

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE SOLUÇÃO
HIPERTÔNICA DE CLORETO DE SÓDIO COMO
MÉTODO DE CASTRAÇÃO QUÍMICA EM BOVINOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Olmiro Adair Silveira de Andrade Neto

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE SOLUÇÃO
HIPERTÔNICA DE CLORETO DE SÓDIO COMO MÉTODO
DE CASTRAÇÃO QUÍMICA EM BOVINOS.**

Olmiro Adair Silveira de Andrade Neto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Alfredo Quites Antoniazzi

**Santa Maria, RS, Brasil.
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE SOLUÇÃO HIPERTÔNICA DE
CLORETO DE SÓDIO COMO MÉTODO DE CASTRAÇÃO QUÍMICA
EM BOVINOS.**

elaborada por
Olmiro Adair Silveira de Andrade Neto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Alfredo Quites Antoniazzi
(Presidente/Orientador)

Rogério Ferreira (UDESC)

Janduí Escarião da Nóbrega Júnior (UFSM)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família pelo apoio constante e incondicional.

Aos meus orientadores, João Francisco Coelho de Oliveira (*in memoriam*), Paulo Bayard Dias Gonçalves e Alfredo Qites Antoniazzi, pelo acolhimento na família BioRep, pelos ensinamentos didáticos e pelo apoio no direcionamento dos experimentos.

Aos colegas do laboratório de biotecnologia e reprodução animal, em especial aos amigos de todas as horas Monique, Guto, Janduí. Também ao amigo velho Rodrigo Camponogara e ao professor Bernardo Gasperin.

Ao professor Flávio Desessards De La Côte pelo empréstimo do termógrafo.

À minha namorada Alice De David por sempre me apoiar em todos os momentos.

À CAPES, FAPERGS e ao CNPq pelo apoio para realização dos experimentos.

À Estância Boa Vista da Quinta LTDA pela disponibilidade dos animais para o meu experimento.

Muito Obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE SOLUÇÃO HIPERTÔNICA DE CLORETO DE SÓDIO COMO MÉTODO DE CASTRAÇÃO QUÍMICA EM BOVINOS.

AUTOR: OLMIRO ADAIR SILVEIRA DE ANDRADE NETO
ORIENTADOR: ALFREDO QUITES ANTONIAZZI
Data e Local da Defesa: Santa Maria 27 de FEVEREIRO de 2014.

A pecuária brasileira, assim como todas as demais atividades econômicas, busca o aumento da lucratividade. A redução das perdas de animais é uma das maneiras de se obter maior eficiência produtiva. Nesse contexto, a castração de machos bovinos faz-se necessária para a comercialização, visando facilitar manejo e evitar a reprodução, porém alguns métodos de castração praticados levam a inúmeras perdas devido a infecções e miíases. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a viabilidade de uma alternativa à tradicional castração cirúrgica realizada em condições de campo, desenvolvendo uma solução de fácil aplicação e minimamente invasiva. Para isso, testou-se o efeito da injeção intratesticular de uma solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl; 20%) com o intuito de acarretar uma completa esterilização dos machos bovinos nas primeiras semanas de vida, pela desnaturação das células intratesticulares, minimizando as perdas com infecções e mortes. Foram utilizados 40 bezerros divididos nos seguintes grupos experimentais: CN (controle negativo) - castrados logo após o nascimento; CP (controle positivo) - não castrados; G1 - injeção intratesticular (IIT) entre 1 até 5 dias após nascimento; G2 - IIT entre 15 e 20 dias após nascimento e G3 - IIT entre 25 e 30 dias após nascimento;. Os resultados demonstraram que a IIT resultou em necrose coagulativa das células de Leydig e dos túbulos seminíferos. O bloqueio completo da produção de testosterona e do desenvolvimento testicular foi observado nos grupos G1 e G2 ($P < 0,05$). A temperatura retal e da região escrotal não foram influenciadas pelos diferentes procedimentos em relação aos grupos controles ($P > 0,05$). Resultados preliminares sugerem que a prática de IIT causa menos desconforto aos animais quando comparada à orquiectomia nas primeiras semanas de vida. Conclui-se que a IIT de solução hipertônica de NaCl causa esterilidade e completa supressão da síntese de testosterona quando realizada até 20 dias após o nascimento. Como principais vantagens do procedimento em relação aos estudos anteriores podemos citar o fato do NaCl ser atóxico, de baixo custo, tornando essa abordagem uma alternativa viável e segura para utilização em condições de campo, evitando a exposição da região escrotal e abdominal dos neonatos às contaminações ambientais e ectoparasitas.

Palavras-chave: Castração química; injeção intratesticular; bezerros; esterilidade; dosagem de testosterona.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Professional Graduation Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

INTRATESTICULAR INJECTION OF SODIUM CHLORIDE HYPERTONIC SOLUTION AS A METHOD OF CHEMICAL CASTRATION IN BOVINE

AUTHOR: OLMIRO ADAIR SILVEIRA DE ANDRADE NETO

ADVISOR: ALFREDO QUITES ANTONIAZZI

Defense Place and Date: Santa Maria, February 27th, 2013

The main objective of Brazilian cattle industry and other economic activities is to increase profitability. Reducing animal losses is important to maximize productive efficiency. In this way, castration of male calves is necessary for trading, to facilitate handling and prevent reproduction. Some methods of castration are traumatic and cause economic losses due to infection and myiasis. The objective of the present study was to evaluate the viability of an alternative method to traditional surgical castration performed under field conditions, developing a solution easy to administrate and minimally invasive. It was evaluated the effects of intratesticular injection of hypertonic sodium chloride solution (NaCl; 20%), aiming to complete castrate male calves during the first weeks of life through denaturation of testicular cells, minimizing losses caused by infections and deaths. Forty male calves were allocated into one of the experimental groups: NC (negative control) - surgically castrated immediately after birth; PC (positive control) - intact males; G1 - intratesticular injection (ITI) from 1 to 5 days after birth; G2 - ITI from 15 to 20 days after birth and G3 - ITI from 25 to 30 days after birth;. Intratesticular injection induced coagulative necrosis of Leydig cells and seminiferous tubules. Testosterone secretion and testicular development were severely impaired in animals from G1 and G2 groups ($P < 0.05$). Rectal and scrotal temperatures were not affected by the different procedures ($P > 0.05$) when compared to control group. Preliminary results suggest that intratesticular injection causes less discomfort to animals when compared to orchiectomy during the first weeks of life. It is concluded that intratesticular injection of NaCl hypertonic solution induces sterility and completely suppresses testosterone secretion when performed before 20 days old. The main advantages in comparison to previous studies are the fact that NaCl is atoxic, has a low cost, the technique is a safe and viable alternative to use under field conditions, avoiding the exposure of scrotal and abdominal cavities to environmental contaminants and ectoparasites.

