

Efeitos da castração imunológica no epitélio seminífero de machos bubalinos

Effects of immunological castration on the seminiferous epithelium of buffaloes males

Leonardo Reis Silva¹, Wilton Figueiredo Lima¹, Sebastião Tavares Rolim Filho², Haroldo Francisco Lobato Ribeiro², Otávio Mitio Ohashi³

¹Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia, Belém, PA, Brasil

²Universidade Federal Rural do Pará, Belém, PA, Brasil

³Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

Resumo

O procedimento de imunocastração vem sendo utilizado como técnica alternativa amplamente favorável ao bem-estar animal, por ser indolor, pouco invasiva e com eficácia semelhante à da castração cirúrgica, que causa maior estresse aos animais, principalmente quando realizada de forma inadequada. A imunocastração estimula a produção de anticorpos contra o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), bloqueando temporariamente a produção da testosterona pelas gônadas masculinas. Face a escassez de informações sobre este procedimento em touros bubalinos, o estudo teve como objetivo analisar os possíveis efeitos da imunocastração no parênquima testicular de búfalos. Vinte touros bubalinos, com idade entre 2 a 3 anos, oriundos da ilha do Marajó – PA, foram avaliados e divididos aleatoriamente em dois grupos composto por dez animais no grupo controle (GC) e dez do grupo imunocastrado (GIM). O produto utilizado foi a vacina anti-GnRH Bopriva® (Zoetis, SP, Brasil). O GIM recebeu duas doses de 1,0ml contendo 400µg da vacina Bopriva® com intervalo de 8 semanas entre as aplicações e o grupo controle recebeu 1,0 ml de solução fisiológica. Após 14 dias da última dose, os animais foram abatidos e coletado os 20 pares de testículos para análises de parâmetros macroscópicos como: comprimento, largura, circunferência e peso. Além disso, foi realizada a retirada de fragmentos do parênquima testicular para confecção de lâminas histológicas. Para comparação dos dados foi aplicado o teste t de Student (Nonparametric Test) considerando a significância com $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Foi observado diferença significativa entre os dois grupos para grupos para peso (direito $p < 0,0001$; esquerdo $p \leq 0,0001$), circunferência (direita $p < 0,0001$; esquerda $p < 0,0001$), largura (somente lado direito $p < 0,0372$) e comprimento (direita $p \leq 0,0013$; esquerda $p < 0,0437$). Na avaliação microscópica, os animais do GC não apresentaram alterações. Nos animais do GIM houve degeneração em todas as amostras, sendo visualizado descamação, tortuosidade e espessamento da membrana basal do túbulo seminífero, assim como vacuolização e atrofia das células de Sertoli. Foi observado também uma redução do número de células de Leydig, fibrose intertubular pronunciada, núcleos picnóticos, azoospermia e células multinucleadas no interior dos túbulos. Conclui-se a vacina anti-GnRH mostrou-se eficaz em provocar lesões no parênquima testicular, comprometendo significativamente a espermatogênese a partir da possível supressão de testosterona.

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

Abstract

The immunocastration procedure has been used as an alternative technique widely favorable to animal welfare, as it is painless, minimally invasive and with similar efficacy to surgical castration, which causes greater stress to animals, especially when performed improperly. Immunocastration stimulates the production of antibodies against Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), temporarily blocking the production of testosterone by the male gonads. Due to the scarcity of information about this procedure in buffalo bulls, the study aimed to analyze the possible effects of immunocastration on the testicular parenchyma of buffaloes. Twenty buffalo bulls, aged between 2 and 3 years, from the island of Marajó - PA, were evaluated and randomly divided into two groups consisting of ten animals in the control group (CG) and ten from the immunocastrated group (GIM). The product used was the anti-GnRH vaccine Bopriva® (Zoetis, SP, Brazil). The GIM received two doses of 1.0ml containing 400µg of Bopriva® vaccine with an interval of 8 weeks between applications and the control group received 1.0 ml of saline solution. After 14 days of the last dose, the animals were slaughtered and the 20 pairs of testes were

