células de Leydig durante o desenvolvimento testicular dos mamíferos que se diferem morfológica e funcionalmente. Durante a vida fetal há

produção de testosterona e fator de crescimento semelhante a insulina-3 pelas células de Leydig fetais, que atuam na diferenciação do trato urogenital masculino e na descida dos testículos para a bolsa escrotal (CHEN et al., 2009).

Durante a puberdade, as células de Leydig adultas entram em atividade por meio de um processo de proliferação e diferenciação de quatro tipos celulares: células de Leydig tronco, células imaturas recém-formadas, adultas imaturas e maduras (MENDIS-HANDAGAMA e ARIYARATNE, 2001). Tanto as células adultas maduras e imaturas têm capacidade esteroidogênica, imprescindíveis para manutenção das características masculinas e o processo de espermatogênese (ZIRKIN e EWING, 2009).

Alterações na secreção de testosterona derivam mais da capacidade individual das células de Leydig em secretar testosterona do que de diferenças no volume total ocupado pelas mesmas no testículo (STRAUSS, 2014). Essa capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente nestas células (TREMBLAY et al., 2015).

Outros fatores também podem influenciar na quantidade de células de Leydig por animal como, por exemplo: a quantidade de LH disponível; o número de receptores de LH por célula; a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um determinado tempo; a velocidade que a testosterona sai do testículo via vasos linfáticos, sanguíneos e fluidos seminais; o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (CHEN et al., 2009; STRAUSS, 2014).

Ciclo Espermatogênico

O epitélio seminífero é composto além das células de Sertoli, por uma geração de espermatogônias presentes ao longo da membrana basal, por uma ou duas gerações de espermatócitos e por uma ou duas gerações de espermátides localizadas no limite para o lúmen tubular (FRANÇA et al., 1999). Portanto, ao longo do tempo ocorrem mudanças constantes e cíclicas das associações celulares em uma dada secção transversal do túbulo seminífero (JOHANISSON et al., 2000). Assim, o ciclo do epitélio seminífero é a série de eventos celulares que ocorrem em uma dada área do epitélio seminífero entre dois surgimentos sucessivos da mesma associação celular (FRANÇA et al., 1999).

Em diferentes segmentos é possível observar presença da repetição de uma mesma associação celular em uma porção do epitélio seminífero, o que caracteriza ao menos um ciclo espermatogênico completo. Além disso, a espermatogênese é caracterizada por ondas, que

representam um arranjo espacial das associações celulares em diferentes segmentos dos túbulos seminíferos (PEREY et.al., 1961).

A duração do ciclo em bovinos é de aproximadamente 13,5 dias e o tempo gasto na formação do espermatozoide bovino é de aproximadamente 61 dias, ou seja, 4,5 vezes a duração do ciclo do epitélio seminífero, dividido em três partes: proliferação mitótica (espermatoctogênese), meiose e citodiferenciação (espermioogênese), cujas durações respectivas são 21, 23 e 17 dias (AMAN, 1981). Dessa forma, depois de qualquer processo degenerativo a retomada da produção espermática pode ser esperada após 70 dias (BLOM, 1973).

2.2 A UTILIZAÇÃO DA VACINA ANTI-GnRH COMO ALTERNATIVA A CASTRACAO CIRÚRGICA

A castração cirúrgica é uma ferramenta utilizada principalmente na indústria de carne bovina e suína que, entre outros pontos, têm intuito de reduzir o comportamento agressivo dos machos e facilitar o manejo dos animais, no entanto, as desvantagens associadas à castração estão relacionadas à morbidade e à mortalidade (PRICE et al., 2003; BRUNIUS et al., 2011). Suínos criados em grandes grupos frequentemente não desempenham todo seu potencial genético durante a fase final de engorda, sendo este ponto atribuído à questão de bem-estar, do estresse social resultante do aumento da atividade sexual e de agressões, fator que pode provocar desvalorização da carcaça. O início da puberdade em suínos e caprinos também está associado ao acúmulo de 3-metilindol (escatole) no tecido adiposo e androstenona em machos não castrados, que contribuem para alterações normalmente associadas ao odor e sabor das carnes de suínos e caprinos (KARACONJI et al., 2015; LENTS et al., 2018).

Os primeiros relatos sobre imunização de bezerros contra o decapeptídeo hipotalâmico, GnRH, como meio de neutralização foi realizado por Robertson et al., (1979, 1981, 1982) e Jeffcoate et al., (1982). Ambos mostraram que o tamanho dos testículos, a produção de testosterona e o comportamento agressivo podem ser reduzidos. A imunização ativa e passiva contra o GnRH tem provado ser uma ferramenta na prática em fazendas, bem como uma ferramenta para elucidar aspectos básicos do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (THOMPSON et al., 2000). Ela reduz os pontos indesejáveis de machos inteiros em granjas e em confinamentos, assim, favorecendo o bem-estar e suas implicações produtivas (NOYA et

al., 2019), e também é proposta como forma de melhorar a qualidade da carne bovina e prevenir odor característico em suínos e caprinos machos (BONNEAU e ENRIGHT, 1995; LENTS et al., 2018; PÉREZ et al., 2017; RIPOLLI et al., 2019 THOMPSON, 2000). Vacinas anti-GnRH também podem ser utilizadas no controle de fertilidade e prevenção do comportamento sexual indesejado em animais silvestres (MARTI et al., 2015; NAZ e SAVER., 2015).

A imunocastração resulta em uma redução significativa na secreção de testosterona, na espermatogênese e os túbulos seminíferos de animais imunizados mostram sinais de atrofia. (ADAMS et al, 1993; ADAMS et al., 1996; MONLÉON et al., 2020). Isto reflete provavelmente também na capacidade neutralizante dos anticorpos anti GnRH, uma vez que os níveis séricos de LH e FSH também são reduzidos em animais imunizados (ADAMS e ADAMS, 1992; AISSAT et al., 2002; RABB et al., 1990). Mesmo com a utilização de anti-inflamatórios com potencial analgésico, Needham et al., (2019) confirmaram a hipótese que a imunocastração é uma alternativa à castração por burdizo de cordeiros. Além disso, nos animais castrados por burdizo, foram encontrados espermatozoides vivos o que pode indicar a não secção completa dos cordões espermáticos. Fato este provoca a eficiência questionável dessa técnica em rebanho comercial de machos.

Em um estudo com suínos, Wicks et al., (2013) perceberam que após aplicação da vacina anti GnRH houve diminuição na produção de espermatozoides devido à espermatogênese incompleta, redução no diâmetro dos túbulos seminíferos e a atividade testicular ficou suprimida por 10 semanas. Resultados semelhantes foram encontrados quando analisado a capacidade espermática, circunferência escrotal e concentração sérica de testosterona e LH em bezerros de corte de 3 a 6 meses de idade (ADAMS et al., 1996; JANETT et al., 2012) e touros Holandeses quando vacinados contra- GnRH (XU et al., 2018).

No estudo de Monleón et al, (2020), todos os bezerros não imunocastrados exibiram espermatogênese normal, caracterizada pela presença de espermatogonia, espermatócitos, espermatídes redondas e alongados e células de Sertoli no epitélio seminífero. No entanto, os testículos dos bezerros imunocastrados exibiram hipoplasia testicular grave e a histologia testicular refletiu na ausência da espermatogênese e apenas algumas espermatogônias foram observadas no compartimento basal do epitélio seminífero.

Lentes et al. (2018) observaram em caprinos que a vacina anti GnRH independente do volume da dose (1,0 e 0,5 ml), foi eficiente na promoção da neutralização do GnRH, no entanto, apenas a segunda aplicação da vacina com intervalo de 30 dias após a primeira implicou em alterações na morfologia espermática, na biometria testicular