Key words: chemical castration, intratesticular injection, calves, sterility, testosterone dosage.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO - 1

Figure 1 - H&E-stained histological section of testis from control and treatment groups. Intact seminiferous tubule (A) and normal testicular parenchyma (B) from animals submitted to surgical orchietomy. Coagulative necrosis of Leydig cells and seminiferous tubule (C) and severe disorganization of parenchyma cells (D) from animals submitted to 20% NaCl intratesticular injection.....29

Figure 2 – Testosterone levels in 12-month-old control and treated animals (n=5/group). Blood samples were collected 0 and 3 hours after im administration of GnRH analog in surgically castrated (NC) and intact animals (PC) and animals submitted to 20% NaCl intratesticular injection from 1 to 5 (G1), 15 to 20 (G2) and 25 to 30 (G3) days old.....30

Figure 3 - Testicular and rectal temperature from control and treatment groups (n=3/group). Temperature was measured in surgically castrated (NC) and intact animals (PC) and animals submitted to 20% NaCl intratesticular injection from 1 to 5 (G1) days old31

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Imagem histológica em aumento de 200x dos animais castrados aos 60 dias. (A) Animal controle positivo mostrando a organização do tecido testicular. (B,C e D) Animal do G1, G2 e G3 respectivamente, evidenciando a necrose coagulativa das células de Leydig e dos túbulos seminíferos.....37

Anexo B - Imagens termográficas da região escrotal de bezerros submetidos à castração cirúrgica (controle negativo), não-castrados (controle positivo) e grupo que recebeu injeção intratesticular de solução hipertônica de cloreto de sódio com até 5 dias de vida (grupo 1). As imagens foram capturadas com um termógrafo FLIR ThermaCAM™ E25.....38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Trato Reprodutivo Masculino	12
2.2 Espermatogênese	13
2.3 Métodos de castração.....	14
3. CAPÍTULO 1- INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE SOLUÇÃO HIPERTÔNICA DE CLORETO DE SÓDIO COMO MÉTODO DE CASTRAÇÃO QUÍMICA EM BOVINOS.	
.....	16
Abstract.....	17
Introduction.....	18
Material and methods.....	19
Results and discussion	21
Conclusion	24
Acknowledgments.....	24
References	25
4. CONCLUSÃO	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS.....	36

1. INTRODUÇÃO

A redução de custos de produção e o aumento de produtividade constituem hoje a proposta de gestão da maioria dos produtores brasileiros. Para que o nosso país possa se estabelecer como grande exportador de carne, existe a necessidade de melhoria da qualidade sanitária, padronização dos animais e adoção de práticas de manejo que causem o menor desconforto possível para os animais, o que são exigências dos grandes mercados (OLIVEIRA & BRITO, 2005).

A castração cirúrgica ou orquiectomia é uma das alternativas comumente utilizadas para supressão da testosterona, tendo como objetivo principal evitar a reprodução de machos geneticamente inferiores e reduzir sua agressividade (RODRIGUES et al., 2003). Entretanto, este procedimento é considerado traumático e necessita de um técnico qualificado para sua realização, a fim de minimizar o sofrimento dos animais. Além disso, como se trata de um processo cirúrgico, há a necessidade de acompanhamento individual no período pós-operatório, cuja falha poderá causar perda de animais em razão de complicações como: inflamação, infecção, miíases, entre outras (OLIVEIRA & BRITO, 2005; STAFFORD & MELLOR, 2005). A castração pode ser definida como a extirpação ou supressão funcional dos órgãos genitais, podendo ser classificada em: hormonal, física ou química (STAFFORD & MELLOR, 2005). As injeções intratesticulares para promover castração química foram realizadas em diferentes espécies animais incluindo primatas (KAR et al., 1965), roedores (EMIR et al., 2011), caninos (PINEDA et al., 1977; OLIVEIRA et al., 2012), felinos (PINEDA & DOOLEY, 1984) e caprinos (JANA et al., 2005). Diversos agentes esclerosantes foram utilizados a fim de causar desorganização no parênquima testicular, levando a uma castração eficiente. Entre os produtos utilizados, podemos citar etanol (CANPOLAT et al., 2006) e gluconato de zinco associado ou não a dimetilsulfóxido (DMSO) (SOTO et al., 2007). Resultados obtidos em ratos após a utilização de solução hipertônica de cloreto de sódio mostram uma excelente aplicabilidade desta maneira de castração (EMIR et al., 2008; EMIR et al., 2011), uma vez que este composto é atóxico, comercializado sem restrições e apresenta custo reduzido. Entretanto, a viabilidade de utilização da solução hipertônica de NaCl em animais de produção ainda não foi avaliada.

Muitos métodos de castração química causam efeitos colaterais como dor e inflamação (TING et al., 2003), ou tem uso restrito em espécies de produção. Portanto, o estudo de

alternativas eficientes que promovam a esterilização causando mínimo desconforto e ausência de efeitos colaterais, é necessário. Baseando-se nos dados de literatura, elaboramos a hipótese de que a aplicação intratesticular da solução hipertônica de NaCl inviabiliza as células de Leydig e do epitélio do túbulo seminífero, suprimindo a produção de testosterona e a produção espermática, de forma minimamente invasiva. Este trabalho teve como objetivo verificar se a administração intratesticular de solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl) em machos bovinos é efetiva como método de castração não cirúrgico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Trato reprodutivo masculino

O aparelho reprodutor do touro é composto do cordão espermático, escroto, testículos, ductos excretores, glândulas acessórias e pênis. Cada uma das estruturas tem sua função, como os cordões espermáticos, que promove a ligação vascular, linfática e neural entre o restante do corpo, a termorregulação, além de abrigar os ductos deferentes e o músculo cremáster. Esta rede de vasos é chamada de plexo pampiniforme, em que a artéria testicular é envolta pelo emaranhado de veias testiculares formando uma contracorrente de troca de calor auxiliando assim na termorregulação (DESJARDINS, 1989; POLGUJ et al., 2011). O escroto também auxilia na diminuição da temperatura, que é de 2 a 6°C na região em relação ao restante do corpo (AMANN & SCHANBACHER, 1983), com o auxílio de várias glândulas sudoríparas e, uma vez que é inervado pela rede simpática, funciona como termostato aumentando a frequência respiratória com o aumento da temperatura testicular. Além disso, o escroto é uma barreira protetora dos testículos. O músculo cremáster sustenta os testículos e auxilia no controle da temperatura testicular, bem como a túnica dartos, músculo encontrado abaixo da pele do escroto, que tem a capacidade de manter os testículos perto do corpo por longo período. Todos esses mecanismos são essenciais, pois a manutenção das baixas temperaturas dos testículos é necessária para a produção dos gametas (SENGER, 2003).

A produção de espermatozoides, hormônios, e fluidos são funções testiculares. Nesses estão contidos os túbulos seminíferos, as células de Leydig, capilares, vasos linfáticos, células de Sertoli, entre outras estruturas de preenchimento (SENGER, 2003). As células de Sertoli, ou de sustentação, são essenciais para o controle das células germinativas, além de possuir função nutritiva para estas (HAFEZ, 1982; SWENSON, 1996). Estas células também são fonte de estradiol. A regulação do início da atividade nos túbulos seminíferos é realizada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) agindo nas células de Sertoli (HAFEZ, 1982).

As células de Leydig estão dispostas no interstício, ou seja, entre os túbulos seminíferos e são a principal fonte testicular de esteroides, incluindo testosterona e progesterona (HAFEZ, 1982), as quais são controladas pelo hormônio luteinizante (LH) (SWENSON, 1996). Os ductos excretores são compostos pelo ducto eferente, epidídimo e ducto deferente (SENGER, 2003) e possuem a função principal de transporte seminal e, em

certas porções, maturação e armazenamento espermático. As glândulas acessórias contidas no touro são a próstata, glândulas bulbouretrais, que tem a função de lubrificação e neutralização do canal espermático, glândulas vesiculares, que são responsáveis pela produção de parte do líquido seminal, além das ampolas dos ductos deferentes (REICHENBACH, 2008; SENGER, 2003). Por fim, temos o pênis, que é o órgão responsável pela deposição do sêmen, ou seja, o órgão copulador (SENGER, 2003).