*Correspondência: leoreisreis94@gmail.com

Recebido: 05/08/2021

Aceito: 06/11/2022



collected for analysis of macroscopic parameters such as: length, width, circumference and weight. In addition, fragments of the testicular parenchyma were removed for the preparation of histological slides. To compare the data, Student's *t* test (Nonparametric Test) was applied, considering the significance with $p < 0.05$ and a confidence interval of 95%. A significant difference was observed between the two groups for weight groups (direct $p < 0.0001$; left $p \leq 0.0001$), circumference (right $p < 0.0001$; left $p < 0.0001$), width (only right side $p < 0.0372$) and length (right $p \leq 0.0013$; left $p < 0.0437$). In the microscopic evaluation, the animals of the CG showed no alterations. In the GIM animals there was degeneration in all samples, with desquamation, tortuosity and thickening of the seminiferous tubule basement membrane, as well as vacuolization and atrophy of Sertoli cells. A reduction in the number of Leydig cells, pronounced intertubular fibrosis, pyknotic nuclei, azoospermia and multinucleated cells within the tubules were also observed. In conclusion, the anti-GnRH vaccine proved to be effective in causing lesions in the testicular parenchyma, significantly compromising spermatogenesis from the possible suppression of testosterone.

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

Introdução

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

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

Por outro lado, novas técnicas estão sendo implementadas como alternativa favorável ao bem-estar dos animais, como é o caso da castração imunológica, que reduz o comportamento sexual e agressivo em touros inteiros (Marti et al., 2015). O procedimento é baseado no uso da vacina Anti-GnRH que é composta por uma forma modificada do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) conjugada a uma proteína, na qual, estimula o sistema imunológico do animal a produzir anticorpos específicos contra o GnRH que é secretado pelo hipotálamo e regula a secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), os quais controlam a secreção de testosterona e a espermatogênese (Janett et al., 2012; Monléon et al., 2020).

Desta forma, o próprio sistema imune suprime o GnRH, interrompendo o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal através de uma barreira imunológica, e impedindo a passagem de GnRH do local de liberação no hipotálamo ao local de ação na adenoipófise (Bauer et al., 2008). Os antagonistas de GnRH induzem a supressão da secreção de gonadotrofina, levando a um quadro de infertilidade reversível (Ferro et al., 2001).

Portanto, a castração imunológica em búfalos pode trazer inúmeros benefícios, como: impedir a dor associada aos procedimentos de castração cirúrgica, ausência do risco de feridas que causem infecção e complicações no processo de cicatrização, redução das incidências de morbidade e mortalidade e cooperando para o bem-estar animal (Needham et al., 2017). Assim como impedir o estresse do manejo inadequado da castração cirúrgica que é implantado na rotina da pecuária, aumento na massa corporal para o abate, maior proporção de músculo e gordura na carcaça em comparação a animais inteiros ou castrados cirurgicamente (Amatayakul-chantler, et al., 2013). Por fim torna-se uma alternativa favorável para reduzir comportamento sexual e agressivo em touros intactos (Marti et al., 2015). O mercado brasileiro tem ofertado alguns produtos imunocastradores, como o Bopriva® (Zoetis, BR), de ação anti-GnRH que é usado em duas doses, onde a primeira dose sensibiliza o sistema imunológico e a segunda dose ativa a resposta imune em 7 a 14 dias após a administração (Assumpção et al. 2017).

Até o presente momento, não existem estudos prévios que utilizem o procedimento de imunocastração com a vacina Anti-GnRH em touros bubalinos, bem como seus efeitos sobre o sistema reprodutor do animal. Assim objetivou-se por meio deste estudo avaliar os efeitos da castração imunológica



com vacina anti-GnRH Bopriva[®] sobre o epitélio seminífero de touros bubalinos. Afim de apontar os benefícios da vacina nesses animais.

Material e Métodos

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

Esse estudo foi conduzido pelo Laboratório de Reprodução animal da Universidade Federal Rural do Pará em parceria com produtores de búfalos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA- UFRA 1566230421. Foram utilizados 20 touros em idade reprodutiva e divididos em 2 grupos: grupo controle (GC) e grupo imunocastrados (GIM). O GIM recebeu duas doses (via subcutânea) de 1,0 ml da vacina anti-GnRH Bopriva[®] contendo 400µg com intervalo de 8 semanas “60 dias” entre as doses, enquanto que o GC recebeu duas doses de solução fisiológica durante o mesmo período que o GIM. Ao término da segunda dose, foi contabilizado quatorze dias até que todos os animais deste estudo fossem abatidos no matadouro SOCIPE (localizado na cidade de Belém-PA, Brasil), seguindo todos os protocolos adequados deste procedimento.