e no ganho de peso dos animais. Resultados semelhantes foram encontrados por Brunius et al., (2011), que observaram a concentração de anticorpos aumentar de forma significativa após a segunda aplicação, seguida de baixas concentrações de testosterona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, T.E., ADAMS, B.M. **Feedlot performance of steers and bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone.** Journal of Animal Science. v.70, p.1691-1698, 1992.
- ADAMS, T.E., DALEY, C.A., ADAMS, B.M., SAKURAI, H. **Testes function and feedlot performance of bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone: effect of age at immunization.** Journal of Animal Science. v.74, p.950-954, 1996.
- ADAMS, T.E., DALEY, C.A., ADAMS, B.M., SAKURAI, H. **Testis function and feedlot performance of bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone: effect of implants containing progesterone and estradiol benzoate.** Journal of Animal Science. v.71, p.811-817, 1993.
- AISSAT, D., SOSA, J.M., DE AVILA, D.M., BERTRAND, K.P., REEVES, J.J. **Endocrine, growth, and carcass characteristics of bulls immunized against luteinizing hormone-releasing hormone fusion proteins.** Journal of Animal Science. v.80, p.2209-2213, 2002.
- AMANN, R. P., AND V. K. GANJAM. **Steroid production by the bovine testis and steroid transfer across the pampiniform plexus.** Biology of Reproduction. v.15, p.695, 1976.
- AMANN, R.P. **A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics.** Journal of Andrology. v. 2, p. 37-58, 1981.
- AMATAYAKUL-CHANTLER, S., HOE, F., JACKSON, J. A., ROCA, R. O., STEGNER, J. E., KING, V., WALKER, J. **Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immune castration with the gonadotropin releasing factor vaccine bopriva or surgical castration of *Bos indicus* bulls raised on pasture in Brazil.** Meat Science Journal, v.95, p.78-84, 2013.
- BERNDSTON, W. E., DESJARDINS, C. **The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis.** American Journal of Anatomy. v. 140(2), p. 167-179, 1974. doi:10.1002/aja.1001400204
- BERNDTSON, W. E., IGBOELI, G., PARKER, W. G. **The Numbers of Sertoli Cells in Mature Holstein Bulls and their Relationship to Quantitative Aspects of Spermatogenesis.** Biology of Reproduction. v. 37(1), p. 60-67, 1987.
- BLOM, E. **The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram.** Nordisk Veterinae Medicin. v.25, p.382-391, 1973.
- BONNEAU, M., ENRIGHT, W.J. **Immunocastration in cattle and pigs.** Livestock Production Science. v.42, p.193-200, 1995.
- BRUNIUS, C., ZAMARATSKAIA, G., ANDERSSON, K., CHEN, G., NORRBY, M., MADEJ, A., LUNDSTRÖM, K. **Early immunocastration of male pigs with Improvac® –**

Effect on boar taint, hormones and reproductive organs. *Vaccine*. v. 29, p. 9514–9520, 2011. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.0.

CLERMONT, Y. **The cycle of the seminiferous epithelium in man.** *American Journal of Anatomy*. v. 112, p. 35-45, 1963.

CHEN, H., GE, R.-S., ZIRKIN, B. R. **Leydig cells: From stem cells to aging.** *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 306(1-2), p. 9–16, 2009. doi:10.1016/j.mce.2009.01.023

COETZEE, J.F., NUTSCH, A.L., BARBUR, L.A., BRADBURN, R.M. **A survey of castration methods and associated livestock management practices performed by bovine veterinarians in the United States.** *BMC Veterinary Research*. v.3, p. 6-12, 2010.

CURRAH, J.M., HENDRICK, S.H., STOOKEY, J.M. **The behavioral assessment and alleviation of pain associated with castration in beef calves treated with flunixin meglumine and caudal lidocaine epidural anesthesia with epinephrine.** *Canadian Veterinarian Journal*. v. 50, p. 375-382, 2009.

CURTIS, S. K., AMANN, R. P. **Testicular Development and Establishment of Spermatogenesis in Holstein Bulls.** *Journal of Animal Science*. v. 53(6), p. 1645–1657, 1981. doi:10.2527/jas1982.5361645x

DADOUNE, J. DEMOULIN. **A Structure and functions of testis.** In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M. C., HUNTER, R.H.F. *Reproduction in mammal and man*. Paris Ellipses. Cap. 1, p.227-255, 1993.

DETTIN, L., RUBINSTEIN, N., AOKI, A., RABINOVICH, G. A., MALDONADO, C. A. **Regulated Expression and Ultrastructural Localization of Galectin-1, a Proapoptotic β -Galactoside-Binding Lectin, During Spermatogenesis in Rat Testis.** *Biology of Reproduction*. v. 68(1), p. 51–59, 2003. doi:10.1095/biolreprod.102.006361

DUBOIS, E.A., ZANDBERGEN, M.A., PEUTE, J., GOOS, H.J. **Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates.** *Brain Research Bulletin*. v.57, p.413-418, 2002.

FAYRER-HOSKEN, R. **Anatomy and Physiology of the Bull's Reproductive System.** *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. v. 3(2), p. 195–202, 1997. doi:10.1016/s0749-0720(15)30335-2

FISHER, A.D., KNIGHT, T.W., COSGROVE, G.P., ANDERSON, C.B., DUGANZICH, D.M., MATTHEWS, L.R. **Effects of surgical or banding castration on stress responses and behaviour of bulls.** *Australian Veterinarian Journal*. v. 79, p. 279-284, 2001.

FRANÇA, L. R., BECKER-SILVA, S. C., CHIARINI-GARCIA, H. **The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*).** *Tissue and Cell*. v. 31(3), p. 274–280, 1999. doi:10.1054/tice.1999.0044

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Migration, Agriculture and Development** – 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9549EN/i9549en.pdf>> Acessado em: agosto 2020.

- GARNER, D.L., HAFEZ, E.S.E. **Spermatozoa**. In *Reproduction in farm animals*, 4th edition (ed. ESE Hafez), Lea and Febiger, Philadelphia, USA. p. 167–188, 1980.
- GILMONT, R. R., SENGER, P. L., SYLVESTER, S. R., GRISWOLD, M. D. **Seminal Transferrin and Spermatogenic Capability in the Bull**. *Biology of Reproduction*. v. 43(1), p. 151–157, 1990. doi:10.1095/biolreprod43.1.151
- HANSSON, V., TRYGSTAD, O., FRENCH, F. S., MCLEAN, W. S., SMITH, A. A., TINDALL, D. J., RITZÉN, E. M. **Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis**. *Nature*. v. 250(5465), p. 387–391, 1974. doi:10.1038/250387a0
- HERNANDEZ, J.A., ZANELLA, E.L., BROGDEN, R., DE AVILA, D.M., GASKINS, C.T., REEVES, J.J. **Reproductive characteristics of grass-fed, luteinizing hormone-releasing hormone-immuno castrated *Bos indicus* bulls**. *Journal of Animal Science*, v.83, n.12, p.2901-2907, 2005.
- HULEIHEL, M., LUNENFELD, E. **Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors**. *Asian journal of Andrology*. v.6, n.3, p.259-268, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da produção pecuária**. Efetivo dos rebanhos – Bovinos. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>> Acessado em: agosto 2020.
- JANETT, F., GERIG, T., TSCHUOR, A.C., AMATAYAKUL-CHANTLER, S., WALKER, J., HOWARD, R., 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, p.182-188, 2012.
- JEFFCOATE, I.A., LUCAS, J.M.S., CRIGHTON, D.B. **Effects of active immunization of ram lambs and bull calves against synthetic luteinizing hormone releasing hormone**. *Theriogenology*. v.18, p.65-77, 1982.
- JIMENEZ-LIÑAN, M, RUBIN, B.S, KING, J.C. **Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain**. *Endocrinology*. v, 138, p. 4123-30, 1997.
- JOHANISSON, E., CAMPANA, A., LUTHI, R., AGOSTINI, A. **Evaluation of “round cells” in semen analysis: A comparative study**. *Human Reproduction*.v.6, p.404-412, 2000.
- JOHNSON L., VARNER, D.D., ROBERTS, SMITH, M.E., KEILLOR, T.L., SCRUTCHFIELD, D.G.E. **Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach**. *Animal Reproduction Science*.v.61, p.471-480, 2000.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 429, 1999.
- KARACONJI, B., LLOYD, B., CAMPBELL, N., MEANEY, D., AHERN, T. **Effect of an anti-gonadotropin-releasing factor vaccine on sexual and aggressive behaviour in male pigs during the finishing period under Australian field conditions**. *Australian Veterinary Journal*. v. 93(4), p. 121–123, 2015. doi:10.1111/avj.12307

LENTS, M.P., BARBOSA, L.P., SANTANA, A.L.M., PINHEIRO, E.E.G., MUGABE, L., BISCARDE, C., KIYA, C., MACHADO, W.M., SOUZA, R.S. **Immunocastration of goats using anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine.** *Theriogenology*. v.114, p.7-13, 2018.

MARTI S, DEVANT M, AMATAYAKUL-CHANTLER S, JACKSON JA, LOPEZ E, JANZEN ED, SCHWARTZKOPF-GENSWEIN KS. **Effect of anti-gonadotropin-releasing factor vaccine and band castration on indicators of welfare in beef cattle.** *Journal Animal Science*. v. 93, p. 1581-91, 2015. doi: 10.2527/jas.2014-8346.

MENDIS-HANDAGAMA, C S. M. L., ARIYARATNE, S.H.B. **Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis.** *Biology of Reproduction*. v. 65(3), p. 660–671, 2001. doi:10.1095/biolreprod65.3.660

NEEDHAM, T.; LAMBRECHTS, L., HOFFMAN, C. **Extending the interval between second vaccination and slaughter: II. Changes in the reproductive capacity of immunocastrated ram lambs.** *Animal*, v. 13, p. 1962 - 1971, 2019.

O'DONNELL, L., ROBERTSON, K.M., JONES, M.E., SIMPSON, E.R. **Estrogen and spermatogenesis.** *Endocrinology Review*. v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

PEREY ,B.Y., CLERMONT Y., LEBLOND, C.P. **The wave of the seminiferous epithelium in the rat.** *American Journal of Anatomy*. v. 108, p. 47–77, 1961.

