

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Marcadores inflamatórios e de estresse em ovinos submetidos a diferentes
manejos reprodutivos**

Vitória Gasperin Guazzelli Costa

Pelotas, 2018

Vitória Gasperin Guazzelli Costa

**Marcadores inflamatórios e de estresse em ovinos submetidos a diferentes
manejos reprodutivos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C837m Costa, Vitória Gasperin Guazzelli

Marcadores inflamatórios e de estresse em ovinos submetidos a diferentes manejos reprodutivos/Vitória Gasperin Guazzelli Costa ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador. — Pelotas, 2018.

77 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Bemestar animal. 2. Contracepção. 3. Cortisol. I. Gasperin, Bernardo Garziera, orient. II. Título.

CDD : 636.3

Vitória Gasperin Guazzelli Costa

Marcadores inflamatórios e de estresse em ovinos submetidos a diferentes manejos reprodutivos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Orientador)
Doutor em Fisiopatologia da Reprodução pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Kalyne Bertolin
Doutor em Veterinary Science pela Université de Montréal, Canadá

Prof. Dr. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luiz André e Luciane, por acreditarem em mim e permitirem que meus sonhos se tornem realidade.

Aos meus irmãos, André e Samuel, e minha família, pelos quais todos os dias tento ser uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, Bernardo, pela confiança e por todo auxílio para realização do mestrado, por ser um exemplo de pessoa e professor.

Ao ReproPEL, por todos esses anos de convivência diária, pela ajuda na execução dos experimentos e por permitir meu crescimento profissional.

Aos meus amigos, muitas vezes uma segunda família, pela parceria em todos os momentos.

Aos animais, que com sua simplicidade inspiram meu trabalho.

A Deus, pela vida e pela coragem!

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto...” (Violeta Parra)

Resumo

COSTA, Vitória Gasperin Guazzelli. **Marcadores inflamatórios e de estresse em ovinos submetidos a diferentes manejos reprodutivos.** 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Atender as exigências do mercado é necessário para agregar valor aos produtos de origem animal. Nesse sentido, há uma crescente preocupação com a saúde e bem-estar durante o período produtivo até o abate, fato que leva à busca por alternativas para diminuição do desconforto durante a realização de manejos como a inseminação artificial (IA), castração, descorna, vacinação, entre outros. A ovinocultura é uma atividade que está em ascensão no Brasil, mas que precisa aumentar a qualidade dos produtos em diversos aspectos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar como manejos reprodutivos afetam o bem-estar em ovinos. Inicialmente, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre os principais parâmetros de avaliação de inflamação, dor e desconforto em ruminantes e como eles são modulados durante a realização de manejos reprodutivos. Após, para testar um método alternativo para contracepção, 11 cordeiros foram divididos em dois grupos para avaliar a eficácia de uma injeção intratesticular (IIT) de NaCl associada a anestésico e analgésico, em comparação à não realização de procedimento (controle). Não houve efeito significativo do procedimento sobre o hemograma (hematócrito, número de glóbulos vermelhos), níveis de proteína plasmática total, níveis de cortisol e leucograma (número de células brancas, linfócitos, neutrófilos segmentados e relação neutrófilos:linfócitos). Animais do grupo IIT apresentaram níveis superiores de fibrinogênio no D3 após procedimento. Não foram observadas diferenças no ganho de peso. A avaliação clínica revelou que apenas um testículo (de um total de oito) do grupo IIT apresentou degeneração, enquanto que a avaliação histológica mostrou que a técnica gerou apenas pontos isolados de inflamação, alterações de membrana basal e necrose. Conclui-se que diversos parâmetros devem ser utilizados para fornecer respostas mais confiáveis quanto ao desconforto proporcionado por diferentes manejos reprodutivos em ruminantes. A IIT não foi eficiente, embora alterações focais tenham sido observadas na histologia. O método experimental de castração testado no presente estudo não alterou significativamente a maioria dos parâmetros sanguíneos avaliados.