2.2. Espermatogênese

A espermatogênese é o processo no qual há formação do espermatozoide a partir da espermatogônia, através de divisões mitóticas e meióticas. Este processo inicia-se nas espermatogônias que revestem a parede tubular e terminam no momento que os espermatozoides são liberados no lúmen do túbulo seminífero (SWENSON, 1996).

Esse processo cíclico pode ser dividido em três fases, sendo a primeira pré-púbere (espermatogoniogênese), no qual as células germinativas primordiais multiplicam-se, através de divisões mitóticas, e diferenciam-se em espermatogônias. Após isto, entramos na fase pós-púbere (espermatocitogênese), chamada de fase de crescimento e maturação celular, no qual as espermatogônias B, sofrem meiose, formando os espermatócitos primários e espermatócitos secundários. Por fim chegamos à última fase pós-púbere da espermatogênese (espermioogênese), também conhecida como fase de diferenciação celular, onde as espermátides arredondadas se diferenciam em espermatozoides (REICHENBACH, 2008; RUSSELL & DE FRANÇA, 1995). O processo de multiplicação, meiose e diferenciação das células germinativas em estádios mais avançados de desenvolvimento está sincronizado com as mudanças morfológicas e a expressão gênica nas células de Sertoli e Leydig (ANWAY et al., 2003). As gonadotrofinas (LH e FSH) controlam a proliferação e a diferenciação das células de Sertoli e Leydig desde o nascimento, de maneira que os esteróides e fatores de crescimento secretados por estas células têm ação direta ou indireta sobre o desenvolvimento das células germinativas (WALKER, 2003). Na espécie bovina, a habilidade das células de Leydig em responder ao estímulo do LH (BOOCKFOR et al., 1983), leva a produção de crescentes quantidades de testosterona, que, por sua vez, controla a diferenciação das células de Sertoli. Estes eventos regulam a espermatogênese de forma associada, de modo que alterações na função das células de Sertoli alteram o crescimento das células germinativas (SHARPE et al., 2003). O número de células de Sertoli está altamente relacionado com a produção espermática, sendo que touros com maior massa testicular produzem mais

espermatozoides que aqueles com menor peso (BERNDTSON et al., 1987). As interrupções no processo espermatogênico também interferem nas células de Sertoli (MOURA & ERICKSON, 2001) causando modificações no padrão normal de desenvolvimento e na capacidade reprodutiva dos animais.

2.3.Métodos de castração

A castração cirúrgica ou orquiectomia é uma das alternativas comumente utilizadas para supressão da testosterona tendo como objetivo principal evitar a reprodução de machos geneticamente inferiores e reduzir sua agressividade (RODRIGUES et al., 2003). Entretanto, este procedimento é considerado traumático e necessita de um técnico qualificado para sua realização, a fim de minimizar o sofrimento dos animais. Além disso, como se trata de um processo cirúrgico, há a necessidade de acompanhamento individual no período pós-operatório, cuja falha poderá causar perda de animais em razão de complicações como: inflamação, infecção, miíases, entre outras (OLIVEIRA & BRITO, 2005).

Pesquisa recente mostrou que a maioria dos produtores americanos realiza a castração em animais de até 90 kg, sendo também mais comum o método cirúrgico. Entretanto, relatou-se que o uso de analgésicos não é uma constante durante esse procedimento (COETZEE et al., 2010). Comparando-se os métodos físicos de castração, pode-se observar que todos causam algum tipo de estresse e dor, mesmo com anestesia (STAFFORD et al., 2002; COETZEE, 2013). Relatou-se que quanto mais jovem é o animal à castração, menor é o estresse sofrido, independentemente do método utilizado. Adicionalmente, a perda de peso relacionada ao procedimento é correlacionada com o aumento da idade (BRETSCHEIDER, 2005).

A castração pode ser definida como a extirpação ou supressão funcional dos órgãos genitais, podendo ser classificada em: hormonal, física ou química (STAFFORD & MELLOR, 2005). Em busca de formas menos traumáticas, alguns métodos de esterilização química foram testados. Diversos agentes esclerosantes foram utilizados em injeções intratesticulares a fim de causar desorganização no parênquima testicular, levando a uma castração eficiente. Os produtos testados foram o etanol (CANPOLAT et al., 2006) e gluconato de zinco (SOTO et al., 2007). O cloreto de cálcio (JANA et al., 2005) também tem sido utilizado com resultados satisfatórios. Porém, esses agentes causam dor e pirexia, ou até mesmo uma inflamação grave (orquite) após a injeção intratesticular (TING et al., 2003).

As injeções intratesticulares foram realizadas em diferentes espécies, tais como os primatas (KAR et al., 1965), roedores (EMIR et al., 2011), cães (PINEDA et al., 1977;

OLIVEIRA et al., 2012), felinos (PINEDA & DOOLEY, 1984), caprinos (JANA et al., 2005) e humanos (WONG, 2001) com a finalidade de promover esterilização química. Técnicas de imunização induzindo anticorpos contra gonadotrofinas são utilizadas a fim de afetar a espermatogênese (AFONSO et al., 2005). As imunizações contra o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) mostram grande potencial de suprimir a capacidade reprodutiva de animais de maneira eficaz (ULKER et al., 2009). Em diversas espécies a utilização de GnRH aliada à albumina sérica bovina (BSA), causa atrofia e inativação das funções gonadais (HABENICHT et al., 1990), porém o custo destes tratamentos são elevados. Resultados obtidos em ratos após a utilização de solução hipertônica de cloreto de sódio mostram uma excelente aplicabilidade desta maneira de castração. Os animais tratados com cloreto de sódio demonstraram queda nas concentrações de testosterona em comparação ao controle e cortes histológicos mostraram marcada desorganização do parênquima testicular dos animais utilizados na experimentação (EMIR et al., 2008; EMIR et al., 2011). Em cães, a utilização de gluconato de zinco em injeções intratesticulares demonstrou resultados satisfatórios, reduzindo a capacidade fecundante dos espermatozoides ejaculados, aliada à queda nas dosagens de testosterona, levando a uma completa azoospermia (OLIVEIRA et al., 2012).

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**INTRATESTICULAR INJECTION OF SODIUM CHLORIDE
HYPERTONIC SOLUTION AS A METHOD OF CHEMICAL
CASTRATION IN CATTLE.**

**Olmiro A. S. Andrade Neto, Monique T. Rovani, Gustavo F. Ilha, Bernardo
G. Gasperin, Janduí E. da Nóbrega Júnior, Rafael G. Mondadori, Paulo B.
D. Gonçalves, Alfredo Q. Antoniazzi**

THERIOGENOLOGY, 2014

Intratesticular injection of sodium chloride hypertonic solution as a method of chemical castration in cattle

Olmiro A. Neto^a, Monique T. Rovani^a, Gustavo F. Ilha^a, Bernardo G. Gasperin^b, Janduí E. da Nóbrega Júnior^a, Rafael G. Mondadori^b, Paulo B. D. Gonçalves^a, Alfredo Q. Antoniazzi^{a*}

^aDepartment of Large Animal Clinics, Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartment of Animal Pathology, Laboratory of Animal Reproduction - ReproPEL, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, RS, Brazil.