Procedimento de coleta dos testículos, análises macroscópicas e preparo das amostras

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

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

Análises histológicas

Para a análise microscópica, os cortes foram avaliados utilizando aumentos de 5x, 10x e 20x, analisando possíveis alterações em células testiculares e degeneração das células epiteliais dos túbulos seminíferos (Silva, *et al.* 2013). Realizou-se fotomicrografias utilizando o microscópio Nikon Eclipse E500 com o Moticam 2500[®] acoplado a ele. As fotomicrografias foram analisadas utilizando-se o *software ImageJ com plugin Cell Counter e Batch measure.*

Análise estatística

As análises foram realizadas através do processador de dados *software GraphPad Prism 8.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Foi realizado o teste de poder, considerou-se como satisfatório o poder superior a 90%, seguido pela realização do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para a diferença estatística significativa entre os grupos, foi aplicado o teste t de Student (Nonparametric Test) considerando a significância com $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Todos os resultados foram expressos com média \pm e desvio padrão.

Resultados

Em relação às variáveis macroscópicas, os animais do GIM possuíam testículos menores (Figura1) e houve diferença significativa entre os dois grupos para peso (direto $p < 0,0001$; esquerdo $p \leq 0,0001$), circunferência (direita $p < 0,0001$; esquerda $p < 0,0001$), largura (somente lado direito $p < 0,0372$) e comprimento (direita $p \leq 0,0013$; esquerda $p < 0,0437$). As médias obtidas para cada variável de ambos os grupos se encontram na Tabela 1. Os animais do GIM começaram a demonstrar diminuição nas variáveis a partir da segunda semana pós segunda dose da vacina anti-GnRH.

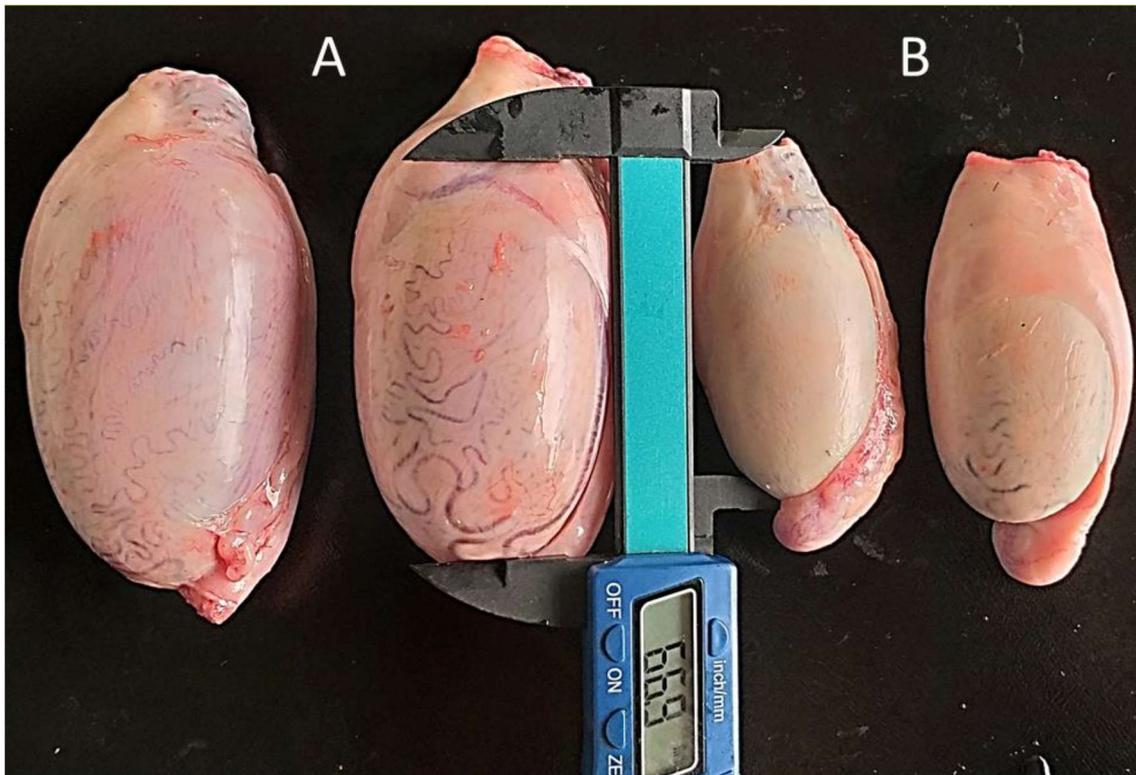


Figura 1. Fotoanálise e comparação macroscópica visual entre o tamanho do par de testículos de bubalinos do grupo controle (A) e bubalinos imunocastrados (B).