Palavras-chave: bem-estar animal, contracepção, cortisol

Abstract

COSTA, Vitória Gasperin Guazzelli. **Inflammatory and stress markers in sheep submitted to different reproductive procedures.** 2018. 77f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Meeting market demands is necessary to add value to animal products. In this regard, there is an increased concern about animal health and welfare during all the production steps until slaughter, stimulating the research of feasible alternatives to avoid or minimize animal discomfort during procedures such as artificial insemination (AI), castration, dehorning, vaccination, among others. Sheep production is on the rise in Brazil, but still requires improvements in productive technologies to increase the quality of the products in several aspects. Thus, the objective of the present study was to evaluate how reproductive procedures affect animal welfare in the ovine species. Initially, we conducted a literature review about the main parameters to assess inflammation, pain and discomfort in ruminants and how these parameters are modulated by the reproductive management. Then, to evaluate a potential contraception technique, 11 lambs were allocated in two groups to investigate the feasibility and the impact of intratesticular injection (ITI) of a solution containing NaCl combined with anesthetic and analgesic compared to control (non-castrated) animals. No significant effects of procedure were observed on red blood cells (hematocrit and number of red blood cells), total plasma protein levels, cortisol levels and leucogram (number of white blood cells, lymphocytes, segmented neutrophils and neutrophil-to-lymphocyte ratio). Increased fibrinogen levels were observed in animals from ITI group on D3 after procedure. No significant differences in daily weight gain were observed. Clinical evaluation of the lambs from ITI group revealed that only one (out of 8) testicle regressed, whereas in the histological evaluation it was observed that ITI induced only focal inflammation, alterations in basement membrane integrity and necrosis. In conclusion, the assessment of several markers of inflammation, pain and stress should be considered to provide consistent results on the effect of different procedures on the welfare of ruminants. Furthermore, ITI was not efficient in inducing contraception in lambs, despite focal alterations were observed in testicular histological sections. The potential contraceptive method did not significantly alter most of the blood parameters evaluated.

Keywords: animal welfare; contraception; cortisol.

Lista de Figuras

- Figure 1 Figure 1: Serum cortisol levels (average \pm standard error) in lambs submitted to intratesticular injection (ITI) and control lambs (C; non-castrated), in different moments, before and after procedure. Probabilities for significant main effects (T = time; G = group): T: P=0.007 and G: P=0.08. 62
- Figure 2 Hematocrit (HT), number of red blood cells (RBC), total plasma protein (TPP), and fibrinogen (FIB) (average \pm standard error) in lambs submitted to intratesticular injection (ITI) and control lambs (C; non-castrated), in different moments, before and after procedure. Probabilities for significant main effects (T = time; G = group) and the interaction (GxT): HT- T: P=0.02 and G: P=0.04; RBC- T: P=0.04; TPP- T: P<0.0001 and FIB- G: P=0.04 and GxT: P=0.007. 63
- Figure 3 Number of white blood cells, lymphocytes and segmented neutrophils (average \pm standard error) in lambs submitted to intratesticular injection (ITI) and control lambs (C; non-castrated), in different moments, before and after procedure. A significant effect of time (P=0.02) was observed for lymphocytes. 64
- Figure 4 Figure 4: Representative images of histological sections from testicular parenchyma of lambs from control (A) or ITI groups (B and C). A and B: intact seminiferous tubules can be seen in histological sections stained with HE. C: alterations in testicular parenchyma can be seen in histological sections stained with PAS. The red arrows indicate inflammatory cells infiltration in B and C. 65

Lista de Tabelas

Tabela 1	Avaliação de marcadores de inflamação e estresse em ruminantes submetidos a manejos reprodutivos.....	38
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

BPAS	Boas práticas agropecuárias
CEEA	Comitê de ética em experimentação animal
HPA	Hipotálamo pituitária adrenal
HT	Hematócrito
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IIT	Injeção intratesticular
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
PFA	Proteína de fase aguda
PON1	Paraoxonase 1
PPT	Proteína plasmática total
TPP	<i>Total plasma protein</i>
FIB	<i>Fibrinogen</i>
RBC	Número de células vermelhas
RPM	Rotações por minuto
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
WBC	Número de células brancas
N:L	<i>neutrophil-to-lymphocyte ratio</i>
ITI	<i>Intratesticular injection</i>
PAS	<i>Periodic acid-schiff</i>
I.M.	Intramuscular