PÉREZ, L.C., BOLADO, S.L., FIGUEROA, S.F., BARRERAS, S.A., SÁNCHEZ, L.E. **Effect of immunocastration with Bopriva on carcass characteristics and meat quality of feedlot Holstein bulls.** *Meat Science Journal*. v.123, p.45-49, 2017.

PRICE, E. O., ADAMS, T. E., HUXSOLL, C. C., BORGWARDT, R. E. **Aggressive behavior is reduced in bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone.** *Journal of Animal Science*. v. 81(2), p. 411–415, 2003. doi:10.2527/2003.812411x

RABB, M.H., THOMPSON JR., D.L., BARRY, B.E., COLBORN, D.R., HEHNKE, K.E., GARZA J.R.F. **Effects of active immunization against GnRH on LH, FSH and prolactin storage, secretion and response to their secretagogues in pony geldings.** *Journal of Animal Science*. v. 68, p. 3322-3329, 1990.

NAZ, R. K., SAVER, A. E. **Immunocontraception for Animals: Current Status and Future Perspective.** *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 75, p. 426–439, 2015.

RIPOLL, G., NOYA, A., CASASÚS, I., SANZ, A. **Preliminary study of the effects of an anti-gonadotropin releasing factor vaccine at two initial live weights on the carcass traits and meat quality of bulls.** *Animal Production Science*. v. 59, p. 1462–1469, 2019. doi.org/10.1071/AN18324

RITZEN, E. M., BOITANI, C., PARVINEN, M., FRENCH, F. C., FELDMAN, M. **Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules.** *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 25(1), p. 25–33, 1982. doi:10.1016/0303-7207(82)90166-6

ROBERTSON, I.S., FRASER, H.M., INNES, G.M., JONES, A.S. **Effect of immunological castration on sexual and production characteristics in male cattle.** *The Veterinary Record*. v.111, p.529-531, 1982.

ROBERTSON, I.S., WILSON, J.C., FRASER, H.M. **Immunological castration in male cattle.** *The Veterinary Record.* v.105, p.556-557, 1979.

ROBERTSON, I.S., WILSON, J.C., ROWLAND, A.C., FRASER, H.M. **Further studies on immunological castration in male cattle.** *The Veterinary Record.* v. 108, p. 381-382, 1981.

RUSSELL, L., CHANDRASHERAN, V., ANDRZEJ, B., AMIYA, F.S.H. **The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: A stereological and endocrine study.** *Journal of Andrology.* v. 17, n. 2, p.93-106, 1994.

SPERDUTI, S., LIMONCELLA, S., LAZZARETTI, C., PARADISO, E., RICCETTI, L., TURCHI, S., FERRIGNO I., BERTACCINI, J., PALUMBO, C., POTÌ, F., LONGOBARDI, S., MILLAR, R.P., SIMONI, S., NEWTON, C.L., CASARINI, L. **GnRH Antagonists Produce Differential Modulation of the Signaling Pathways Mediated by GnRH Receptors.** *International Journal of Molecular Sciences,* v. 20, p. 5548, 2019. doi:10.3390/ijms20225548

STAFFORD, K.J., MELLOR, D.J., TODD, S.E., BRUCE, R.A., WARD, R.N. **Effects of local anaesthesia or local anaesthesia plus a non-steroidal anti-inflammatory drug on the acute cortisol response of calves to five different methods of castration.** *Research Veterinary Science.* v. 73, p. 61-70, 2002.

STRAUSS, J.F III. **The synthesis and metabolism of steroid hormones.** In: J.F. Strauss III, BARBIERI, R.L., YEN e JAFFE'S. *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management,* 7th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p. 66–92, 2014.

THOMPSON, D.L. **Immunization against GnRH in male species comparative aspects.** *Animal Reproduction Science,* v. 60-61, p. 459-469, 2000.

TREMBLAY, J.J. **Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells.** *Steroids.* v. 103, p. 3-10, 2015). doi.org/ 10.1016/j.steroids.2015.08.001.

ORTH, J. M., GUNSALUS, G. L., LAMPERTI, A. A. **Evidence From Sertoli Cell-Depleted Rats Indicates That Spermatid Number in Adults Depends on Numbers of Sertoli Cells Produced During Perinatal Development.** *Endocrinology.* v. 122(3), p. 787–794, 1988. doi:10.1210/endo-122-3-787

WAITES, G. M., GLADWELL, R. T. **Physiological significance of fluid secretion in the testis and blood-testis barrier.** *Physiological Reviews.* v. 62(2), p. 624–671, 1982. doi:10.1152/physrev.1982.62.2.624

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, p. 149-159, 2013.

WONG, C., MRUK, D. D., SIU, M. K. Y., & CHENG, C. Y. **Blood-Testis Barrier Dynamics Are Regulated by α 2-Macroglobulin via the c-Jun N-Terminal Protein Kinase Pathway.** *Endocrinology.* v. 146(4), p. 1893–1908, 2005. doi:10.1210/en.2004-1464

VOGLER, C. J., SAACKE, R. G., BAME, J. H., DEJARNETTE, J. M., MCGILLIARD, M. L. **Effects of Scrotal Insulation on Viability Characteristics of Cryopreserved Bovine**

Semen. Journal of Dairy Science. v. 74(11), p. 3827–3835, 1991. doi:10.3168/jds.s0022-0302(91)78575-5

XU, M., XU, C., LIU, F., SHEN, X., MENG, J., CHEN, H., YANG, J., ZHOU, P., GAO, R., GANS, S. **Effects of active immunization with newly modified GnRH peptides on spermatogenesis and production performance of Holstein bull.** Biology of Reproduction, v. 99, p. 461-472, 2018.

ZIRKIN, B. R., & EWING, L. L. **Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: A stereological study of cell number and ultrastructure.** The Anatomical Record. v. 219(2), p. 157–163, 1987. doi:10.1002/ar.1092190208

CAPÍTULO 2

EFEITO DE UMA OU DUAS DOSES DA VACINA ANTI GnRH NAS CARACTERÍSTICAS MORFO-FUNCIONAIS DOS TESTÍCULOS EM TOUROS DA RAÇA NELORE

RESUMO

EFEITO DE UMA OU DUAS DOSES DA VACINA ANTI GnRH NAS CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DOS TESTÍCULOS EM TOUROS DA RAÇA NELORE

E.M. Doroteu^a

^a Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70636-200, Brasil

As vacinas contra o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) podem reduzir o comportamento agressivo indesejável dos machos, evitando os efeitos colaterais da castração cirúrgica. O objetivo deste estudo foi comparar características morfo-funcionais dos testículos e características de carcaça em touros submetidos a uma ou duas imunizações contra GnRH em touros Nelore (N = 35) com idade média de 24 meses. Foram alocados em três grupos experimentais: G1, uma dose única de 400 µg da vacina anti-GnRH no dia 0; G2, uma primeira dose de 400 µg de vacina anti-GnRH no dia 0 seguido por uma segunda dose (reforço) 30 dias depois; Grupo controle (GC), 1 mL de solução salina a 0,9% no dia 0. A cada 30 dias, do dia 0 até o abate no dia 90, os touros foram pesados e submetidos à biometria testicular, coleta e análise de sêmen e coleta de amostras de sangue para medição de testosterona. Imediatamente após o abate, os testículos foram identificados, removidos e transportados a 15°C para análise histopatológica. Houve uma diminuição na altura testicular ($p = 0,0476$), largura ($p = 0,0021$) e na circunferência escrotal ($p = 0,0001$), após única (G1) ou duas (G2) imunizações ativas anti GnRH. Tanto o G1 como o G2 apresentaram menores concentrações de testosterona do que o GC a partir do dia 60 ($p < 0,01$), contudo, o G2 também foi menor em relação ao G1 no dia 90 ($p = 0,0006$). Todos os parâmetros espermáticos foram afetados pela imunização ativa anti GnRH ($p < 0,05$), e no G2 as médias foram menores ($p < 0,05$) do que no G1 a partir do dia 60. Não foi encontrados aspectos de degeneração dos túbulos seminíferos em nenhuma amostra do GC, contrastando com 75,0% e 100,0% das amostras do G1 e G2, respectivamente. Em suma, a imunocastração afetou as características morfofuncionais dos testículos em touros de maneira dependente do tempo e da dose.

Palavras chaves: sêmen, imunocastração, vacina, bovinos.