*Corresponding author: Email: alfredo.antoniazzi@ufsm.br. Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS Brazil, CEP 97109-900, Phone: +55 55 3220 8752, Fax: +55 55 3220 8484.

Abstract

Castration of male calves is necessary for trading, to facilitate handling and prevent reproduction. However, some methods of castration are traumatic and cause economic losses due to infection and myiasis. The objective of the present study was to evaluate the efficiency of intratesticular injection (ITI) of hypertonic sodium chloride solution (NaCl; 20%) to promote male calves castration during the first weeks of life. Forty male calves were allocated into one of the following experimental groups: NC (negative control) - surgically castrated immediately after birth; PC (positive control) - intact males; G1 - ITI from 1 to 5 days old; G2 - ITI from 15 to 20 days old and G3 - ITI from 25 to 30 days old. Intratesticular injection induced coagulative necrosis of Leydig cells and seminiferous tubules leading to extensive fibrosis. Testosterone secretion and testicular development were severely impaired in 12 months old animals from G1 and G2 groups ($P < 0.05$), in which no testicular structure and sperm cells were observed during breeding soundness evaluation. Rectal and scrotal

temperatures were not affected by the different procedures ($P>0.05$). In conclusion, intratesticular injection of NaCl hypertonic solution induces sterility and completely suppresses testosterone secretion when performed during the first 20 days of life.

Keywords: Chemical Castration, intratesticular injection, calves, infertility, testosterone secretion.

1. Introduction

Decreasing production costs and increasing productivity are the main goals of cattle farmers. There is also an increasing concern regarding animal welfare and organic beef production, which is accomplished by reducing vaccinations, antibiotics and antihelmintics administrations. The orchietomy is the most common way of suppressing testosterone production aiming to avoid reproduction of genetically inferior animals and reducing their aggressiveness [1]. However, orchietomy is a traumatic procedure and requires a qualified technician to be performed safely and to decrease animals suffering. Furthermore, as in all other surgical procedures, it is necessary to follow the animals individually during postoperative period to avoid common complications such as inflammation, infection and myiasis, which can predispose to arthritis and septicemic death [1]. To avoid the aforementioned complications, most producers use anti-parasite drugs prophylactically, which can lead to parasite resistance against available drugs.

Castration can be defined as extirpation or suppression of gonadal function and can be classified as: hormonal, physical or chemical. Intratesticular injections to promote chemical castration were performed in different species including primates [2], rodents [3], canine [4-5], feline [6] and caprine [7]. Several sclerosing agents have been used to cause testicular parenchyma disorganization such as ethanol [8] and zinc gluconate associated or not to dimethyl sulphoxide (DMSO) [9]. Results obtained after hypertonic sodium chloride intratesticular injection in rats demonstrated a great potential application of this technique [3,

10], since sodium chloride is atoxic, being marketed without restrictions with a low price. However, the viability of using sodium chloride to promote chemical castration in livestock animals has not been evaluated.

Several chemical castration methods cause side effects like pain and inflammation [11] or have restrict use in livestock species. Furthermore, the efficacy of chemical castration is strongly influenced by the age of the animals. Thus, it is necessary to further investigate efficient alternatives to promote sterilization with minimal discomfort and absence of side effects and determine the optimal age of castration [12]. Based on previous studies, we hypothesized that the intratesticular administration of sodium chloride impairs Leydig and seminiferous duct cells function, suppressing testosterone and sperm production in a minimally invasive manner. The objectives of the present study were: 1) to evaluate the effect of intratesticular injection of hypertonic saline on testicular structure and steroidogenesis; 2) to determine the best moment to perform the procedure in calves during the first weeks of life and 3) to investigate the effect of the treatment on animals fertility after puberty.

2. Materials and methods

2.1 Hypertonic NaCl solution

The hypertonic solution was prepared dissolving NaCl (200mg/mL) in ultrapure water. After dilution, the 20% NaCl solution was autoclaved in 50mL glass flasks and stored at 5°C until use.

2.2 Animals and experimental groups

All experimental procedures were reviewed and approved by the Federal University of Santa Maria Animal Care and Use Committee. Forty crossbred beef calves (30 to 35kg live weight) from a farm in southern Brazil were randomly allocated in 5 groups (n=8/group): NC (negative control) - surgically castrated immediately after birth; PC (positive control) - intact males; G1 - intratesticular injection (ITI) from 1 to 5 days old; G2 - ITI from 15 to 20 days

old and G3 - ITI from 25 to 30 days old. All the animals were identified using numbered earrings at day 0 (immediately after birth).

To perform intratesticular injection or surgical orchiectomy animals were adequately contained and the site of procedure (scrotal skin) was disinfected using iodine/ethanol solution and 2% chlorhexidine (Riohec®2%, Rioquímica, SP, Brazil). Both procedures were performed under local anesthesia (5mL 2% lidocaine; Anestex, Fagra S/A, SP, Brazil). To perform ITI, it was injected 4mL of hypertonic solution in each testicle. The incision for surgical castration was performed with a scalpel followed by testicular removal by manually twisting the testicle.

2.3 Scrotal thermography and rectal temperature

Three animals from groups, G1, NC and PC were submitted to scrotal thermography using an infrared camera (FLIR ThermoCAM™ E25) at five time-points: 0, 3, 6, 12 and 24 hours after procedure to evaluate inflammatory response following intratesticular injection or surgical orchiectomy. Simultaneously, rectal temperature was measured.

2.4 Testicular histopathology

Testicles from three animals from each group (G1, G2, G3 and PC) were collected 60 days after procedures, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Blocks were sectioned on a microtome and slides were mounted and stained with haematoxylin-eosine (H&E) and blindly evaluated by an experienced veterinary pathologist.

2.5 Serum testosterone

Five 12-month-old animals from each group (G1, G2, G3, NC and PC) received an im injection of 0.012mg GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) analog busserelin acetate (Sincroforte, Ourofino, SP, Brazil) to induce a testosterone peak. Before blood collection, it was performed tricotomy and disinfection (iodine/alcohol) around the collection site (jugular vein). Blood samples were collected using 40 x 0.8mm needle at 0 and 3 h after GnRH

injection. Samples were then centrifuged at 4.000 RPM for 20 minutes to obtain serum samples which were labeled and stored (1ml/animal) at -80°C . Serum testosterone was measured using chemiluminescent assay.

2.6 Breeding soundness evaluation

Five animals from each group (G1, G2, G3, NC and PC) aged 24-months were subjected to breeding soundness evaluation. Scrotal circumference and semen characteristics after electroejaculation were recorded.

2.7 Statistical analysis

All continuous data were tested for normal distribution and normalized when necessary. Testosterone levels in different groups and moments were submitted to ANOVA and multicomparison between groups was performed by Tukey test. The assessment of treatment effects on scrotal and rectal temperature was performed as repeated measures data and analyzed using the MIXED procedure with a repeated measure statement. Main effects of treatment group, day, and their interaction were determined. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

In the present study, it was investigated a minimally invasive technique using an intratesticular injection of non-toxic solution as an alternative to surgical orchiectomy in calves during the first weeks of life. The ITI injection of 20% NaCl was efficient in causing testicular lesion, since during histological examination it was observed total dehydration of testicular parenchymal cells and extensive testicular fibrosis (Figure 1-C and D) when compared to control animals (Figure 1-A and -B). Furthermore, it was observed that intact parenchyma (Figure 1-A and -B) was substituted by dense and loose connective tissue with vascular components (Figure 1C) associated to coagulative necrosis of Leydig cells and seminiferous tubules (Figure 1D). In rats, coagulative necrosis was also observed after 20%

NaCl intratesticular injection, which caused testicular atrophy [10]. In this way, it is concluded that hypertonic NaCl solution compromises the two major functions of testis tissue: testosterone synthesis by Leydig cells and germ cells production in seminiferous epithelium.