EE	Eletroejaculação
AS	Amiloide sérico
AB	Anéis de borracha

Lista de Símbolos

mg	Miligrama
g	Grama
L	Litro
dL	Decilitro
U	Unidade
mL	Mililitro
pg	Picograma
nmol	Nanomolar
Kg	Kilograma
µg	Micrograma
ng	Nanograma
NaCl	Cloreto de sódio
CaCl	Cloreto de cálcio
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
min	Minuto
h	Hora
n	Número
C	Célsius

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Artigo.....	15
2.1 Artigo 1.....	15
2.2 Artigo 2.....	40
3 Considerações Finais.....	66
Referências.....	67
Anexos.....	76

1 Introdução

Por motivos históricos e socioeconômicos, a atividade agropecuária sempre esteve em relevância no cenário nacional. Dessa forma, o Brasil é detentor do segundo maior rebanho bovino do mundo e maior exportador, com aproximadamente 200 milhões de cabeças (IBGE, 2015). Já a ovinocultura está em expansão no país e mostra-se promissora, pois o Brasil apresenta as condições necessárias para aumento da produção, como extensão territorial com alta oferta de forragem em um clima tropical (Madruga *et al.*, 2005). Assim, o Brasil se torna um potencial exportador desse tipo de carne, além da oportunidade de produzir grandes volumes de lã e leite. O rebanho ovino brasileiro ocupa atualmente a 18^o posição mundial, representada por 18,410 milhões de cabeças (IBGE, 2015). Apesar do relativo baixo consumo interno de carne ovina, a produção nacional ainda é insuficiente para atender essa demanda, levando a expressiva importação desse produto.

Tendo em vista a crescente importância do ovino para a produção de carne, pelo fato da espécie ser apta a produzir em áreas impróprias para exploração de outras atividades (Morris, 2009), além da valorização da carne nobre de cordeiro pelo mercado consumidor, a ovinocultura tem demonstrado ser uma alternativa viável como atividade econômica. Entretanto, para que isso ocorra, é necessário que os técnicos e produtores envolvidos busquem retirar a característica de informalidade que a produção ovina apresenta no Brasil (Da Silva, 2002), tanto durante a criação, como na venda dos produtos. Com um mercado de consumidores cada vez mais exigentes em relação à mercadoria adquirida, melhorar as características físicas e químicas da carcaça, fornecendo condições de bem-estar que melhorem a imagem do produto, determinam a competitividade da produção frente aos outros países e ao mercado interno.

Visando a segurança alimentar e a forma de tratamento dos animais, atualmente a sociedade busca informações a respeito da forma em que seu alimento é produzido. Com isso, os preceitos do bem-estar animal, que foram desenvolvidos

com o intuito de manter adequadas as condições físicas e fisiológicas dos indivíduos, devem ser aplicados nos sistemas de produção não somente para prevenção e tratamento de doenças, mas também para alívio da dor e do estresse durante todo o ciclo produtivo, melhorando a saúde e conseqüentemente aumentando a produtividade (Grandin, 2015).

Portanto, os objetivos do presente estudo foram: revisar os marcadores que podem ser utilizados para mensuração de estresse, inflamação e desconforto em ruminantes e como estes indicadores são afetados pelos manejos relacionados à reprodução; testar a viabilidade de um método alternativo para castração de cordeiros através de injeção intratesticular (IIT); e determinar como a IIT de uma substância hipertônica associada a anestésico e analgésico modula os parâmetros de inflamação e estresse em cordeiros.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Marcadores sistêmicos de inflamação e estresse em bovinos e ovinos submetidos a diferentes manejos reprodutivos

Vitória G. G. Costa, Arnaldo D. Vieira, Augusto Schneider, Monique T. Rovani, Paulo B. D. Gonçalves, Bernardo G. Gasperin

Submetido à revista Ciência Rural

1 **Marcadores sistêmicos de inflamação e estresse em bovinos e ovinos submetidos a**
2 **diferentes manejos reprodutivos**

3
4 **Systemic inflammatory and stress markers in cattle and sheep submitted to**
5 **different reproductive procedures**