ABSTRACT**EFFECT OF A SINGLE OR TWO DOSES OF AN ANTI GnRH VACCINE ON TESTICLE MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS IN NELORE BULLS**E.M. Doroteu^a^a Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70636-200, Brasil

Anti-gonadotropin releasing hormone (GnRH) vaccines may reduce undesirable aggressive behavior of males, while avoiding surgical castration side-effects. The objective of this study was to compare testicle morpho-functional characteristics and carcass traits in bulls undergoing a single or two immunizations against GnRH Nelore (n=35) bulls with an average age of 24 months were allocated into three experimental groups: G1(n=12), a single 400 µg dose of anti-GnRH vaccine on day 0; G2 (n=11), a first 400 µg dose of anti-GnRH vaccine on day 0 followed by a second (boost) dose 30 days later; Control group (CG; n=12), 1 mL saline 0.9% at day 0. Every 30 days, from day 0 until slaughter at day 90, the bulls were weighed and underwent testicular biometry, semen collection and analysis, and blood sample collection for testosterone measurement. Immediately after slaughter, the testicles were individually identified, removed, and transport at 15°C to the Laboratory for histopathological analysis. There was a decrease in testicular height (P=0.0476), width (P=0.0021), and in scrotal circumference (P=0.0001), after either a single (G1) or two (G2) active immunizations against GnRH. Both G1 and G2 had lower testosterone concentrations than CG from day 60 on (P<0.01), but in G2 it was also lower than in G1 on day 90 (P=0.0006). All sperm parameters were affected by active immunization against GnRH (P<0.05), and in G2 averages were lower (P<0.05) than in G1 from day 60 on. No sign of seminiferous tubules degeneration was found in any sample from the CG, contrasting with 75.0% and 100.0% of the samples from G1 and G2, respectively. In summary, immunocastration affected testicle morpho-functional characteristics in bulls in a time- and dose-dependent way.

Keywords: semen, immunocastration, vaccine, cattle

1. INTRODUÇÃO

A castração de bovinos machos é uma prática adotada mundialmente pela indústria de carne bovina. Além de evitar a reprodução, a remoção cirúrgica dos testículos (orquiectomia), prejudica a produção de testosterona reduzindo o comportamento agressivo típico do macho, atenuando o estresse e facilitando o manejo em confinamento. Além disso, pode melhorar o marmoreio e a maciez da carne [1], menor ocorrência de lesões por brigas e menor estresse sofrido pelos animais no pré-abate evitando carnes de coloração escura e pH alterado [2].

No entanto, a castração tem vários efeitos colaterais. Dependendo dos métodos de castração, efeitos prejudiciais são observados no consumo de ração, eficiência e ganho de peso [1,3,4]. Os novilhos castrados cirurgicamente sofrem inflamação, dor [5,7] e estresse [8], além de longos períodos de cicatrização [6], causando despesas extras de trabalho e medicamentos. Existe uma preocupação crescente com o bem-estar animal e uma percepção negativa sobre a castração cirúrgica quando realizada sem analgesia [9,10].

A imunocastração tem sido proposta como alternativa para as abordagens cirúrgicas de castração [11]. O GnRH sintético conjugado com adjuvantes pode ser usado para induzir a produção de anticorpos anti-GnRH e, assim, neutralizar o GnRH endógeno por imunização ativa [12]. Os efeitos da supressão de GnRH pelas vacinas anti-GnRH são bem conhecidos e incluem redução na liberação hipotalâmica de LH e FSH, desenvolvimento e tamanho da gônada, espermatogênese e produção de testosterona [13]. A imunização contra o GnRH também é eficaz para suprimir os ciclos de ovulação e estro em vacas e novilhas [14,15].

Atualmente, as vacinas anti-GnRH estão disponíveis comercialmente para imunocastração de bovinos, suínos e equinos [12,16,17], e é uma alternativa favorável ao bem-estar animal à castração convencional [3]. O esquema de uso mais comumente recomendado é baseado em uma imunização inicial, seguida de uma dose de reforço do antígeno após 30 dias [16] para garantir uma resposta maior, tanto quantitativamente (alta concentração de anticorpos) quanto qualitativamente (velocidade da resposta, tipo de anticorpo produzido) [12,18]. No entanto, o momento dos efeitos nas características morfofuncionais dos testículos ainda não foi estabelecido para diferentes esquemas de vacinação [19]. Por outro lado, a supressão da produção de testosterona com consequente redução de seus efeitos anabólicos, pode afetar negativamente o desenvolvimento somático, o ganho de peso e o desenvolvimento

muscular [1], contrabalançando os benefícios da imunocastração no comportamento agressivo do macho.

No presente estudo, foram avaliadas características testiculares, endócrinas e espermáticas em touros submetidos a uma ou duas imunizações ativas contra o GnRH em vários momentos. A hipótese foi de que uma única dose poderia resultar nos efeitos esperados da imunocastração na função testicular sem comprometer o ganho de peso durante o confinamento.

1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

O experimento foi realizado na fazenda Nossa Senhora Aparecida, localizada no município de Chapada Gaúcha (latitude: 15 ° 18'20"S; longitude: 45 ° 37'06"S; altitude: 858 metros), noroeste de Minas Gerais, Brasil, entre setembro e novembro de 2017 (primavera no hemisfério sul). Foram utilizados touros Nelore hípidos (*Bos taurus indicus*, n = 35), com idade média de 24 meses e $426,6 \pm 2,6$ kg de peso corporal. A fertilidade foi confirmada por exame andrológico, realizado de acordo com os critérios recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [20]: motilidade espermática $\geq 60\%$; vigor ≥ 3 ; turbilhonamento ≥ 3 ; defeitos menores ≤ 20 ; defeitos maiores ≤ 10 . Os touros foram alojados em piquete de 50 hectares com forrageira *Panicum* cultivar Mombaça, acesso livre a água e ao sal mineral. Foi fornecida dieta formulada na fazenda contendo cana de açúcar (76,2%), farelo de milho (18,6%), farelo de soja (3,6%), complexo mineral (1%) e uréia (0,5%). O experimento começou 15 após o período de adaptação à ração. O manejo para as avaliações de biometria, coleta de sêmen e sangue foram realizadas no brete de contenção de bovinos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA, Protocolo nº 042/2020,).

2.1.1 Delineamento experimental

Os touros foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: Grupo 1 (G1), uma dose única de 400 µg (microgramas) da vacina anti-GnRH (Bopriva, Zoetis, São Paulo, SP, Brasil) no dia 0 ; Grupo 2 (G2), uma primeira dose de 400 µg de vacina anti-GnRH no dia 0, seguida por uma segunda dose (reforço) 30 dias depois; Grupo controle (GC), 1 mL (mililitro) de solução salina a 0,9% no dia 0 e dia 30. Em todos os tratamentos foram aplicados por via subcutânea na lateral esquerda do pescoço. A cada 30 dias, do dia 0 até o abate no dia 90, os touros foram pesados e submetidos à biometria testicular, coleta de sêmen, análise dos dados e coleta de sangue. Imediatamente após o abate os testículos foram identificados, removidos, colocados em sacos plásticos e transportados a 15° C para o Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília para análise histopatológica. Como dados adicionais, as carcaças foram avaliadas quanto ao rendimento de carcaça e ao acabamento de

gordura, de acordo com os critérios utilizados nos frigoríficos da Minerva *foods*: ausente = 0 mm; baixo = 1 a 3 mm; médio = 4 a 6 mm; uniforme = 7 a 10 mm; excessivo = mais de 10 mm.

2.1.2 Biometria testicular e qualidade do sêmen

Durante cada avaliação biométrica, o testículo esquerdo e direito foram escaneados por ultrassonografia, utilizando sonda de 7,5 MHz (Mindray DP 2200, Mindray do Brasil, Monções, SP, Brasil), a altura e largura foram medidas nas imagens longitudinais e transversais, respectivamente, Biometria testicular e qualidade do sêmen. As configurações do ultrassom (foco, ganho, brilho e contraste) foram padronizadas para todos os exames. A circunferência do escroto foi mensurada utilizando uma fita específica para o perímetro escrotal (Biocom, Uberaba, MG, Brasil).

A coleta de sêmen foi realizada por eletroejaculação. Uma amostra de 20 μ L de sêmen fresco foi avaliada através de microscopia óptica (aumento de 200x), quanto ao movimento de massa (turbilhão), motilidade e vigor. Outra alíquota de 20 μ L foi corada com 20 μ L de corante rosa Bengala para análise morfológica das células espermáticas (aumento de 1000x). A avaliação do sêmen foi realizada utilizando os seguintes critérios: motilidade espermática $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 , turbilhão ≥ 3 , defeitos menores $\leq 20\%$, defeitos maiores $\leq 10\%$ e porcentagem de células normais $\geq 70\%$.

A concentração espermática foi calculada por espermiométrico (Karras, Minitub, GmbH, Tiefenbach, Alemanha), conforme descrito anteriormente [21].

2.1.3 Concentração de testosterona no soro sanguíneo

Amostras de sangue foram coletadas pela veia jugular com agulhas 21G e tubos vacuolizados (Vacutainer Systems, Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brasil). O soro foi obtido por centrifugação da amostra de sangue por 5 minutos a 2.078 x g (força gravitacional) e armazenado a -20° C para análises posteriores. A concentração de testosterona foi medida por imunoensaio eletroquimioluminescente (LEC), utilizando um dispositivo analisador Elecsys (Indianapolis, IN, EUA; sensibilidade do teste = 3 ng / dL). Os coeficientes de variação intra e interensaios foram de 9,3% e 23,7%, respectivamente. Os valores de referência da testosterona para Nelore aos 24 meses são de 1,24 a 2,48 ng / mL [23].