Other sclerosing agents are also efficient in causing parenchyma disorganization promoting sterilization such as ethanol [8], zinc gluconate [5] associated or not to DMSO (Dimethyl sulphoxide) [9]. However, some of these compounds are toxic, causing pain and pyrexia [7], or even inflammation [11] after ITI. Furthermore, few studies have investigated future reproductive function after chemical sterilization.

Aiming to confirm if the lesions observed histologically were sufficient to suppress libido, we evaluated testosterone levels after puberty. For this purpose, we used a well established model of inducing testosterone release by GnRH administration, which results in a peak of testosterone 3 hours after injection in animals with functional testicular tissue [13-14]. Calves from G1 and G2 groups, submitted to ITI with hypertonic NaCl solution, had basal levels of testosterone even after GnRH injection, being these levels not statistically different from those observed in surgically castrated calves from NC group (Figure 2). However, animals from G3, which were injected between 25 and 30 days after birth, responded to GnRH injection and a significant increase in serum testosterone was observed, reaching levels similar to basal levels in intact males. Intact animals had a testosterone peak 3 hours after GnRH administration (Figure 2), being these levels (815.5 ± 42.1 pg/dL) similar to those reported in previous studies [13]. The absence of response to GnRH in animals submitted to ITI until 20 days after birth confirms that these animals did not have responsive Leydig cells, in contrast to intact males from the same age, validating the model. A decrease on testosterone synthesis was also observed after calcium chloride ITI in dogs and bucks [7, 15].

To compare the inflammatory response induced by ITI in comparison to surgical orchiectomy, it was evaluated scrotal and rectal temperature in animals submitted to different procedures. Thermograms of the scrotum showed only a significant effect of the moment of evaluation ($P < 0.05$), but no effects of group and moment vs group interaction were observed ($P > 0.05$; Figure 3A). These results demonstrate that scrotal temperature fluctuations were due to environmental temperature and not a consequence of local inflammation. Despite scrotal temperature being about 5 degrees lower than the temperature inside testicles, there is a high correlation between them, validating the model of scrotal thermography to indirectly evaluate temperature oscillation inside testicles [16]. Rectal temperature was not affected by different treatments and varied according to time of measurement ($P < 0.05$; Figure 3B), but the averages remained within the normal range of 36.7-39.1 [17]. In contrast, Cohen et al. [18] observed an increase in rectal temperature ($40.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$) in surgically castrated calves but not in chemically castrated and intact calves, suggesting that surgical approach causes more inflammation compared to chemical approach. However, in that study the animals were between 7 and 9 months old.

When evaluating reproductive characteristics in animals after puberty (24 months old), it was observed that intact males had scrotal circumference between 28 and 31 cm, similar to those reported by Brito et al. [19] in Angus and crossbred bulls. Intact males had sperm parameters in normal range, with sperm motility from 50 to 80% and vigour from 3 and 4, and mass activity from 2 to 4 (0 to 5). All castrated animals (NC) and all animals submitted to ITI were aspermic. These results are similar to those observed after zinc gluconate ITI in dogs, in which the procedure decreased testosterone synthesis and lead to azoospermy [5]. Similarly, the solution used in the present study was efficient with only one administration.

Recently, it was reported that in United States of America most orchiectomies are performed in calves less than 90 kg, in most cases without local analgesic drug administration

at the time of castration [12]. Comparing different physical methods of castration, it was observed that all them cause stress and pain, even with anesthesia [20-21]. However, procedures performed in younger animals are associated with less discomfort and stress, independently of the method used, and body weight loss increases with the age [1].

In contrast to previous studies, we evaluated the effect of ITI at different timepoints in the first month of life. One out of five animals from G3 group had greater concentration of testosterone when analyzed at 12 months, indicating the presence of functional Leydig cells. Furthermore, the same calf had a testis-like structure with a consistency resembling a normal testis, but adhered to scrotal wall and a discontinuous epididymis with a gap between head and tail. Based on these observations and the aforementioned results, we can conclude that NaCl ITI is safer during the first 20 days of life. The procedure proposed in the present study can be an alternative to surgical orchiectomy in cattle, being less traumatic and invasive, decreasing production losses, especially the ones caused by infection, inflammation and myiasis.

4. Conclusion

Intratesticular injection of 20% NaCl hypertonic solution induces coagulative necrosis of Leydig cells and seminiferous tubules and extensive testicular fibrosis. These observed lesions compromise testicular development and testosterone synthesis leading to sterility when performed during the first 20 days of life. The NaCl ITI represents a viable alternative to surgical orchiectomy in calves.

5. Acknowledgements

This study was supported by Brazilian Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and CAPES. The authors would like to thank Estância Boa Vista da Quinta for providing the animals used in this work.

6. References

- [1] Bretschneider G. Effects of age and method of castration on performance and stress response of beef male cattle: A review. *Livestock Production Science*. 2005;97:89-100.
- [2] Kar AB, Kamboj VP, Goswami A. Sterilization of male rhesus monkeys by iron salts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1965;9:115-7.
- [3] Emir L, Sunay M, Yalbuздаğ O, Karakaya Y, Erol D. Hormonal and pathologic changes after chemoablation of testes with hypertonic saline solution as a treatment method alternative to orchietomy in patients with hormone sensitive metastatic prostatic cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2011;29:212-7.
- [4] Pineda MH, Reimers TJ, Faulkner LC, Hopwood ML, Seidel GE. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *American Journal of Veterinary Research*. 1977;38:831-8.
- [5] Oliveira ECS, Moura MRP, de Sá MJC, Silva Junior VA, Kastelic JP, Douglas RH, et al. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*. 2012;77:1056-63.
- [6] Pineda MH, Dooley MP. Surgical and chemical vasectomy in the cat. *American Journal of Veterinary Research*. 1984;45:291-300.
- [7] Jana K, Samanta PK, Ghosh D. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study. *Animal Reproduction Science*. 2005;86:89-108.
- [8] Canpolat I, Bulut S, Günay C, Eröksüz H, Gür S. An evaluation of the outcome of bull castration by intra-testicular injection of ethanol and calcium chloride. *Revue De Medecine Veterinaire*. 2006;157:420-5.