6
7 Vitória G. G. Costa¹, Arnaldo D. Vieira¹, Augusto Schneider¹, Monique T. Rovani¹,
8 Paulo B. D. Gonçalves², Bernardo G. Gasperin^{1*}

9
10 **-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-**

11
12 **Resumo**

13 Como forma de estimular a adoção de medidas que preservem o conforto dos
14 animais, estudos demonstram o efeito de diferentes procedimentos sobre marcadores de
15 desconforto. Entretanto, alguns marcadores comumente utilizados, como o cortisol,
16 apresentam alta influência de fatores externos, o que torna os resultados menos precisos.
17 Para contornar isso, outros parâmetros sistêmicos podem ser utilizados para determinar
18 a presença de estresse, dor ou inflamação, como as proteínas de fase aguda, a
19 bradicinina e substância P. O objetivo desta revisão é relacionar potenciais marcadores
20 de inflamação e estresse, discutindo como e quando são regulados frente aos estímulos,
21 para que seja possível intervir no momento mais adequado, proporcionando maior
22 conforto. Ainda, pretende-se revisar de que forma os manejos reprodutivos acarretam
23 em desconforto, a fim de minimizá-lo.

¹Universidade Federal de Pelotas, PPG Veterinária, Campus Universitário S/N, 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil. ²Universidade Federal do Pampa, PPGBioq e PPGCA, Campus Uruguaiana - RS, Universidade Federal de Santa Maria, PPGMV, Santa Maria – RS, Brasil. *Autor para correspondência: bggasperin@gmail.com

1 **Palavras chave:** ovinos, bovinos, biotécnicas reprodutivas.

2

3 **Abstract**

4 In an attempt to stimulate the adoption of techniques that preserve animal
5 welfare, studies demonstrate the effects of different procedures on discomfort markers.
6 However, some commonly used markers, such as cortisol, are highly influenced by
7 external factors, influencing the results. To overcome that issue, other systemic markers
8 can be employed to identify stress, pain and inflammation, such as acute phase proteins,
9 bradykinin and P substance. The aim of this study is to review the potential markers,
10 discussing how and when they are regulated after stimulus, allowing determining the
11 best moment to intervene and minimize animal discomfort. Furthermore, we aim to
12 review how the reproductive procedures cause stress, to develop strategies to decrease
13 animal discomfort.

14 **Key words:** sheep, cattle, reproductive biotechniques.

15

16 **1. Introdução**

17 A intensificação da produção para suprir a demanda mundial de proteína animal
18 pode conflitar com os princípios de bem-estar. Por outro lado, é crescente a busca por
19 produtos que sejam oriundos de sistemas que priorizam o conforto animal (HEID &
20 HAMM, 2013). Assim, estimula-se a adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPAs), já
21 que as vantagens de seu emprego podem superar os custos de implantação (BENNETT
22 & BLANEY, 2003).

23 Mesmo que os consumidores entendam que os produtores adotam determinadas
24 medidas por questões econômicas (SPOONER et al., 2014), a responsabilidade da

1 aplicação das medidas de bem-estar animal é atribuída aos produtores e técnicos. Dessa
2 forma, torna-se necessário racionalizar os manejos utilizados habitualmente, com
3 objetivo de propiciar maior conforto, com base em evidências científicas repetíveis em
4 diferentes condições, independentemente do avaliador. Para isso, é necessário
5 identificar os momentos e situações críticas, para os quais a literatura já cita alguns
6 modelos baseados em índices físicos e comportamentais, como o “Modelo dos Cinco
7 Domínios”, que estimam o comprometimento do bem-estar através de medidas
8 abrangentes e coerentes (MELLOR, 2017).

