Avaliação anatomopatológica de testículos de bovinos (*Bos taurus*) superprecoces submetidos a imunocastração

Anatomopathological Evaluation of Young Bulls (*Bos taurus*) Testicles Submitted to Immunocastration

Jéssica Aline Withoeft¹, Maisa Chiocca², Fábio Santiani¹, Leonardo Silva da Costa¹, Karina Aline Mateus², Moises Rodrigues dos Santos², Renata Assis Casagrande¹ & Diego de Córdova Cucco²

ABSTRACT

Background: Immunocastration is a less invasive and painless procedure compared 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 hormone production by the male gonads. Anatomopathological evaluation of animals submitted to immunocastration with the establishment of different degrees of testicular degeneration helps to evaluate the efficacy of the different dose ranges used for this procedure. Because of the scarcity of information about this procedure in young bulls, the study aimed to compare the immunocastrated and non-castrated animals.

Materials, Methods & Results: Eighteen Angus-Limousin bulls were used from weaning (7±1 months) to slaughtering (15±1 months) with the establishment of two groups composed of nine non-castrated (NC) and nine immunocastrated (IC) animals. In the IC group, three doses of GnRH synthesis inhibitor vaccine (Bopriva®) were applied on days 0 (weaning), 87 and 223. At slaughter, scrotal circumference, weight (kg), width (cm), length (cm) and total size (width x length) of the testicles were obtained, then were routinely processed for histopathological analysis. Four degrees of testicular degeneration was established: grade 0 (no changes), grade 1 (mild), grade 2 (moderate) and grade 3 (severe). Statistical analysis was performed using Student's t-test to compare the means of macroscopic variables. The scrotal circumference started to decrease in the IC animals on day 132, with a certain growth from day 194. There was a significant difference between the two groups for width ($P = 0.001$), length ($P = 0.004$), total size ($P = 0.003$) and scrotal circumference ($P = 0.04$). Testicles of the IC group tended to be lighter ($P = 0.06$). The final difference between the groups was 6.3 cm for scrotal perimeter, with respective averages of 27.44 cm and 33.77 cm for the IC and NC group, respectively. In the microscopic evaluation, NC animals obtained grade 0. In the IC animals, 33.33% (3/9) had degeneration grade 1 with slight basement membrane tortuosity and Sertoli cell atrophy, 33.33% (3/9) obtained grade 2 with moderate tortuosity and thickening of seminiferous tubules, Sertoli and Leydig cell atrophy, and absence of spermatogenesis and 33.33% (3/9) reached grade 3, with decreased seminiferous tubules and a severe and diffuse atrophy of Leydig and Sertoli cells and complete absence of spermatogenesis, with a 1:5 ratio in seminiferous tubule diameter between NC and IC grade 3 animals, respectively.

Discussion: There was a significant difference in several testicular macroscopic aspects between the two groups, similar to values using eight months old field-bred animals, with a difference of 8.78 cm between groups, also with the use of three doses of Bopriva. The only macroscopic variable that showed just a tendency of difference between the groups was testicular weight, whereas, in a study with crossbred animals with nine months old, there was a difference of 152 g in testicular weight between groups. Histologically, in immunocastrated two-year-old Nelore cattle, 85% demonstrated a total absence of spermatogenesis and 15% had a partial reduction, suggesting functional recovery of Sertoli cells after the last vaccination booster or partial inhibition of spermatogenesis. In this study, 90-day dose intervals produced effective immunization during 105 days, which is the suggested period for the third dose. The anatomopathological analysis proved to be effective for the comparison between the groups and the degree of the promoted degeneration.

Keywords: precocity, testicular degeneration, castration, beef cattle, Bopriva.

Descritores: precocidade, degeneração testicular, castração, bovino de corte, Bopriva.

DOI: 10.22456/1679-9216.97771

Received: 5 June 2019

Accepted: 6 October 2019

Published: 10 November 2019

¹Grupo de Patologia Veterinária (GPV), Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brazil. ²Grupo de Melhoramento Genético (GMG), Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), UDESC, Chapecó, SC. CORRESPONDENCE: D.C. Cucco [diego.cucco@udesc.br]. Rua Beloni Trombeta Zanin n.680E. CEP 89815-630 Chapecó, SC, Brazil.