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

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

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

Quanto a avaliação microscópica, os animais do GC não obtiveram alterações. O tecido epitelial testicular do GC apresentou aparência normal, com a presença e distribuição das células de Sertoli, bem como normalidade dos túbulos seminíferos, com produção de espermatozoides e células germinativas. O padrão de arquitetura fisiológica foi observado em todas as amostras (figura 2). Nos animais do GIM houve degeneração em todas as amostras, sendo visualizado descamação, tortuosidade e espessamento da membrana basal do túbulo seminífero, assim como vacuolização e atrofia das células de Sertoli. Foi observado também uma redução do número de células de Leydig, fibrose intertubular pronunciada, núcleos picnóticos, azoospermia e células multinucleadas no interior dos túbulos (figura 3)

Discussão

Pela primeira vez na literatura o estudo traz resultados importantes a respeito das alterações morfológicas e histomorfológicas através da ação da vacina Anti-GNRH, utilizada em touros bubalinos. É possível evidenciar que a vacina Bopriva, foi capaz de alterar diâmetro, comprimento, largura e peso total dos testículos dos animais tratados, tão quanto as alterações histomorfológicas que demonstram a diminuição dos túbulos seminíferos e seus respectivos lúmens.

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

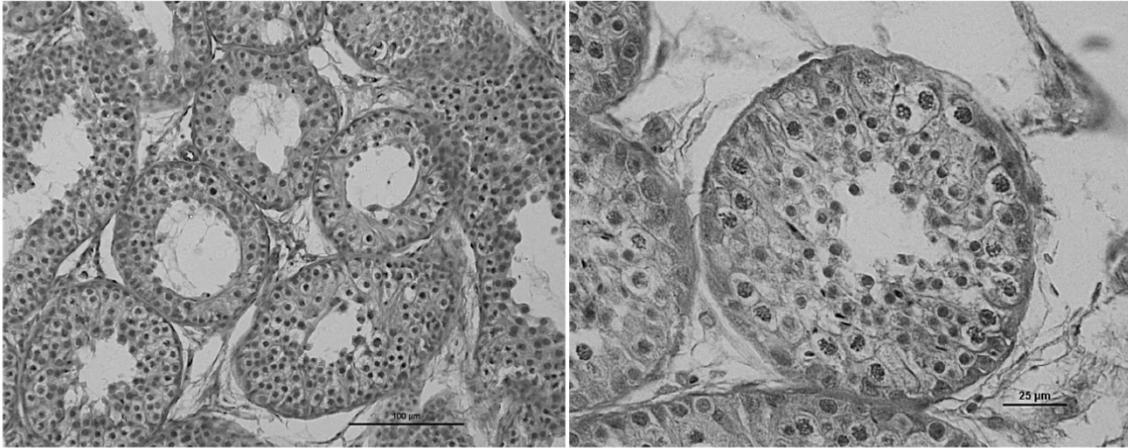


Figura 2. Microfotografias de luz dos testículos de Búfalos do GC [HE; 25x-100x]. O grupo controle apresentou morfologia e distribuição normal dos túbulos seminíferos, epitélio germinativo intacto, presença de células no interstício, normalidade de células germinativas e presença de espermatozoides no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