9 Na mensuração do grau de desconforto, para garantir a repetibilidade dos
10 resultados, devem ser considerados critérios que apresentem validade, viabilidade e
11 confiabilidade. A avaliação não pode ser subjetiva, por isso existem parâmetros
12 fisiológicos e comportamentais objetivos que podem ser mensurados através de
13 metodologias já fundamentadas, interpretando respostas às diferentes situações
14 (BLACHE & MALONEY, 2017). É possível mensurar parâmetros através de escalas de
15 monitoração comportamental, de alteração de frequência cardíaca e temperatura
16 (corporal ou local), bem como de mensuração de níveis séricos de fatores de resposta
17 orgânica adaptativa ao estresse (cortisol) ou lesões teciduais (proteínas de fase aguda),
18 entre outros. Portanto, este estudo tem por objetivo revisar os principais parâmetros
19 sistêmicos indicativos de desconforto animal e seus mecanismos de atuação. Ainda,
20 pretende-se determinar de que forma os manejos reprodutivos acarretam em estresse,
21 para identificar o melhor momento de intervenção para minimizar o desconforto.

22

23 2. Marcadores de estresse, desconforto e inflamação

24 Conhecer a forma como o estresse e a dor implicam em mudanças fisiológicas e

1 comportamentais torna-se fundamental quando se quer evitar essas situações. A resposta
2 mais clássica consiste na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), por ser
3 um mecanismo de sobrevivência para manter a homeostase. Contudo, rapidamente
4 também há mudanças comportamentais e em outros marcadores que podem auxiliar a
5 determinar a ocorrência de desconforto com maior precisão.

6

7 *2.1 Proteínas sistêmicas utilizadas como marcadores de estresse e inflamação*

8 A proteína total é composta pela albumina e globulinas alfa, beta e gama no
9 plasma sanguíneo, as quais possuem uma proporção esperada de aproximadamente 1:1
10 em animais saudáveis (KANEKO et al., 2008). Embora um aumento das proteínas totais
11 esteja frequentemente associado à desidratação, doenças inflamatórias possuem um
12 papel importante na modulação. Na inflamação e na resposta a estímulos estressores,
13 observa-se uma correlação negativa entre as globulinas e a albumina (ECKERSALL,
14 1995). Além disso, observam-se alterações em outras proteínas denominadas proteínas
15 de fase aguda (PFA).

16 As PFA fazem parte do sistema imune inato, respondendo imediatamente após
17 lesão tecidual para restaurar a homeostase, tendo sua regulação sinalizada por estímulos
18 como trauma, infecção, estresse, inflamação e neoplasias (CECILIANI et al., 2012). A
19 resposta de fase aguda acarreta em diversos eventos sistêmicos incluindo febre,
20 leucocitose e aumento do cortisol, além de promover regulação das PFA
21 (ECKERSALL, 1995; ECKERSALL, 2000). A concentração sérica das PFA positivas é
22 proporcional ao grau de lesão tecidual ou de inflamação do animal, e inversamente
23 proporcional às PFA negativas (KENT, 1992). Por ser uma reação rápida, muitas vezes
24 anterior aos sinais clínicos, as PFAs são consideradas os primeiros marcadores de

1 processos patológicos.

2 A haptoglobina é uma PFA positiva de alto peso molecular, descrita como
3 bacteriostática, agindo na defesa contra patógenos, como inibidora da atividade dos
4 granulócitos, sendo também conhecida por seu efeito imunomodulatório (PETERSEN
5 et al., 2004). Em animais, sabe-se que há um aumento dos níveis séricos após trauma,
6 inflamação, infecção bacteriana, procedimentos cirúrgicos e condições estressantes
7 (MURATA & MIYAMOTO, 1993; EARLEY & CROWE, 2002). Nos ruminantes, a
8 haptoglobina muitas vezes não é detectável em animais saudáveis, aumentando durante
9 a resposta de fase aguda (> 2 g/L), cerca de dois dias após o estímulo (ECKERSALL et
10 al., 2007).

11 A amiloide sérica (AS) é outra PFA positiva altamente sensível como marcador
12 de inflamação e infecção em ruminantes (HORADAGODA et al., 1999), bem como de
13 estresse (ARTHINGTON et al., 2003), tendo se destacado no diagnóstico precoce
14 dessas alterações. Embora pouco utilizada, estudos relatam aumento significativo no
15 soro de animais oito horas após estímulos, atingindo concentração máxima (1000 mg/L)
16 entre 24 e 48 h (KAJIKAWA et al., 1999). Seus níveis podem permanecer elevados na
17 resposta crônica, sendo considerada uma das PFAs com maior amplitude de resposta
18 (GABAY & KUSHNER, 1999).