INTRODUÇÃO

Uma das práticas de manejo mais comumente realizadas na bovinocultura de corte é a técnica de castração dos machos [7]. Indicada para facilitar o manejo e tornar os animais mais dóceis pós-puberdade [6]. Gera ainda maior ganho econômico, através da melhoria da qualidade da carne [10] e da composição da carcaça, com adequado acabamento de gordura [4]. A castração cirúrgica é considerada a mais usual entre os produtores, no entanto, trata-se de um procedimento estressante aos animais, muitas vezes exercida sem o uso de anestésicos e em condições de higiene inadequadas [3]. A imunocastração é menos invasiva e indolor, assim reduz o estresse causado aos animais. Atua através da estimulação do sistema imunológico a produzir autoanticorpos específicos contra o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), deste modo resulta no bloqueio temporário da produção de hormônios sexuais pelas gônadas do macho [12].

A imunidade contra o GnRH se desenvolve em 7 a 15 dias posteriores à aplicação do reforço vacinal, que é realizado após 30 a 90 dias da primeira dose e permanece em atuação por 3 a 5 meses, não havendo período de carência para o abate e consumo da carne [5]. A avaliação histopatológica das gônadas do macho é essencial para correlacionar os diferentes graus de degeneração testicular promovidos pelas doses e intervalos de aplicações utilizados para imunocastração. Frente a escassez de relatos sobre o seu uso em bovinos taurinos superprecoces, esse trabalho tem por objetivo descrever a avaliação anatomopatológica do testículo de animais imunocastrados em comparação a animais não castrados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais, instalações, grupos de tratamento, manejo sanitário e alimentar

O estudo foi conduzido com bovinos machos taurinos obtidos de cruzamento Angus-Limousin criados em sistema de confinamento desde a desmama (7 ± 1 meses) até o abate (15 ± 1 meses). Dois grupos foram instituídos, compostos por nove animais não castrados (NC) e por nove animais imunocastrados (IC) com vacina inibidora da síntese do GnRH (Bopriva®). Cada grupo permaneceu confinado em duas baias coletivas cobertas medindo 32m^2 cada. O manejo sanitário

e alimentar foi o mesmo para ambos os grupos de tratamento, caracterizado por dieta de silagem de milho e concentrado comercial composto por 19% de proteína bruta e 2,5% de extrato etéreo, na proporção volumoso-concentrado de 70:30.

Métodos de castração e variáveis macroscópicas

No grupo IC, o procedimento estabelecido foi composto pela administração subcutânea em região de tábua de pescoço da vacina Bopriva®¹ no volume de 1 mL, com primeira dose realizada no dia 0 (desmama), a segunda dose no dia 87 e a terceira no dia 223. Antes da remoção dos testículos no abate, realizado com 15 ± 1 meses de idade para ambos os grupos, foi mensurado o perímetro escrotal de cada animal, e após a retirada, os testículos foram avaliados macroscopicamente quanto a seu peso (kg), largura (cm), comprimento (cm) e tamanho total (largura x comprimento).

Gradação histológica da degeneração testicular

Em seguida, todas as amostras foram acondicionadas em formalina tamponada a 10%, processadas histologicamente, incluídas em blocos de parafina e coradas em hematoxilina e eosina para avaliação histológica. Durante avaliação em microscopia óptica, foram estabelecidos quatro graus de degeneração testicular, distribuídos em grau 0, composto por normalidade de túbulos seminíferos, com produção de espermatozoides; grau 1 (leve), onde a maioria dos túbulos seminíferos encontra-se normal, com discreta redução de tamanho e tortuosidade da membrana basal, atrofia discreta de células de Sertoli e redução da espermatogênese; grau 2 (moderado), com cerca de 50% dos túbulos seminíferos com produção reduzida de espermatozoides, com moderada redução em seu tamanho e tortuosidade da membrana basal e moderada atrofia de células de Sertoli, e grau 3 (severo), com diminuição dos túbulos seminíferos, associados ao seu espessamento e tortuosidade da membrana basal, além de acentuada atrofia de células de Leydig e de Sertoli, com ausência total de espermatogênese.