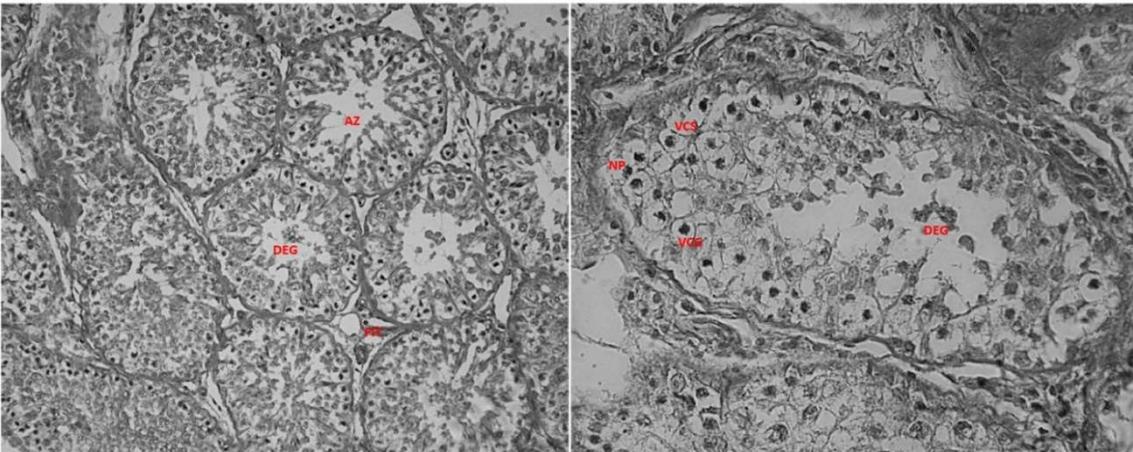


Figura 3. Microfotografias de luz dos testículos de Búfalos submetidos a castração imunológica, [HE; 25x-100x]. Pode ser observado com mais frequência a descamação do epitélio germinativo (DEG), núcleos picnóticos (NP), vacuolização das Células de sertoli (VCS) e Células Germinativas (VCG), fibrose intertubular (FIT) e azoospermia (AZ).

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

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

Quando o intervalo entre doses for de aproximadamente 30 dias o efeito da castração se estende por 90 dias, com 60 dias entre doses o efeito castrado é de 120 dias, com intervalo aproximado de 90 dias o efeito castrado é de 150 dias que é o protocolo mais utilizado (PALU, 2018). A imunidade se estabelece em duas semanas após a aplicação da segunda dose da vacina, sendo que a primeira aplicação serve para sensibilizar o sistema imunológico do animal (Dunshea *et al.*, 2011; Bopriva, 2017). Por isso, no estudo, foi decidido realizar



a metodologia do intervalo entre doses de 8 semanas baseada nas especificações do laboratório farmacológico da vacina Bopriva.

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

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

Em virtude da escassez de dados na literatura para a presente espécie, com relação a peso testicular, optou-se pela comparação desse dado com a espécie suína. Logo, nossos resultados corroboraram também ao de Einarsson *et al.* (2009) em suínos com Improvac®. Segundo o autor os suínos apresentaram uma diminuição no peso testicular significativa. Em contrapartida, o mesmo padrão percentual de diminuição no peso testicular não foi observado por Wicks *et al.* (2013), nesse estudo foi utilizado Bopriva® e Improvac® em suínos e foi percebido uma redução maior respectivamente, o que explica isso seria a diferença entre as espécies utilizadas, idades reprodutivas e doses ministradas.

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

Aparentemente, foram observadas possíveis atrofias testiculares e degeneração tecidual em animais do grupo GIM, principalmente nos túbulos seminíferos, acompanhada com a redução significativa da área total dos túbulos seminíferos, que segundo Jubb *et al.* (2007) pode ter relação direta na população e proliferação de células de Sertoli.

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

A atrofia testicular pode ocorrer por influências sistêmicas ou ambientais que podem ser associadas a supressão de gonadotrofinas pituitárias, administração de andrógenos ou estrógenos exógenos, desnutrição, deficiência de vitaminas, febre ou hipertermia prolongada, patologias vasculares infecciosas ou neoplásicas (Jones *et al.*, 2000; Caixeta, 2019). O que se confirma no presente estudo, haja visto que a vacina Anti-GnRH causa bloqueio no eixo reprodutivo, provocando a infertilidade total reversível no animal.

Dessa forma, este trabalho evidenciou que a vacina Anti-GnRH foi capaz de causar alterações a nível histológico nas amostras de testículos, levando a um quadro de degeneração e atrofia testicular.

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

A ausência total de espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero foi observada em 95% das amostras, e nas amostras restantes (5%), foi verificada a redução do número de espermatozoides, provavelmente em consequência da inibição parcial da espermatogênese. Efeito semelhante foi observado por Robertson *et al.* (1982), que imunizaram bezerras com uma vacina anti-LHRH e verificaram a supressão das funções gonadais e do comportamento sexual dos animais na maioria percentual dos animais porém o restante permaneceu com presença pequena de espermatozoides.