19 Além das PFAs positivas, a albumina torna-se uma PFA negativa frente a
20 processos agudos e situações estressantes, tendo seus níveis diminuídos devido ao alto
21 aproveitamento dos hepatócitos para produção das PFA positivas (KANEKO et al.,
22 2008). Mesmo variando entre espécies, os valores de albumina sérica encontram-se
23 entre 2,5 a 4,5 g/dL nos indivíduos hígidos, com um decréscimo de 50% após um
24 processo inflamatório (HAYASHI et al., 2001).

1 A paraoxonase 1 (PON1) é uma PFA negativa sintetizada pelo fígado e liberada
2 na corrente sanguínea após um estímulo de citocinas pró-inflamatórias (BIONAZ et al.,
3 2007). Após processos inflamatórios e de estresse, essa enzima apresenta seus níveis
4 séricos diminuídos em até seis horas após o estímulo (DE CAMPOS et al., 2017). A
5 atividade sérica de PON1 esperada em bovinos saudáveis é, em média, de 83 U/mL,
6 sofrendo um declínio para 69 U/mL em resposta ao desconforto (BIONAZ et al., 2007;
7 CECILIANI et al., 2012). Já em ovinos, Minuti et al. (2013) observaram valores de 130
8 U/mL para animais controle, e uma queda para menos de 100 U/mL, entre 60 e 240 min
9 após severa lesão intestinal induzida. Os valores de PON1 são variáveis, dependendo da
10 técnica escolhida para sua quantificação, por isso pode não ser confiável o uso de
11 pontos de corte pré-definidos.

12 Além das PFA, a mensuração de proteínas denominadas algio gênicas, que
13 sensibilizam os nociceptores da dor, pode contribuir na identificação de processos
14 dolorosos. Esses mediadores são liberados em resposta à agressão tecidual, onde há um
15 acúmulo de derivados do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos, que
16 levam à degranulação de mastócitos. Em ruminantes, a bradicinina foi identificada
17 como marcador de inflamação e dor a partir de amostras de leite obtidas de animais
18 saudáveis (120,7 pg/mL) e acometidos por mastite (279,2 pg/mL), através de
19 radioimunoensaio (ESHLAGHI et al., 1999). Outra proteína algio gênica é a substância
20 P, que foi caracterizada como importante indicador de bem-estar em animais de
21 produção, pois aumentou significativamente 40 min após a castração cirúrgica de
22 bezerros (506,4 pg/mL) em comparação aos animais controle (386,4 pg/mL)
23 (COETZEE et al., 2008).

24 A injeção intravenosa de lipopolissacarídeos induz uma resposta inflamatória

1 com um pico na temperatura corporal (40,5° C) e aumento da taxa respiratória cinco
2 horas após a injeção (CARROLL et al., 2009). Também ocorre aumento nas
3 concentrações de proteína amiloide sérica, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e
4 interleucina-6 (IL6) em menos de uma hora após o desafio, os quais permanecem
5 elevados por até seis horas (CARROLL et al., 2009). A reação inflamatória é
6 acompanhada por alterações no cortisol, que atinge um pico três horas após o desafio e
7 retornam aos níveis basais em oito horas, sendo que ambas respostas variam com a raça
8 em bovinos (CARROLL et al., 2009; CARROLL et al., 2011).

9

10 *2.2 Mensuração dos níveis de cortisol como indicador de estresse*

11 Uma das respostas mais conhecidas ao estresse é a liberação de glicocorticoides
12 pela suprarrenal, poucos minutos após o estímulo. O cortisol sérico é um dos
13 marcadores mais utilizados para quantificar o grau de dor e desconforto
14 (BRETSCHEIDER, 2005), através do qual é possível analisar a curto prazo os efeitos
15 dos manejos sobre os animais. Embora a elevação não ocorra exclusivamente por
16 estímulos dolorosos, mas também por mudanças de manejo, excitação e ansiedade,
17 trabalhos demonstram um pico plasmático uma hora após estímulos estressores.