Análise estatística

A análise estatística foi executada para comparação entre as médias das variáveis macroscópicas dos dois grupos através do teste *t* de Student sendo considerada diferença estatística quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Em relação às variáveis macroscópicas, os animais IC possuíam testículos menores (Figura 1) e houve diferença significativa entre os dois grupos para largura ($P = 0,001$), comprimento ($P = 0,004$), tamanho total ($P = 0,003$) e perímetro escrotal ($P = 0,04$), quanto a variável de peso houve tendência de serem mais leves no grupo IC ($P = 0,06$). As médias obtidas para cada

variável de ambos os grupos se encontram na Tabela 1. Os animais IC começaram a demonstrar diminuição no perímetro escrotal em relação aos NC a partir do dia 132, permanecendo assim em todas as medidas até o final do experimento, contudo houve certo crescimento no perímetro dos IC a partir do dia 194. As medições resultaram numa diferença final de aproximadamente 6,3cm entre o perímetro escrotal dos dois grupos.

Figura 1. Comparação macroscópica entre o tamanho de testículos de bovinos superprecoces imunocastrados (seta) e não castrados (asterisco).

Tabela 1. Médias de variáveis macroscópicas correspondentes a peso, largura, comprimento, tamanho total e perímetro escrotal em bovinos superprecoces submetidos à imunocastração e não castrados.

Variável	Imunocastrados	Não Castrados	P - value
Peso (Kg)	0,431 ± 0,202 ^a	0,597 ± 0,152 ^a	0,06
Largura (cm)	4,646 ± 1,078 ^a	6,403 ± 0,851 ^b	0,001
Comprimento (cm)	8,668 ± 1,581 ^a	12,225 ± 2,691 ^b	0,004
Tamanho Total (LxC)	41,615 ± 14,881 ^a	79,929 ± 27,507 ^b	0,003
Perímetro Escrotal (cm)	27,444 ± 4,639 ^a	33,777 ± 2,981 ^b	0,04

*LxC: largura vezes comprimento. ^{a,b}letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

Quanto a avaliação microscópica, os animais NC obtiveram grau 0 de degeneração testicular, caracterizados por normalidade dos túbulos seminíferos, com produção de espermatozoides (Figura 2A). Nos animais IC, houve um percentual de 33,33% (3/9) com grau 1 de degeneração, em que se visualizou discreta tortuosidade de membrana basal e atrofia de células de Sertoli, com redução da espermatogênese e formação de células multinucleadas no lúmen (Figura 2B). Grau 2 de degeneração foi observado em 33,33% (3/9), com moderada tortuosidade e espessamento de túbulos seminíferos, atrofia de células de Sertoli

e de Leydig, e ausência de espermatogênese (Figura 2C); e 33,33% (3/9) atingiram grau 3 de degeneração, com diminuição dos túbulos seminíferos, associado a espessamento e tortuosidade da membrana basal, com atrofia de células de Leydig e Sertoli difusa severa, ausência completa de espermatogênese e células multinucleadas no interior de alguns túbulos (Figura 2D). Houve acentuada diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos nos animais IC, com proporção de 1:5 por campo de maior aumento (40x) entre animais NC e IC com grau 3 de degeneração testicular, respectivamente (Figura 3A-B).

Figura 2. Avaliação microscópica de testículos de bovinos superprecoces imunocastrados (IC) e não castrados (NC). A- Animal NC com Grau 0 de degeneração testicular [HE; 10x]. B- Animal IC com Grau 1 de degeneração testicular [HE; 10x]. C- Animal IC com Grau 2 de degeneração testicular [HE; 10x]. D- Animal IC com Grau 3 de degeneração testicular e atrofia acentuada de túbulos seminíferos [HE; 10x].

Figura 3. Avaliação microscópica de testículos de bovinos superprecoces imunocastrados (IC) e não castrados (NC). A- Animal NC com túbulo seminífero sem alterações [HE; 40x]. B- Animal IC com grau 3 de degeneração testicular, demonstrando acentuada atrofia de túbulos seminíferos com proporção de 1:5 entre NC e IC [HE; 40x].

DISCUSSÃO

Houve diferença significativa em diversos aspectos macroscópicos testiculares entre os dois grupos, com diferença de aproximadamente 6,3 cm entre o perímetro escrotal médio de bovinos NC e o de IC, semelhante a valores consultados na literatura utilizando animais obtidos através de cruzamento (50% Aberdeen Angus e 50% Nelore) com oito meses de idade e criados à campo, em que o perímetro escrotal de animais pertencentes ao grupo de não castrados e de imunocastrados apresentou diferença de 8,78 cm também com a utilização de três doses de Bopriva®, com médias de 34,6

cm e 25,8 cm, respectivamente, o que demonstra menor desenvolvimento testicular no segundo grupo [11].