Conclusão

Conclui-se que a vacina anti-GnRH pode comprometer a fertilidade de búfalos, tão quanto demonstrado em outras espécies de mamíferos, possivelmente por interromper diretamente a produção de espermatozoides a partir da supressão de testosterona. A provável supressão na função testicular foi demonstrada através da análise macroscópica e histológica, que se mostrou eficaz para a comparação entre os grupos de animais imunocastrados e não castrados. Assim como o procedimento se torna uma alternativa viável de método contraceptivo de controle comportamental, por meio da possível supressão da síntese de testosterona.

Agradecimentos

Agradecemos ao Pesquisador e Professor Dr. Otávio Mitio Ohashi (*in memoriam*) por sua contribuição neste estudo, assim como os anos dedicados à pesquisa com búfalos. A equipe do Laboratório de reprodução animal da Universidade Federal Rural da Amazônia, Laboratório de reprodução animal da Universidade Federal do Pará e equipe da Fazenda Ilha Nova (Marajo/PA).

Referências

- Amatayakul-Chantler S, Hoe F, Jackson JA, Roca RO, Stegner JE, King V, Howard R, Lopez E, Walker J.** Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine Bopriva or surgical castration of *Bos indicus* bulls raised on pasture in Brazil. *Meat Sci*, v.95, n.1, p.78-84, set. 2013.
- Amatayakul-Chantler S, Jackson JA, Stegner J, King V, Rubio LMS, 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. *J Anim Sci*, v.90, n.11, p.3718-3728, 1 nov. 2012.
- Aponte PM, Gutierrez-reinoso MA, Sanchez-Cepeda EG, Garcia-Herreros M.** Active immunization against GnRH in pre-pubertal domestic mammals: testicular morphometry, histopathology and endocrine responses in rabbits, guinea pigs and ram lambs. *Animal*, v.12, n.4, p.784-793, 24 ago. 2017.
- Assumpção TI, Barros JPMM, Macedo GG.** Efeito da imunocastração sobre o perímetro escrotal e a produção espermática em touros da raça nelore. *Bol. Ind. Anim, Nova Odessa*, v.74, n.3, p.294-299, 2017.
- Bauer A, Lacorn M, Danowski K, Claus R.** Effects of immunization against GnRH on gonadotropins, the GH-IGF-I-axis and metabolic parameters in barrows. *Animal*, v.2, n.8, p.1215-1222, ago. 2008.
- Biagini D, Lazzaroni C.** Effect of pre- and post-pubertal castration on Piemontese male calves: i. live and slaughtering performances. *Livest Sci*, v.110, n.1-2, p.181-186, jun. 2007.
- Bopriva.** 2017. Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda. Bula, 2p. Disponível em: <http://www.bopriva.com.br>. Acesso em 27 Mar. 2019.
- Caixeta JPS.** Prevalência das alterações histopatológicas testiculares encontradas na raça curraleiro pé-duro, nelore e seus cruzamentos, criados na região semi-árida do Brasil. Dissertação (Mestrado em programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos – PPGSPAT) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2019.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Florez-Rodriguez SA, Santos FB, Alves MBR, Oliveira BMM.** Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim, Belo Horizonte*, v.41, n.1, p.40-45, mar. 2017.
- Civeiro M.** Métodos de castração de machos holandeses alimentados com dieta de alto grão. 2017. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – PPGZ) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2017.
- 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*, v.78, n.11, p.2778-2783, 2000.
- D'occhio MJ.** Immunological suppression of reproductive functions in male and female mammals. *Anim Reprod Sci*, v.33, n.1-4, p.345-372, out. 1993.
- Dunshea FR, Cronin GM, Barnett JL, Hemsworth PH, Hennessy DP, Campbell RG, Luxford B, Smits RJ, Tilbrook AJ, King R.** Immunisation against gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) increases growth and reduces variability in group-housed boars. *Anim. Prod. Sci*, v.51, n.8, p.695-702, 2011.