18 A dosagem de cortisol envolve a contenção para coleta de sangue, necessitando
19 de pessoas treinadas, sendo que a própria coleta pode induzir alterações. A mensuração
20 nas fezes surgiu como alternativa não invasiva, sendo que 12 h após o pico plasmático a
21 mesma concentração de cortisol atinge o intestino dos ruminantes (PALME et al.,
22 1996). Experiências dolorosas também podem ser avaliadas por um aumento do cortisol
23 salivar. Entretanto, mesmo tendo o mesmo perfil de aumento, as concentrações salivares
24 são significativamente menores do que no plasma (NEGRÃO et al., 2004).

1

2 **3. Efeito de procedimentos reprodutivos sobre os marcadores de desconforto**

3 A eficiência dos sistemas produtivos tem como fator determinante de sucesso a
4 eficiência reprodutiva. Através de biotécnicas reprodutivas é possível propagar
5 características genéticas de animais superiores em programas de melhoramento. Além
6 das biotécnicas, procedimentos são realizados para promover a esterilização de
7 indivíduos geneticamente inferiores. Independente da finalidade, as técnicas devem ser
8 eficientes, causando mínimo desconforto e contemplando os princípios de bem-estar
9 (MELLOR & STAFFORD, 2000).

10

11 *3.1 Métodos para promover contracepção em machos*

12 A castração é uma prática realizada com frequência, por questões de manejo e
13 acabamento de carcaça, sendo o procedimento mais estudado quanto aos efeitos sobre
14 marcadores de estresse, dor e inflamação (Tabela 1). Nos ruminantes, diversas técnicas
15 são consolidadas para essa finalidade, sendo que a escolha depende das circunstâncias
16 (idade, instalações) em que se encontram os animais (CAPUCILLE et al., 2002). Em
17 geral, os efeitos negativos são menores em animais mais jovens (ROBERTSON et al.,
18 1994).

19 A orquiectomia é o método mais difundido e consiste na extirpação cirúrgica dos
20 testículos através de excisão dos cordões espermáticos. Em bovinos, o procedimento
21 resulta em um aumento significativo de posturas anormais, em torno de até 30 min após
22 o procedimento, sendo que Molony et al. (1995) identificaram que a permanência em
23 postura imobilizada é alteração mais característica. Quando realizada aos seis, 21 e 42
24 dias de vida, apresenta picos de cortisol de 106, 63 e 107 nmol/L, respectivamente

1 (ROBERTSON et al., 1994). Quando animais de 14 meses de idade foram submetidos à
2 cirurgia (sob anestesia local), os níveis de haptoglobina atingiram um pico (639 µg/mL)
3 dois dias após o procedimento, se mantendo elevados até o dia quatro. Já em relação ao
4 cortisol, animais castrados exibiram aumento nas concentrações apenas 14 dias após a
5 realização do procedimento (FISHER et al., 2001). Quanto aos efeitos agudos, níveis
6 séricos de cortisol atingem um pico 30 e 60 min após, sem alterações significativas nos
7 níveis de PON1 e na temperatura do canto do olho, embora observou-se uma elevação
8 da temperatura escrotal um dia após o procedimento (OLIVEIRA et al., 2017). Em
9 cordeiros, a castração cirúrgica acarreta em desconforto manifestado por posturas
10 anormais por até 150 min (MOLONY et al., 1993) e elevação de cortisol por, no
11 mínimo, quatro horas após o procedimento (LESTER et al., 1991). Kent et al. (1993)
12 demonstraram pico de cortisol (200 nmoL/L) 40 min após a cirurgia, não retornando aos
13 valores basais (25 nmoL/L) em até 180 min.

14 Como alternativa ao procedimento cirúrgico, há métodos físicos para castração
15 em ruminantes, baseados na emasculação por bloqueio do aporte sanguíneo testicular
16 por esmagamento, ou de todo o saco escrotal, por estrangulamento (anéis ou cintas
17 elásticas). Em pequenos ruminantes, a colocação de anéis de borracha (AB) na base do
18 saco escrotal, leva à necrose e posterior queda de todo tecido (LESTER et al., 1991).
19 Ambos são procedimentos não cruentos e difundidos na ovinocultura (MOLONY et al.,
20 1993), embora não permitidos em alguns países. Melches et al. (2007) identificaram as
21 complicações causadas por esses métodos em cordeiros, como dor a longo prazo e o
22 risco de infecções e miíases. Os autores demonstraram que o uso de emasculador
23 acarreta em cicatrização mais rápida e menos sinais de dor a longo prazo. Já os AB
24 induzem características de desconforto semelhantes às observadas após orquiectomia,

1 com reações à palpação local por até 30 dias.