Em animais zebuínos de dois anos de idade criados à campo na região do Mato Grosso do Sul, também houve diminuição no perímetro escrotal de animais imunocastrados, estes com 22 cm, enquanto animais não castrados 35,6 cm [14]. Ao abate, os testículos dos animais imunocastrados do presente experimento apresentaram também menor comprimento e largura em comparação aos animais não castrados e, consequentemente, menor tamanho total, representados por largura versus comprimento. A única variável

macroscópica que apresentou apenas uma tendência de diferença entre os grupos foi o peso testicular, em contrapartida, em um estudo com animais mestiços a partir de nove meses de idade, os autores observaram uma diferença próxima a 152 g no peso testicular entre animais inteiros, com média de 324,0 g, e imunocastrados, com 171,4 g [8].

As diferenças obtidas entre os dois grupos estão relacionadas com a degeneração testicular observada pela análise histológica do parênquima testicular após o abate, em que um terço das amostras apresentaram discreta degeneração e redução da espermatogênese, um terço degeneração e diminuição moderada na espermatogênese e um terço ausência de produção de espermatozoides e atrofia difusa acentuada das células de Leydig e Sertoli, juntamente com degeneração testicular. Para animais não castrados, todos apresentaram produção normal de espermatozoides.

Em trabalhos que utilizaram três doses da vacina anti-hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) em bovinos Nelore de dois anos de idade, a degeneração testicular associada a descamação do epitélio seminífero também foi visualizada histologicamente nos animais imunocastrados, com proporção de 85% com ausência de espermatogênese e 15% com redução parcial, podendo ser explicada como consequência de uma provável retomada funcional das células de Sertoli após a aplicação do último reforço vacinal ou por inibição parcial da espermatogênese [14]. Em bovinos com 6 a 8 meses de idade, a diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos também foi significativa nos animais imunocastrados em relação aos animais controle [13], semelhante à redução visualizada no presente estudo.

Quanto a aplicação da vacina e seus reforços, conforme recomendação do fabricante, a imunização efetiva dos animais se estende por 150 dias após a aplicação da segunda dose, quando realizado com intervalo de 90 dias entre uma dose e outra. Estudos anteriores com bovinos da raça Holandês de 13 meses de idade relatam supressão efetiva do desenvolvimento testicular com duração de 84 dias após a segunda dose com intervalo de 28 entre as duas doses, quando os níveis de testosterona aumentaram e, consequentemente, o tamanho testicular [9]. Já em animais obtidos de cruzamento Angus-Nelore com 18 meses de idade, sugeriu-se a aplicação de uma terceira dose após 112 dias da aplicação da segunda, com intervalo de 86 dias entre a primeira e segunda dose [11].

No presente estudo, a supressão inicial do crescimento testicular a partir do dia 132, entre a primeira e segunda doses, pode estar relacionada com a redução das concentrações séricas de testosterona do grupo imunocastrado, resultante da indução da formação de anticorpos naturais direcionados contra o receptor de GnRH, neutralizando e inibindo temporariamente a liberação do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), e consequentemente suprimindo a função testicular [5]. Enquanto a retomada do crescimento nos imunocastrados sugere a restauração da função testicular com retomada na produção de espermatozoides entre a segunda e a terceira dose, cerca de 42 dias antes do previsto.

Em contrapartida, bovinos Nelore criados em pastagem e vacinados com duas doses em um intervalo de 91 dias, obtiveram efeito vacinal com maior tempo de duração, atingindo aproximadamente 180 dias em 65% dos animais estudados, avaliados através da concentração de testosterona inferior a 5 ng/mL [2]. Em *Bos indicus* vacinados com um intervalo mais curto, de 49 dias, houve supressão dos níveis de testosterona durante 105 dias [1]. Com base nestes resultados, se sugere a aplicação da terceira dose dentro de aproximadamente 105 dias após a segunda dose em bovinos taurinos superprecoces em sistema de confinamento com intervalo de 90 dias entre as doses, para que se evite o retorno da função testicular.