- [9] Soto FR, Viana WG, Sousa AJ, Pinheiro SR, Mucciolo GB, Hosomi FYM, et al. Evaluation of zinc gluconate, either associated or not to dimethyl sulfoxide, as contraceptive method for male dogs. *Animal Reproduction*. 2007;4:119-24.
- [10] Emir L, Dadalı M, Sunay M, Erol D, Çaydere M, Üstün H. Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: A minimally invasive method. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2008;26:392-6.
- [11] Ting STL, Earley B, Hughes JML, Crowe MA. Effect of ketoprofen, lidocaine local anesthesia, and combined xylazine and lidocaine caudal epidural anesthesia during castration of beef cattle on stress responses, immunity, growth, and behavior. *Journal of Animal Science*. 2003;81:1281-93.
- [12] Coetzee J, Nutsch A, Barbur L, Bradburn R. A survey of castration methods and associated livestock management practices performed by bovine veterinarians in the United States. *BMC Veterinary Research*. 2010;6:12.
- [13] Mongkonpunya K, Hafs HD, Convey EM, Tucker HA, Oxender WD. Serum Luteinizing Hormone, Testosterone and Androstenedione in Pubertal and Prepubertal Bulls after Gonadotropin Releasing Hormone. *Journal of Animal Science*. 1975;40:682-6.
- [14] Kesler DJ, Garverick HA. Luteinizing Hormone and Testosterone Concentrations in Plasma of Bull Calves Treated with Gonadotropin Releasing Hormone. *Journal of Dairy Science*. 1977;60:632-4.
- [15] Jana K, Samanta PK. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. *Contraception*. 2007;75:390-400.
- [16] Coulter GH, Senger PL, Bailey DRC. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1988;84:417-23.

- [17] Robertshaw D. Thermal regulation and the thermal environment. In: Reece W, editor. Dukes' physiology of domestic animals. Ithaca: Cornell University Press; 2004. p. 962–73.
- [18] Cohen RDH, King BD, Thomas LR, Janzen ED. Efficacy and stress of chemical versus surgical castration of cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. 1990;70:1063-72.
- [19] Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. Effect of growth rate from 6 to 16 months of age on sexual development and reproductive function in beef bulls. *Theriogenology*. 2012;77:1398-405.
- [20] Stafford KJ, Mellor DJ, Todd SE, Bruce RA, Ward RN. 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 in Veterinary Science*. 2002;73:61-70.
- [21] Coetzee JF. Assessment and Management of Pain Associated with Castration in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2013;29:75-101.

7. Figure legends

Figure 1 - H&E-stained histological section of testis from control and treated groups. Intact seminiferous tubule (A) and normal testicular parenchyma (B) from animals submitted to surgical orchiectomy. Coagulative necrosis of Leydig cells and seminiferous tubule (C) and severe disorganization of parenchyma cells (D) from animals submitted to 20% NaCl intratesticular injection.

Figure 2 - Testosterone levels in 12-month-old control and treated animals (n=5/group). Blood samples were collected 0 and 3 hours after im administration of GnRH analog in surgically castrated (NC) and intact animals (PC) and animals submitted to 20% NaCl intratesticular injection from 1 to 5 (G1), 15 to 20 (G2) and 25 to 30 (G3) days old.

Figure 3 - Testicular and rectal temperature from control and treated groups (n=3/group).

Temperature was measured in surgically castrated (NC) and intact animals (PC) and animals submitted to 20% NaCl intratesticular injection from 1 to 5 (G1) days old.

Figure 1.

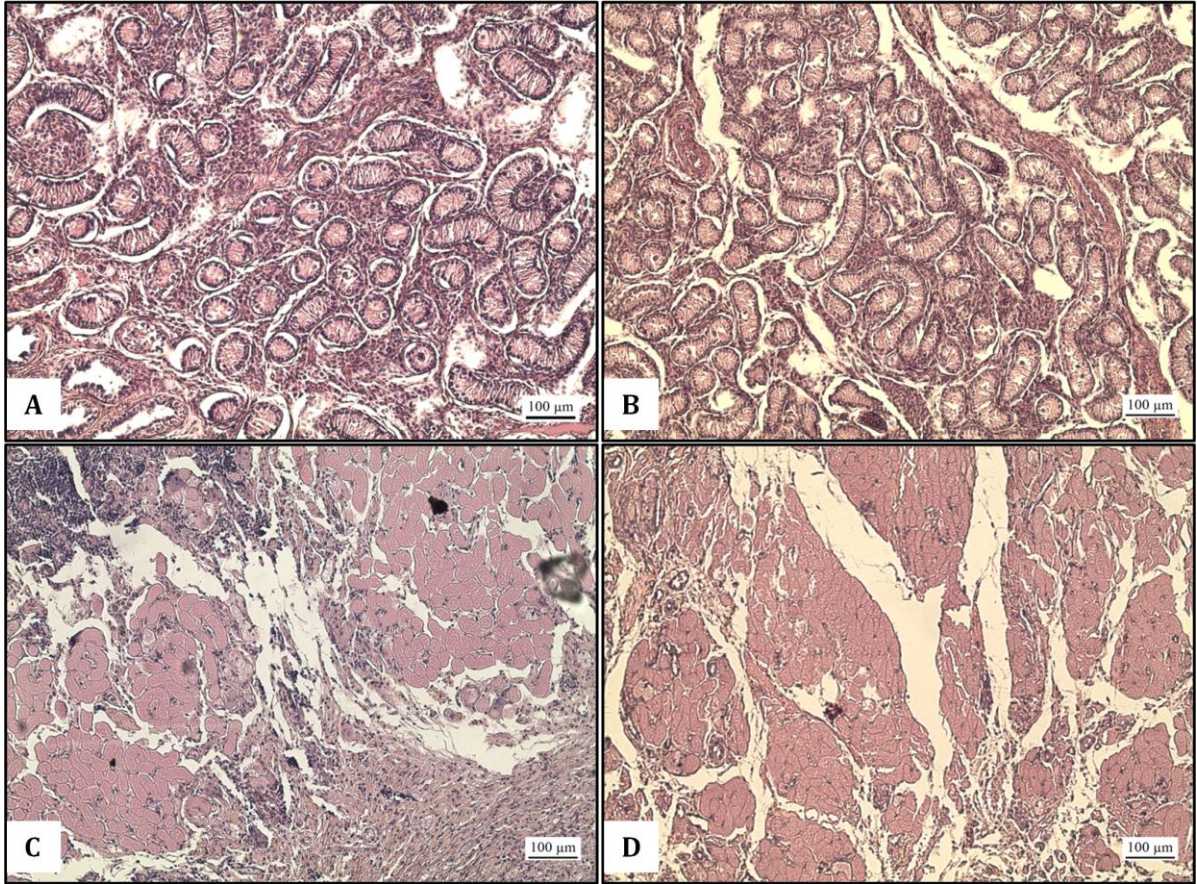


Figure 2.