2.1.4 Análise anatomopatológica

Os testículos foram seccionados em fragmentos de 1,0 a 2,0 cm (centímetros) de espessura. Amostras de partes da cabeça, corpo e cauda do epidídimo, bem como do parênquima testicular, foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 48 h (horas). Os fragmentos foram então rotineiramente processados para histologia, embebidos em parafina, cortados em fatias de 4 μ e corados com hematoxilina e eosina. A presença de vacuolização, fragmentos nucleares ou picnose, bem como uma redução no número de células de revestimento tubular no epitélio seminífero, foram considerados sinais de degeneração dos túbulos seminíferos. Foram avaliados 10 campos de cada lâmina e a degeneração foi classificada como: ausente (0), quando não foram observadas alterações; leve (1), quando sinais de degeneração foram observados em $\leq 50\%$ dos campos analisados; moderado (2), quando 50-75% dos campos apresentaram alterações degenerativas; grave (3), quando poucas células de revestimento tubular estavam presentes e $> 75\%$ dos túbulos seminíferos foram afetados; completa (4), quando o epitélio seminífero tubular e/ou ductos epididimários encontraram-se totalmente degenerados e nenhum espermatozoide observado [24].

2.1.5 Análise estatística

Para cada touro, foram utilizadas médias dos dados dos testículos esquerdos e direito para medidas lineares e histopatológicas. Os dados da biometria testicular, análise de espermatozoides e concentração de testosterona foram inicialmente testados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. As análises consideraram os principais efeitos do tratamento (GC, G1 e G2), tempo (dias) e suas interações. O procedimento SAS GLIMMIX com uma declaração REPEATED foi usado para explicar a correlação automática entre medidas sequenciais (SAS University Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). O modelo foi ajustado para o tipo de distribuição de cada parâmetro. As diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados das características de peso e carcaça foram analisados por GLIMMIX do SAS. Os graus de degeneração dos túbulos seminíferos foram comparados entre os grupos pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis. As associações entre o grau de degeneração dos túbulos seminíferos e outros parâmetros testiculares no dia 90 foram calculadas pelo método de correlação de Pearson. Os resultados são apresentados como média \pm S.E.M. Um valor de p de 0,05 indicou significância estatística.

3. RESULTADOS

Grupo, tempo do experimento e interação grupo vs tempo, influenciaram significativamente ($p < 0,05$) nos parâmetros estudados, com exceção do peso corporal que foi influenciado de forma significativa apenas pelo tempo (figura 2). Apesar da diferença no peso final (no dia 90) entre o GC e o G2, não houve diferença ($p > 0,05$) no ganho de peso diário total ou médio entre os grupos (tabela 1). No entanto, o rendimento de carcaça foi maior no G2 do que no G1 e no GC ($p = 0,0102$). Todos os touros apresentaram baixa cobertura de gordura subcutânea (1 a 3 mm).

Houve diminuição na largura testicular ($p < 0,05$), mas não no comprimento testicular, após uma (G1) ou duas (G2) imunizações ativas contra o GnRH. Como esperado, esse efeito foi observado ao longo do tempo ($p < 0,05$). No entanto, diferença na circunferência escrotal foi reduzida de forma significativa no G2 aos 90 dias, contudo, também ocorreu redução ao longo do tempo no G1 ($p < 0,0001$). A concentração de testosterona sérica no G1 como no G2 apresentaram-se menores em relação ao GC a partir do dia 60 ($p < 0,01$).

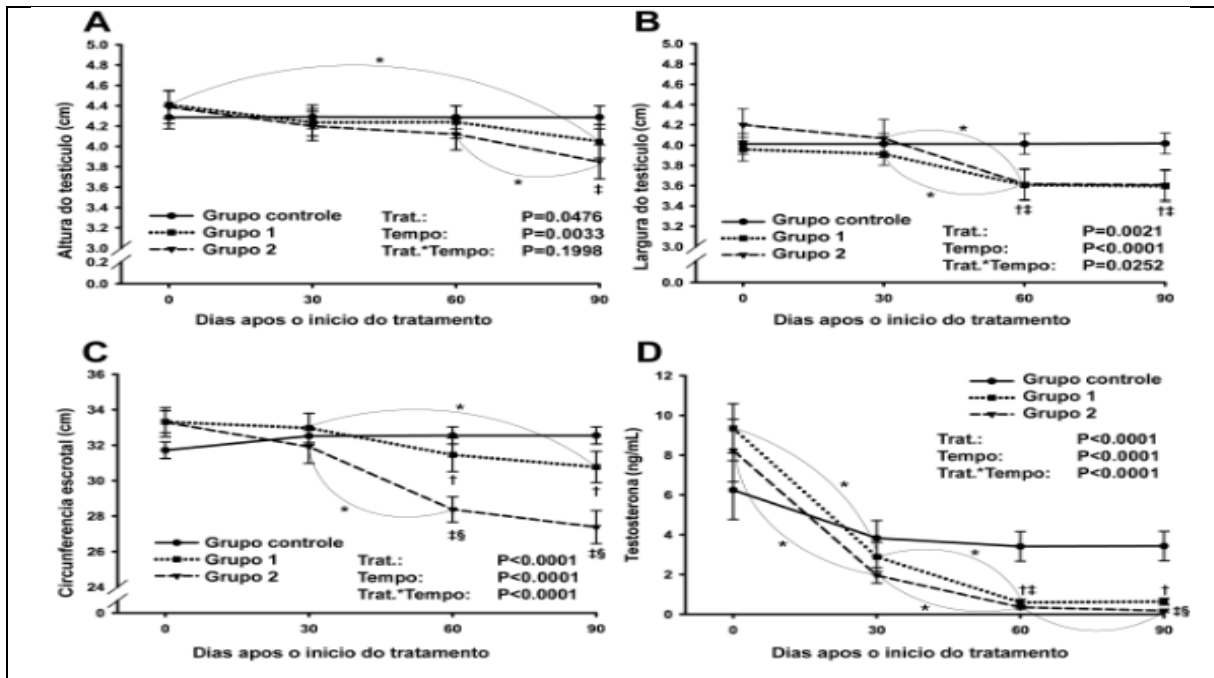


Figura 1. A-D. Parâmetros testiculares e testosterona sérica em touros imunizados contra GnRH uma vez (Grupo 1), duas vezes (Grupo 2) e controles (Grupo Controle). A: altura testicular; B: largura testicular; C: circunferência escrotal; D: testosterona sérica. Diferença ($p < 0,05$) ao longo do tempo para o mesmo grupo; † G1 vs GC ($p < 0,05$); ‡ G2 vs GC ($p < 0,05$); § G1 vs G2 ($p < 0,05$).

Tabela 1. Características de peso e carcaça de touros imunizados contra GnRH uma vez (Grupo 1), duas vezes (Grupo 2) e controle (Grupo Controle).

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo 1	Grupo 2	p
Peso inicial (kg)	433,8±5,8	418,6±2,4	426,7±3,1	0,0513
Peso final (kg)	557,9±8,3 ^a	528,6±5,0 ^b	539,2±6,0 ^{ab}	0,0141
Ganho de peso (Kg)	124,2±5,0	110,0±4,5	112,5±5,4	0,1214
GMD (kg)	1,4±0,1	1,2±0,0	1,3±0,1	0,1155
Rendimento de carcaça	50,0±0,1 ^b	50,0±0,1 ^b	50,3±0,1 ^a	0,0102

GMD: Ganho Médio Diário. ^{a, b} Letras diferentes sobrescritas, na mesma linha, diferem (p <0,05)

Todos os parâmetros espermáticos (figura 3A a 3E) foram afetados pela imunização ativa contra o GnRH (p <0,05), no entanto, as médias no G2 foram menores (p <0,05) do que no G1 a partir de 60 dias após o tratamento. No G2, dois touros apresentaram azoospermia. O efeito da imunização ao longo do tempo diferiu entre os parâmetros espermáticos. A motilidade espermática, por exemplo, foi menor nos dois grupos tratados (G1 e G2), em comparação ao controle, aos 30 dias, enquanto que para as diferenças de turbilhonamento espermático foram detectadas apenas aos 60 dias. Um maior quantidade de células espermáticas anormais foi possível identificar a partir dos 60 dias do experimento no grupo 2 (figura 3).