CONCLUSÃO

A imunocastração de bovinos taurinos superprecoces criados em confinamento, com aplicação de Bopriva® no intervalo de doses de 90 dias entre a primeira e a segunda aplicação possui imunização efetiva por um período aproximado de 105 dias, período sugerido como aplicação da terceira dose. A supressão na função testicular foi comprovada através da análise anatomopatológica, que se mostrou eficaz para a comparação entre os grupos de animais imunocastrados e não castrados. A histologia permitiu graduar os níveis de degeneração testicular promovidos pela vacinação com Bopriva®, associando com as variáveis macroscópicas que se demonstraram inferiores nos bovinos imunocastrados em relação aos não castrados.

MANUFACTURER

¹Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

Ethical approval. The experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Research (CETEA) of the Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), under protocol number 1.31.15.

Acknowledgments. À Fazenda Búffalo de Alim Pedro Rizzi por permitir a realização deste experimento.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Amatayakul-Chantler S., Jackson J.A., Stegner J., King V., Rubio L.M.S., Howard R., Lopez E. & Walker J. 2012. Immunocastration of *Bos indicus* x Brown Swiss bulls in feedlot with gonadotropin-releasing hormone vaccine Bopriva provides improved performance and meat quality. *Journal of Animal Science*. 90: 3718-3728.
- 2 Amatayakul-Chantler S., Hoe F., Jackson J.A., Roca R.O., Stegner J.E., King V., Howard R., Lopez E. & Walker J. 2013. Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine Bopriva or surgical castration of *Bos indicus* bulls raised on pasture in Brazil. *Meat Science*. 95: 78-84.
- 3 American Veterinary Medical Association (AVMA). 2014. Literature Review on the Welfare Implications of Castration of Cattle, 10p. Disponível em: <<https://www.avma.org/KB/Resources/LiteratureReviews/Documents/castration-cattle-bgnd.pdf>>. [Accessed online in April 2019].
- 4 Berg R.T. & Butterfield R.M. 1976. *New Concepts of Cattle Growth*. New York: Sydney University, 240p.
- 5 Bopriva. 2017. Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda. Bula, 2p. Disponível em: <<http://www.bopriva.com.br/>>. [Accessed online in March 2019].
- 6 Bretschneider G. 2005. Effects of age and method of castration on performance and stress response of beef male cattle: A review. *Livestock Production Science*. 97: 89-100.
- 7 Coetzee J.F. 2011. A review of pain assessment techniques and pharmacological approaches to pain relief after bovine castration: Practical implications for cattle production within the United States. *Applied Animal Behaviour Science*. 135: 192-213.
- 8 Cook R.B., Popp J.D., Kastelic J.P., Robbins S. & Harland R. 2000. The effects of active immunization against GnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. *Journal of Animal Science*. 78: 2778-2783.
- 9 Janett F., Gerig T., Tschuor A.C., Amatayakul-Chantler S., Walker J., Howard R., Bollwein H. & Thun R. 2012. Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRH) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. *Theriogenology*. 78: 182-188.
- 10 Mach N., Bach A., Realini C.E., Font i Furnols M., Velarde A. & Devant M. 2009. Burdizzo pre-pubertal castration effects on performance, behaviour, carcass characteristics, and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. *Meat Science*. 81: 329-334.
- 11 Moreira A.D., Siqueira G.R., Lage J.F., Benatti J.M.B., Moretti M.H., Miguel G.Z., Oliveira I.M. & Resende F.D. 2017. Castration methods in crossbred cattle raised on tropical pasture. *Animal Production Science*. 58(7): 1307-1315.
- 12 Robertson I.S., Wilson J.C. & Fraser H.M. 1979. Immunological castration in male cattle. *Veterinary Record*. 105(24): 556-557.
- 13 Theubet G., Thun R., Hilbe M. & Janett F. 2010. Wirkung einer Impfung gegen GnRH (Bopriva®) beim männlichen pubertären Kalb. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 152(10): 459-469.
- 14 Zanella R., Zanella E.L., Reeves J.J., Hernandez J., Motta A.C. & Avila D. 2009. Características testiculares de touros imunizados com vacina anti-hormônio liberador do hormônio luteinizante. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 44: 1359-1363.