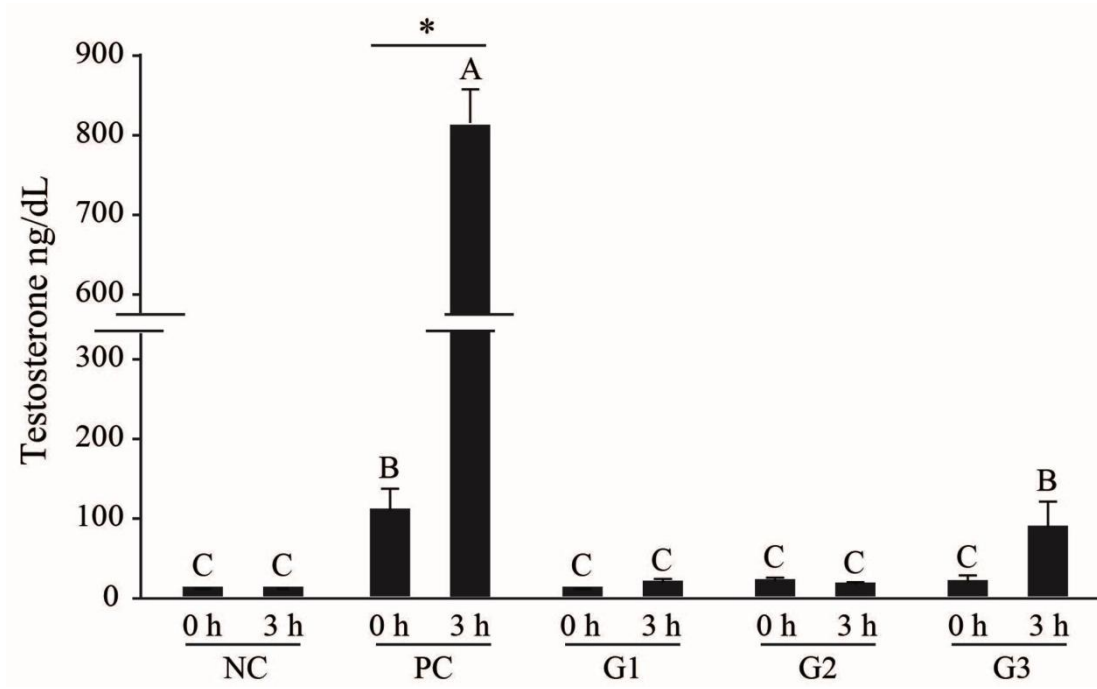
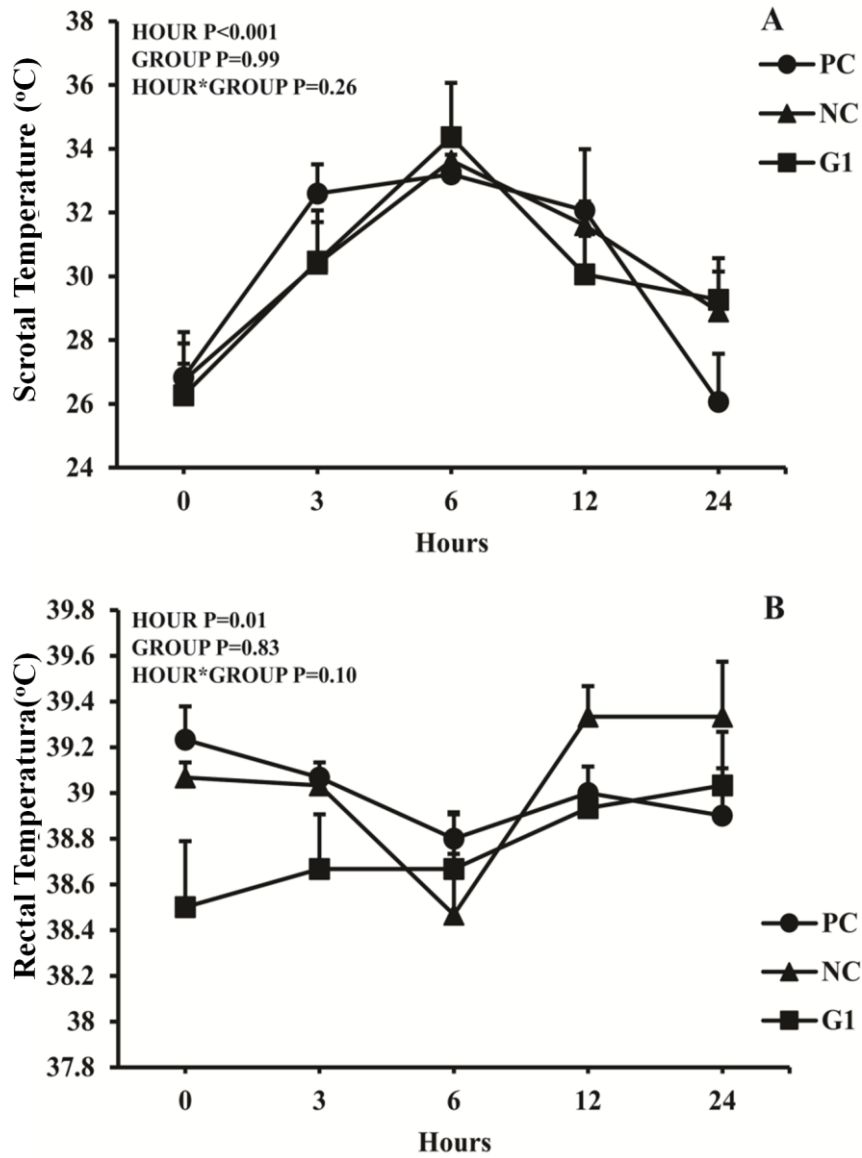


Figure 3.



4. CONCLUSÃO

A utilização da injeção intratesticular de solução hipertônica de NaCl é um método de fácil aplicação e resultados satisfatórios em bovinos, causando esterilidade e completa supressão da síntese de testosterona, pois acarreta uma desorganização na estrutura testicular (Anexo A), quando realizada até 20 dias após o nascimento. Resultados de temperatura escrotal (Anexo B), temperatura retal e comportamento animal sugerem que este procedimento causa menor desconforto aos animais em comparação à remoção cirúrgica dos testículos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, C., et al. Imunoconcepção em mamíferos com ênfase no controle populacional de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.3/4, p.159-166. 2005.
- AMANN, R. P.; B. D. SCHANBACHER. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v.57 Suppl 2, p.380-403. 1983.
- ANWAY, M. D., et al. Expression of Testicular Germ Cell Genes Identified by Differential Display Analysis. **Journal of Andrology**, v.24, n.2, p.173-184. 2003.
- BERNDTSON, W. E., et al. Relationship of Absolute Numbers of Sertoli Cells to Testicular Size and Spermatogenesis in Young Beef Bulls. **Journal of Animal Science**, v.64, n.1, p.241-246. 1987.
- BOOCKFOR, F. R., et al. Effects of Unilateral Castration and Unilateral Cryptorchidism of the Holstein Bull on in Vitro Leydig Cell Response. **Journal of Animal Science**, v.56, n.6, p.1386-1392. 1983.
- BRETSCHNEIDER, G. Effects of age and method of castration on performance and stress response of beef male cattle: A review. **Livestock Production Science**, v.97, n.2-3, p.89-100. 2005.
- CANPOLAT, I., et al. An evaluation of the outcome of bull castration by intra-testicular injection of ethanol and calcium chloride. **Revue de médecine vétérinaire**, v.157, n.8/9, p.420. 2006.
- COETZEE, J., et al. A survey of castration methods and associated livestock management practices performed by bovine veterinarians in the United States. **BMC Veterinary Research**, v.6, n.1, p.12. 2010.
- COETZEE, J. F. Assessment and Management of Pain Associated with Castration in Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.29, n.1, p.75-101. 2013.
- DESJARDINS, C. The Microcirculation of the Testis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.564, n.1, p.243-249. 1989.
- EMIR, L., et al. Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: A minimally invasive method. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.26, n.4, p.392-396. 2008.
- EMIR, L., et al. Hormonal and pathologic changes after chemoablation of testes with hypertonic saline solution as a treatment method alternative to orchiectomy in patients with hormone sensitive metastatic prostatic cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.29, n.2, p.212-217. 2011.