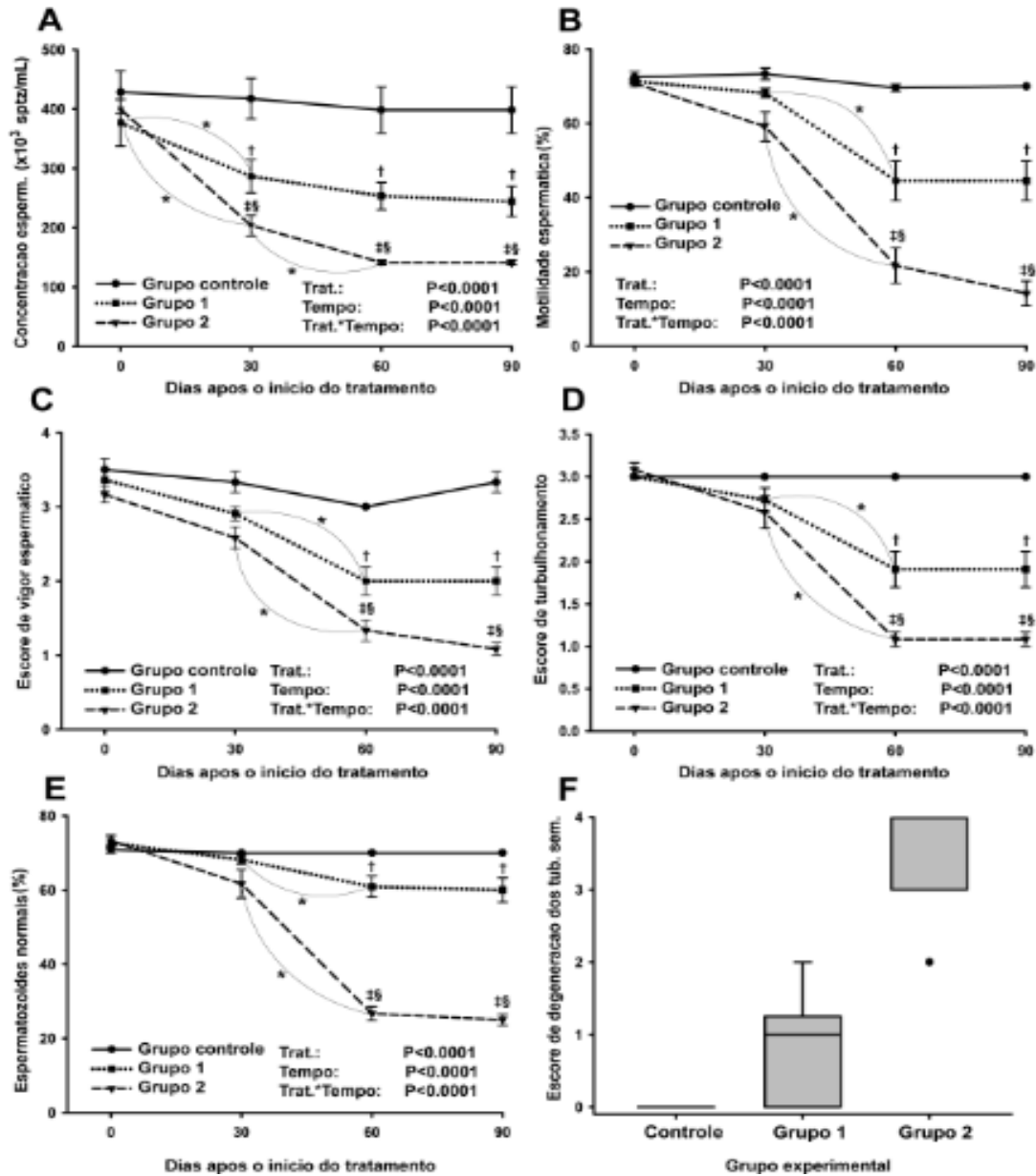


Figura 2. A - F. Parâmetros espermáticos e degeneração dos túbulos seminíferos de touros imunizados contra GnRH uma vez (Grupo 1), duas vezes (Grupo 2) e controles (Grupo Controle). A: concentração espermática; B: motilidade espermática; C: escore de vigor espermático; D: escore de turbilhonamento; E: espermatozoides normais; F: degeneração dos túbulos seminíferos. *Diferença ($p < 0,05$) ao longo do tempo para o mesmo grupo; † G1 vs GC ($p < 0,05$); ‡ G2 vs GC ($p < 0,05$); § G1 vs G2 ($p < 0,05$).

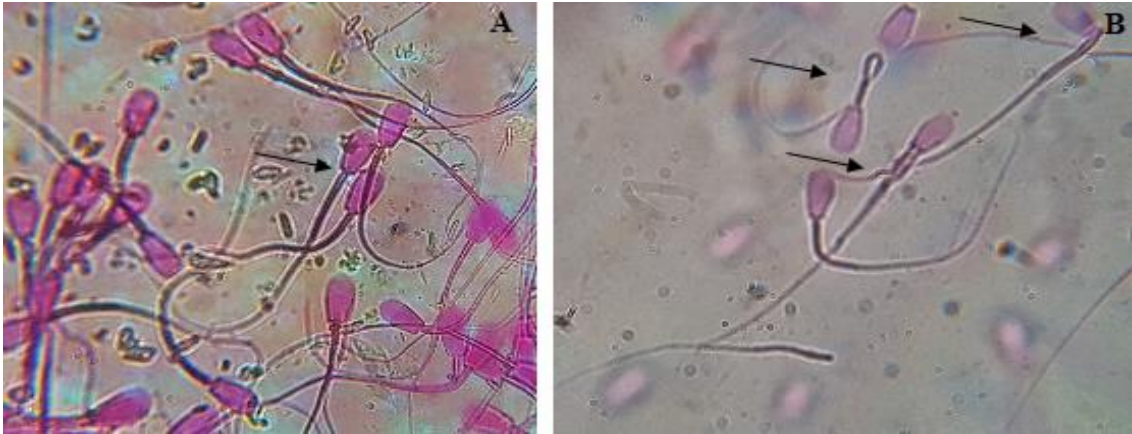


Figura 3. A- Células espermáticas normais do grupo controle. B- Alterações patológicas aos 90 dias no tratamento 2: peça intermediária em forma de saca rolhas; inserção paraxial da cabeça e cauda fortemente enrolada. (Aumento de 40x em microscopia óptica).

Foram observados de acordo com a tabela 2, associação entre o grau de degeneração dos túbulos seminíferos, após análise histopatológica, e outros parâmetros morfológicos e funcionais dos testículos. Não foi encontrado sinal de degeneração dos túbulos seminíferos após avaliação histopatológica dos testículos do GC. Entretanto, a degeneração estava presente em 75,0% e 100,0% das amostras do G1 e G2, respectivamente. A gravidade da degeneração foi maior de acordo com o número de imunizações ($0,9 \pm 0,1$ no G1 vs $3,1 \pm 0,2$ no G2, $P < 0,01$) (figura 2 F). Os diferentes graus de degeneração dos túbulos seminíferos são mostrados na figura 4 (A a D). Nos touros vacinados, o epitélio germinativo dos túbulos seminíferos sofreu alterações no número de espermatogônias, espermatócitos, espermatozoides (figura 4D) e células gigantes multinucleadas. A redução do tamanho e espessura dos ductos epididimários (figura 4F), a atrofia do epitélio seminífero e uma maior variação no tamanho, forma e densidade coincidem com as áreas em que foram observadas na espermatogênese reduzida.

Tabela 2. Associação entre o grau de degeneração dos túbulos seminíferos, após análise histopatológica, e outros parâmetros morfológicos e funcionais dos testículos.

Parâmetros	Coefficiente de correlação de Pearson	p
Circunferência escrotal	-0,56	0,0004
Altura do testículo	-0,28	0,1014
Largura do testículo	-0,23	0,1785
Testosterona sérica	-0,52	0,0012
Concentração espermática	-0,69	<0,0001
Motilidade espermática	-0,82	<0,0001
Vigor espermático	-0,79	<0,0001
Turbilhonamento	-0,79	<0,0001
Espermatozoides normais	-0,87	<0,0001