- Einarsson S, Andersson K, Wallgren M, Lundström K, Rodriguez-Martinez H.** Short- and long-term effects of immunization against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. *Theriogenology*, v.71, n.2, p.302-310, 2009.
- Ferro V, 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. *J. Reprod. Immunol*, v.51, n.2, p.109-129, 2001.
- Garcia AR.** Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? *Rev. Bras. Reprod. Anim*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.33-39, 2017.
- Han X, Zhou Y, Zeng Y, Sui F, Liu Y, Tan Y, Cao X, Du X, Meng F, Zeng X.** Effects of active immunization against GnRH versus surgical castration on hypothalamic-pituitary function in boars. *Theriogenology*, v.97, p.89-97, 2017
- 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 prepubertal bull calf. *Anim. Reprod. Sci*, v.131, n.1-2, p.72-80, 2012.
- Janett F, Stump R, Burger D, Thun R.** Suppression of testicular function and sexual behavior by vaccination against GnRH (Equity™) in the adult stallion. *Anim. Reprod. Sci*, v.115, n.1-4, p.88-102, 2009.
- Jones TC, Hunt RD, King NW.** *Patologia veterinária*. 6.ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N.** *Phatol. Dom. Anim. British*, 2007. 3 rd, 5ª Ed, p.565-618.
- Machado DS, Alves Filho DC, Argenta FM, Brondani IL, Viana AFP, Volpato RS, Oliveira LM, Klein JL, Moura AF, Frasson JJN.** Características de carcaça e carne de novilhos Aberdeen Angus submetidos à castração cirúrgica ou imunológica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, Belo Horizonte, v.71, n.2, p.658-666, 2019.
- Machado DS.** Uso da imunocastração como alternativa a castração cirúrgica na produção. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – PPGZ) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- 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*, v.93, n.4, p.1581-1591, 2015
- Mazon MR.** Efeitos da imunocastração e de agonistas beta-adrenérgicos sobre a qualidade de carne de bovinos. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- Monleón E, Noya A, Garza C, Ripoll G, Sanz A.** Effects of an anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine on the morphology, structure and function of bull testes. *Theriogenology*, v.141, p.211-218, 2020.
- Naz RK, Saver, Ashley E.** Immun contraception for Animals: current status and future perspective. *Am. J. Reprod. Immunol*, v.75, n.4, p.426-439, 2015.
- Needham T, Lambrechts H, Hoffman LC.** Castration of male livestock and the potential of immunocastration to improve animal welfare and production traits: Invited Review. *S. Afr. J. Anim. Sci*, v.47, n.6, p.731-742, 2017.
- Palu AB.** Desempenho produtivo de bovinos de corte submetidos a dois métodos de castração na Amazônia ocidental. Dissertação (Mestrado em Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental – PPGESPA) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.
- Robertson IS, Fraser HM, Innes GM, Jones AS.** Effect of immunological castration on sexual and production characteristics in male cattle. *Vet. Rec. Open*, v.111, p.529-531, 1982.
- Silva DR, Moura MI, Miguel MP, Silva LAF, Matos MPC, Moura VMBD.** Avaliações histológica e histomorfométrica de testículos de bovinos com dermatite digital. *Cienc. Anim. Bras*, v.14, n.3, p.391-398, 2013.
- Theubet G, Thun R, Hilbe M, Janett F.** Wirkung einer Impfung gegen GnRH (Bopriva®) beim männlichen pubertären Kalb. *Schweiz Arch Tierheilkd*, v.152, n.10, p.459-469, 2010.
- Viu M, Magnabosco C, Ferraz H, Gambarini M, Oliveira Filho B, Lopes DT, Viu A.** Desenvolvimento ponderal, biometria testicular e qualidade seminal de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) criados extensivamente na região centro-oeste do Brasil. *Arch. Vet. Sci*, v.11, n.3, p.53-57, 2006.
- Wicks N, Crouch S, Pearl CA.** Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. *Anim. Reprod. Sci*, v.142, n.3-4, p.149-159, 2013.
- Withoeft JA, Chicocca M, Santiani F, Costa LS, Mateus KA, Santos MR, Casagrande RA, Cucco DDC.** Anatomopathological Evaluation of Young Bulls (*Bos taurus*) Testicles Submitted to Immunocastration. *Acta Sci. Vet*, v.47, n.1, 2019.



Zanella R, Zanella EL, Reeves JJ, Hernandez J, Motta AC, Avila D. Características testiculares de touros imunizados com vacina anti-hormônio liberador do hormônio luteinizante. *Pesq. Agropec. Bras*, v.10, n.44, p.1359-1363, 2009.