HABENICHT, U. F., et al. Induction of chemical castration in male rats by a new long-acting LHRH-antagonist. **The Prostate**, v.17, n.1, p.69-83. 1990.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia Funcional da Reprodução Masculina. In: R. R. Ashdown e J. L. Hancock. **Reprodução Animal**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1982. p.7-31.

JANA, K., et al. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study. **Animal Reproduction Science**, v.86, n.1-2, p.89-108. 2005.

KAR, A. B., et al. Sterilization of male rhesus monkeys by iron salts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.9, n.1, p.115-117. 1965.

MOURA, A. A.; B. H. ERICKSON. Testicular development, histology, and hormone profiles in three yearling angus bulls with spermatogenic arrest. **Theriogenology**, v.55, n.7, p.1469-1488. 2001.

OLIVEIRA, E. C. S., et al. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. **Theriogenology**, v.77, n.6, p.1056-1063. 2012.

OLIVEIRA, M.; L. BRITO. Comunicado Técnico - Mííases dos bovinos. **Embrapa Pecuária Sudeste**, v.56. 2005.

PINEDA, M. H.; M. P. DOOLEY. Surgical and chemical vasectomy in the cat. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.2, p.291-300. 1984.

PINEDA, M. H., et al. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.6, p.831-838. 1977.

POLGUIJ, M., et al. Angioarchitecture of the bovine spermatic cord. **Journal of Morphology**, v.272, n.4, p.497-502. 2011.

REICHENBACH, H., et al. Tecnologia do sêmen e inseminações artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: ROCA, 2008. cap.4, p.57-82.

RUSSELL, L. D.; L. R. DE FRANÇA. Building a testis. **Tissue and Cell**, v.27, n.2, p.129-147. 1995.

SENGER, P. The Organization and Function of the Male Reproductive System. In. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2 ed. Pullman: Current Conceptions, Inc, 2003. p.44-79.

SHARPE, R., et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v.125, n.6, p.769-784. 2003.

SOTO, F., et al. Evaluation of zinc gluconate, either associated or not to dimethyl sulfoxide, as contraceptive method for male dogs. **Animal Reproduction**, v.4, p.119-124. 2007.

STAFFORD, K. J.; D. J. MELLOR. The welfare significance of the castration of cattle: A review. **New Zealand Veterinary Journal**, v.53, n.5, p.271-278. 2005.

STAFFORD, K. J., et al. 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 in Veterinary Science**, v.73, n.1, p.61-70. 2002.

SWENSON, M. J. Processos Reprodutivos no Macho. In: G. H. Stabenfeldt e L. E. Edqvist. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996. p.719-730.

TING, S. T. L., et al. Effect of ketoprofen, lidocaine local anesthesia, and combined xylazine and lidocaine caudal epidural anesthesia during castration of beef cattle on stress responses, immunity, growth, and behavior. **Journal of Animal Science**, v.81, n.5, p.1281-1293. 2003.

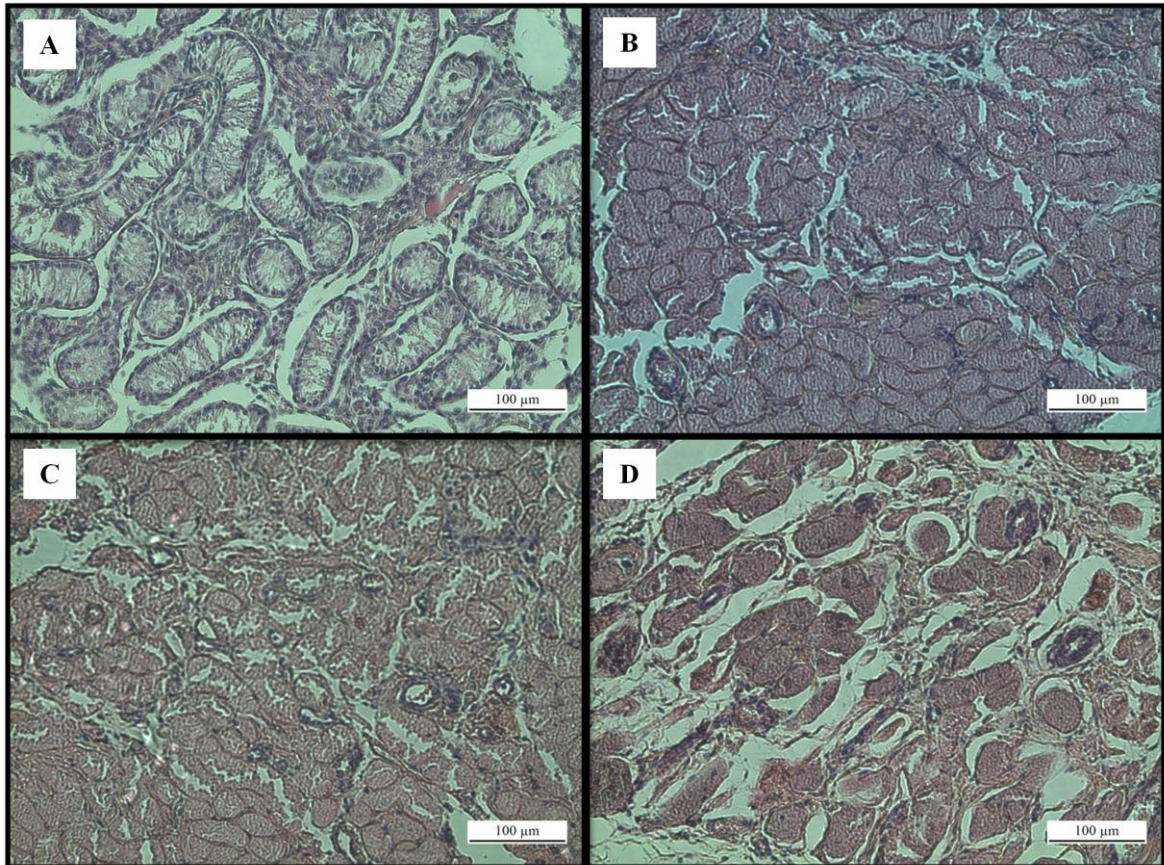
ULKER, H., et al. Changes in testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in buck kids immunized against LHRH using recombinant LHRH fusion protein. **Reproduction in domestic animals**, v.44, n.1, p.37-43. 2009.

WALKER, W. H. Molecular Mechanisms Controlling Sertoli Cell Proliferation and Differentiation. **Endocrinology**, v.144, n.9, p.3719-3721. 2003.

WONG, C. M. Chemical Castation: Oregon's Innovative Approach to Sex Offender Rehabilitation, or Unconstitutional Punishment. **Oregon Law Review**. 80: 267 p. 2001.

ANEXOS

Anexo A – Imagem histológica em aumento de 200x dos animais castrados aos 60 dias. (A) Animal controle positivo mostrando a organização do tecido testicular. (B,C e D) Animal do G1, G2 e G3 respectivamente, evidenciando a necrose coagulativa das células de Leydig e dos túbulos seminíferos.



Anexo B – Imagens termográficas da região escrotal de bezerros submetidos à castração cirúrgica (controle negativo), não-castrados (controle positivo) e grupo que recebeu injeção intratesticular de solução hipertônica de cloreto de sódio com até 5 dias de vida (grupo 1). As imagens foram capturadas com um termógrafo FLIR ThermaCAM™ E25.