p<0,05 Significa diferença

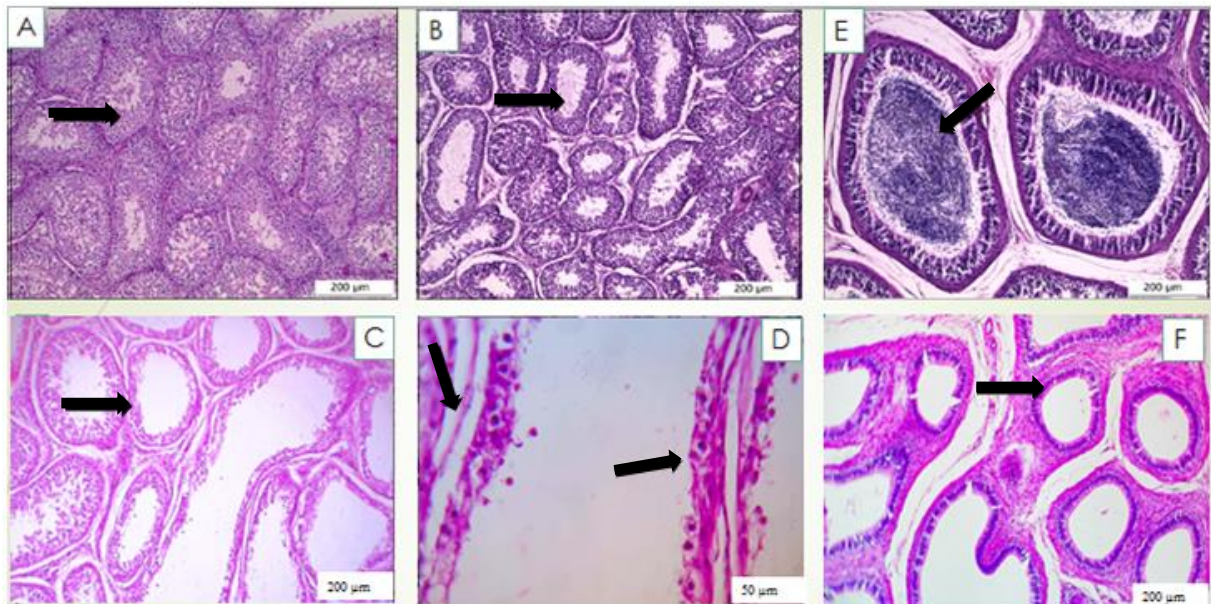


Figura 4. Características histológicas dos testículos (A-D) e dos epidídimos (E-F). (A) túbulos seminíferos ausentes de lesão (aumento de 40x). (B) Degeneração leve, grau 1 (aumento de 40x). (C) Degeneração moderada, grau 2 (aumento de 40x). (D) Degeneração severa, grau 3 (aumento de 40x), reduzido número de células germinativas, de Sertoli e de Leydig. (E) Ductos epididimários normais (aumento de 100x); lúmen ocupado por espermatozoides. Degeneração completa, grau 4 (F): Sem espermatozoides detectáveis nos ductos epididimários (aumento de 100x em microscopia óptica).

DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos de uma ou duas imunizações ativas anti GnRH nos parâmetros testicular e seminal de touros, confirmando as implicações da supressão do GnRH na morfofisiologia do testículo observados em diferentes tempos após a imunização. Uma única injeção da vacina anti GnRH (G1) resultou em efeitos gerais mais leves na produção e na qualidade dos espermatozoides.

No entanto, a redução nas concentrações de testosterona foi semelhante ao grupo que recebeu um reforço (G2), resultando em redução semelhante no desempenho do ganho de peso quando comparado ao GC. Implicações contrárias às encontradas por Olivieiro et al., [39], que com uma dose da vacina anti GnRH, não encontraram efeito na concentração de testosterona, bem como nos parâmetros espermáticos estudados em suínos.

Os resultados da biometria testicular de touros vacinados com vacina anti-GnRH mostraram que são necessárias duas doses (G2) para que ocorra uma efetiva imunização. Coerente com estudos anteriores e em espécies diferentes, o tamanho dos testículos foi reduzido significativamente somente após a segunda dose da vacina [19,20], porém os dados apresentados por Ülker et al., [25] em ovinos, demonstraram redução na concentração de testosterona após duas semanas da primeira imunização e 4 semanas na circunferência escrotal [21]. Sendo assim, o bloqueio do eixo hipotalâmico hipofisário por anticorpos produzidos pela aplicação da vacina reduz as concentrações de GnRH e conseqüentemente a circulação das gonodotrofinas e a atividade espermatogênica [22].

A redução dos testículos e circunferência escrotal está atribuída pelo reduzido número e volume das células dos túbulos seminíferos e à síntese da testosterona [23]. Como descrito por Janett et al. [16], menor peso testicular deve ser esperado em animais imunizados devido à relação entre população celular e o tamanho testicular. Ferro et al. [24] observaram que a redução nas concentrações de GnRH, FSH e LH causa uma redução na síntese e liberação de testosterona.

A falta de testosterona resulta em atrofia no epitélio germinativo e um número reduzido de células de Sertoli, além de promover a condensação nuclear e atrofia citoplasmática das células de Leydig [22]. De acordo com Han et al. [28], as concentrações séricas diminuídas de LH, FSH e testosterona restringem substancialmente a espermatogênese. No presente estudo, houve redução de 11,2% na largura testicular no grupo G2. Conseqüentemente, a redução na largura testicular refletiu uma redução de 18,1% na circunferência escrotal. Ferro et al. [24]

observaram que mamíferos machos imunocastrados podem apresentar reduções de até 20% duas semanas após a segunda imunização e 25% com uma terceira dose. Nesse sentido, é possível confirmar a hipótese de uma variação no tempo das mudanças na função testicular subsequente à imunização de acordo com os mecanismos registrados.

A baixa produção seminal e da motilidade, aumento dos defeitos espermáticos e baixa concentração de testosterona induzida durante os tratamentos no G1 e G2, confirmam o essencial papel deste hormônio na espermatogênese. Os resultados relacionados aos espermatozoides podem também estar associados à circunferência escrotal, volume testicular, comprimento e largura testicular, todavia são valores positivamente correlacionados para motilidade espermática (0,18 a 0,19) e porcentagem de espermatozoides normais (0,24 a 0,27) [penitente filho] provocado pela degeneração do epitélio germinativo causado pelo bloqueio do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal [23].

Em testículos hipoplásicos, quando espermátocitos em formação sofrem degeneração, o lúmen dos túbulos seminíferos pode conter detritos celulares e células multinucleadas [13,32] podendo haver concreções intraluminais. Além de corpos amiláceos [13], pequenas manchas ou grandes áreas de mineralização podem ser observadas durante a degeneração testicular especialmente em ruminantes [32], fato que não detectamos provavelmente devido ao curto período do estudo (12 semanas).

A falta de suporte do LH para células de Leydig resultou em uma queda na testosterona sérica após o tratamento, o que foi semelhante entre touros que receberam uma única injeção da vacina ou reforço. Destaca-se a falta de diferença na concentração de testosterona entre G1 e G2 após o dia 60, levando em consideração os resultados observados para os parâmetros espermáticos e histopatológicos.

A redução nas concentrações da testosterona nos touros vacinados sugere uma hipofunção das células de Leydig devido a provável deficiência da ação do LH durante enquanto houver produção de anticorpos [26]. Portanto, os efeitos da imunização anti-GnRH requerem produção contínua de anticorpos, então em seguida, a função testicular é restabelecida ao normal após o declínio dos títulos [27].

Apesar da média e do desvio padrão apresentaram-se menores nos touros do G2, ambos os tratamentos inibiram o eixo reprodutivo, contudo, nenhum deles induziu a concentração de testosterona a níveis indetectáveis. Levando em consideração que a produção de anticorpos após a imunização contra o GnRH é altamente variável entre indivíduos [15], a utilização da vacina, neste estudo, não seria um método anticoncepcional eficiente. No entanto,

pode-se considerar que a fertilidade foi reduzida devido às reduções progressivas notadas a partir do dia 30 nos grupos vacinados e não no grupo controle.

Embora a testosterona tenha um efeito anabólico, o ganho de peso dos touros vacinados não diferiu dos animais controle, fato que condiz com estudos anteriores [16, 29, 30]. A atividade física reduzida dos animais vacinados pode estar relacionada à diferença dos pesos no G1, G2 e controle. A esse respeito, a hipótese não foi confirmada, pois o uso de uma dose única do imunógeno teve efeito moderado nos parâmetros espermáticos, mas não na produção de testosterona. Conseqüentemente, o desempenho da produção foi semelhante ao do grupo que recebeu a injeção de reforço. Ademais, o percentual do rendimento de carcaça foi maior no grupo que recebeu duas doses da vacina (G2), conforme relatado anteriormente (Amatayakul-Chantler et al., 2013). Resultados contrastantes (diferenças no ganho de peso, mas não nas características de carcaça) foram encontrados quando três doses da vacina anti-GnRH foram usadas, todavia, os touros foram avaliados por um período mais longo (D'Occhio et al., 2001).

Nesse sentido, os efeitos potenciais de diferentes esquemas de imunocastração no desempenho e nas características da carne, de bovinos confinados, podem ser afetados pelas interações com antecedentes genéticos [31], finalização da dieta [32] e intervalo entre a vacinação e o abate [19]

CONCLUSÃO

A imunocastração conseguiu alterar e interromper a morfofisiologia testicular de touros Nelore púberes, portanto, pode ser considerada uma alternativa à castração cirúrgica. O uso da dose reforço com quatro semanas de intervalo entre as aplicações promoveu redução intensa na viabilidade espermática e na concentração sérica de testosterona, no entanto, o efeito de única dose deve ser mais investigado e pode levar a resultados menos consistentes ao longo do tempo.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Marti S, Realini CE, Bach A, Pérez-Juan M, Devant M. Effect of castration and slaughter age on performance, carcass, and meat quality traits of Holstein calves fed a high-concentrate diet. *J Anim Sci*. 2013;91:1129-40. doi: 10.2527/jas.2012-5717.
- [2] Quaresma MAG, Antunes IC, Ribeiro MF, Prazeres S, Bessa RJB, Da Costa P. M. Immunocastration as an alternative to caponization: evaluation of its effect on body and bone development and on meat color and composition. *Poultry Science* 2017; 96:3608-3615.
- [3] Marti S, Devant M, Amatayakul-Chantler S, Jackson JA, Lopez E, Janzen ED, Schwartzkopf-Genswein KS. Effect of anti-gonadotropin-releasing factor vaccine and band castration on indicators of welfare in beef cattle. *J Anim Sci* 2015;93:1581-91. doi: 10.2527/jas.2014-8346.
- [4] Rodriguez J, Unruh J, Villarreal M, Murillo O, Rojas S, Camacho J, Jaeger J, Reinhardt C. Carcass and meat quality characteristics of Brahman cross bulls and steers finished on tropical pastures in Costa Rica. *Meat Sci* 2014;96:1340-4. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.10.024.
- [5] Marti S, Jackson JA, Sloomans N, Lopez E, Hodge A, Pérez-Juan M, Devant M, Amatayakul-Chantler S. Effects on performance and meat quality of Holstein bulls fed high concentrate diets without implants following immunological castration. *Meat Sci* 2017;126:36-42. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.11.013.
- [6] Mintline EM, Varga A, Banuelos J, Walker KA, Hoar B, Drake D, Weary DM, Coetzee JF, Stock ML, Tucker CB. Healing of surgical castration wounds: a description and an evaluation of flunixin. *J Anim Sci* 2014;92:5659-65. doi: 10.2527/jas.2014-7885.
- [7] Meléndez DM, Marti S, Pajor EA, Moya D, Heuston CEM, Gellatly D, Janzen ED, Schwartzkopf-Genswein KS. Effect of band and knife castration of beef calves on welfare indicators of pain at three relevant industry ages: I. Acute pain. *J Anim Sci* 2017;95:4352-4366. doi: 10.2527/jas2017.1762.
- [8] Dockweiler JC, Coetzee JF, Edwards-Callaway LN, Bello NM, Glynn HD, Allen KA, Theurer ME, Jones ML, Miller KA, Bergamasco L. Effect of castration method on neurohormonal and electroencephalographic stress indicators in Holstein calves of different ages. *J Dairy Sci* 2013;96:4340-54. doi: 10.3168/jds.2012-6274.
- [9] Wolf CA, Tonsor GT, McKendree MGS, Thomson DU, Swanson JC. Public and farmer perceptions of dairy cattle welfare in the United States. *J Dairy Sci* 2016;99:5892-5903. doi: 10.3168/jds.2015-10619.
- [10] Lemos Teixeira D, Larraín R, Melo O, Hötzel MJ. Public opinion towards castration without anaesthesia and lack of access to pasture in beef cattle production. *PLoS One* 2018;13(1): e0190671. doi: 10.1371/journal.pone.0190671. eCollection 2018.
- [11] Thompson DL. Immunization against GnRH in male species comparative aspects. *Anim Reprod Sci*.2000;60:459-469. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00116-0
- [12] Junaidi A, Williamson E, Martin GB, Stanton PG, Blackberry MA, Cummins JM, Trigg TE. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotropin releasing hormone

(GnRH) and luteinizing hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod Fertil Develop* 2007;19: 891-8.

[13] Monleón E, Noya A, Carmen Garza M, Ripoll G, Sanz A. Effects of an anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine on the morphology, structure and function of bull testes. *Theriogenology* 2020;141:211-218. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.07.019.

[14] Bishop DK, Wettemann RP, Yelich JV, Spicer LJ. Ovarian response after gonadotropin treatment of heifers immunized against gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci*. 1996 May;74(5):1092-7.

[15] Balet L, Janett F, Hüsler J, Piechotta M, Howard R, Amatayakul-Chantler S, Steiner A, Hirsbrunner G. Immunization against gonadotropin-releasing hormone in dairy cattle: antibody titers, ovarian function, hormonal levels, and reversibility. *J Dairy Sci* 2014; 97(4):2193-203. doi: 10.3168/jds.2013-7602.

[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;78:182-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.01.035.

[17] Van den Broeke A, Leen F, Aluwé M, Ampe B, Van Meensel J, Millet S. The effect of GnRH vaccination on performance, carcass, and meat quality and hormonal regulation in boars, barrows, and gilts. *J Anim Sci* 2016; 94:2811-20. doi: 10.2527/jas.2015-0173.

[18] Coulter, GH., Foote, RH. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: A review. *Theriogenology*, 11(4), 297–311. doi:10.1016/0093-691x (79)90072-4

[19] Needham T, Lambrechts H, Hoffman L. Influence of extending the pre-slaughter interval after second vaccination on the carcass cutting yield and the quality of meat from immunocastrated lambs. *Meat Sci* 2019;148:13-18. doi: 10.1016/j.meatsci.2018.09.014.

[20] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. CBRA, 3.ed., p. 27-30, Belo Horizonte, 2013.

[21] Vianna WL, Bruno DG, Namindome A, de Campos Rosseto AC, Barnabé RC, de Sant' Anna Moretti A. Evaluation of the Karras spermdensimeter in relation to the Neubauer counting chamber for sperm concentration measurement in boar semen. *Reprod Domest Anim* 2007;42:466-70. doi:

[22] Minton JE, Wettemann RP, Meyerhoeffler DC, Hintz RL, Turman EJ. Serum Luteinizing Hormone and Testosterone in Bulls during Exposure to Elevated Ambient Temperature. *J Anim Sci* 1981;53:1551–1558. doi:10.2527/jas1982.5361551x

[23] Santos MD, Torres CA, Ruas JRM, Machado GV, Costa DS, Angulo LM. Concentração sérica de testosterona em touros Zebu. *Rev Bras Zootec* 2000;29:738-744. doi: 10.1590/S1516-35982000000300015

- [24] Cavalieri J, Wang M, Johnson L. Chemical sterilisation of *Bos indicus* bull calves following intratesticular injection of zinc acetate: effects on semen quality and testicular changes. *Anim Reprod Sci* 2015;156:23-33. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.02.004.
- [25] Ülker H, Yilmaz A, Karakus F, Yörük M, Budag C, Avila DM de, Reeves JJ. LHRH fusion protein immunization alters testicular development, ultrasonographic and histological appearance of ram testis. *Reprod. in Domestic Anim* 2009.
- [26] Ferro VA, Khan MAH, Macadam D, Colston A, Aughey E, Mullen AB, Waterston MM, Harvey MJA. Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH) a histological comparison in male animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004; 101:73-86.
- [27] Berndston WE, Desjardins C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat* 1974;140:167-79. doi: 10.1002/aja.1001400204
- [28] Finnerty M, Enright WJ, Roche F. Testosterone, LH and FSH episodic secretory patterns in GnRH-immunized bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1998, 114, 85-94.
- [29] Lents MP, Barbosa LP, Santana ALA, Pinheiro EEG, Mugabe LC, Biscarde CEA, Kiya CK, Machado WM, Souza RS. Immunocastration of goats using anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine. *Theriogenology* 2018;114:7-13. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.03.013.
- [30] Han X, Gu L, Xia C, Feng J, Cao X, Du X, Zeng X, Song T. Effect of immunization against GnRH on hypothalamic and testicular function in rams. *Theriogenology*. 2015;83:642-649
- [31] Penitente-Filho JM, Silva FF, Facioni Guimarães S, Waddington B, da Costa EP, Gomez Leon V, Siqueira JB, Silva Okano D, Piccolo Maitan P, Guimarães JD, Relationship of testicular biometry with semen variables in breeding soundness evaluation of Nellore bulls, *Animal Reproduction Science* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.010>
- [32] Foster RA. Male reproductive system. In: McGavin MD, Zachary JF, editors. *Pathologic basis of veterinary disease*. Mosby Elsevier; 2007. p. 1317-48.
- [33] Claus R, Rottner S, Rueckert C. Individual return to Leydig cell function after GnRH-immunization of boars. *Vaccine* 2008;26: 4571-8.
- [34] Wicks N, Crouch S, Pearl CA. Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. *Anim Reprod Sci* 2013;142:149-59. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.09.017.
- [35] Xu M, Xu C, Liu F, Shen X, Meng J, Chen H, Yang J, Zhou P, Gao R, Gan S. Effects of active immunization with newly modified GnRH peptides on spermatogenesis and production performance of Holstein bulls. *Biol Reprod* 2018;99:461-472. doi: 10.1093/biolre/iox176.
- [36] Cook RB, Popp JD, Kastelic JP, Robbins S, Harland R. The effects of active immunization against GnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. *J Anim Sci* 2000; 78:2778-2783. doi: 10.2527/2000.78112778x

- [37] Monteiro AC, Navas DR, Lemos JP. Effects of castration and time-on-feed on Mertolenga breed beef quality. *Animal* 2014;8:675-82. doi:10.1017/S1751731114000196.
- [38] Prado IN, Campo MM, Muela E, Valero MV, Catalan O, Olleta JL, Sañudo C. Effects of castration age, protein level and lysine/methionine ratio in the diet on colour, lipid oxidation and meat acceptability of intensively reared Friesian steers. *Animal* 2015;9:1423-30. doi:10.1017/S1751731115000580.
- [39] Oliviero, C., Ollila, A., Andersson, M., Heinonen, M., Voutilainen, L., Serenius, T., Peltoniemi, O. (2016). Strategic use of anti-GnRH vaccine allowing selection of breeding boars without adverse effects on reproductive or production performances. *Theriogenology*, 85(3), 476–482. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.027.