2 Cordeiros castrados com AB apresentam posturas anormais e inquietação nos
3 primeiros 45 min, sendo o comportamento anormal correlacionado positivamente com
4 níveis de cortisol plasmático (LESTER et al., 1996). Embora Price e Nolan (2001) não
5 tenham detectado aumento nos níveis de haptoglobina até 48 h após a castração com
6 AB, Pang et al. (2006) demonstram que, em bovinos, o uso da técnica gerou um
7 acréscimo da haptoglobina após três dias. As reações podem ser reduzidas,
8 apresentando níveis de cortisol salivar semelhantes aos animais controle, quando
9 previamente é utilizada anestesia epidural à base de xilasina e administração de flunixin
10 meglumine (GONZÁLEZ et al., 2010).

11 A castração através de injeção intratesticular de agentes que levam à inibição do
12 desenvolvimento testicular é considerada menos invasiva em relação aos métodos
13 comumente utilizados (EMIR et al., 2008). Ainda que os animais reajam à introdução
14 da agulha e inoculação da substância, a castração química à base de ácido
15 hidroxipropiônico apresentou menor liberação de cortisol após três e seis horas, em
16 bovinos, quando comparada à orquiectomia (COHEN et al., 1990). Oliveira et al.
17 (2017), utilizando uma solução de cloreto de sódio associada à lidocaína, não
18 observaram alteração detectável por termografia do canto do olho em bezerros. O
19 cortisol se elevou aos 30 min após a injeção (1,8 ug/dL) com retorno aos níveis basais
20 aos 60 min (1,3 ug/dL), sem alteração na atividade sérica de PON1.

21 Além das técnicas acima descritas, a castração imunológica representa uma
22 alternativa pouco invasiva. Entretanto, em um estudo investigando as reações após a
23 aplicação da vacina em vacas, observou-se um aumento da temperatura corporal (por 24
24 h), da frequência cardíaca e respiratória (por até 48 h) e sensibilidade no local da injeção

1 por duas a quatro semanas (BALET et al., 2014).

2

3 *3.2 Coleta de sêmen por eletroejaculador*

4 A técnica de eletroejaculação (EE) permite a obtenção de amostras seminais de
5 animais não condicionados que precisam ser submetidos ao exame andrológico, sendo
6 segura e eficaz, possibilitando adequada avaliação peniana, pela protrusão que ocasiona
7 (PALMER, 2005). É considerada um manejo estressor, pelas reações de vocalização
8 apresentadas durante o procedimento. Segundo Whitlock et al. (2012), touros
9 apresentam aumento da vocalização e um pico de cortisol (> 100 nmol/L) 10 min após o
10 início do estímulo, retornando aos valores basais aos 45 min (20 nmol/L), em
11 comparação aos animais controle (introdução da sonda sem impulsos elétricos), não
12 havendo alteração nos níveis de substância P. Entretanto, os animais submetidos à EE
13 não apresentam relutância em retornar ao local do procedimento.

14 Em carneiros, o EE possibilita a obtenção de ejaculado fora da estação
15 reprodutiva, quando há redução da libido. Os níveis de cortisol atingem um pico (2,5
16 $\mu\text{g/dL}$) 20 min após a coleta, retornando aos valores basais (0,5 $\mu\text{g/dL}$) uma hora após.
17 A proteína plasmática total aumenta significativamente, passando de 5,8 g/dL no
18 momento do procedimento, para 6,3 g/dL aos 30 min e 6,0 g/dL aos 120 min,
19 posteriormente retornando aos valores iniciais. As vocalizações são maiores entre o
20 segundo e quarto estímulo elétrico, diminuindo a partir do sétimo (DAMIÁN &
21 UNGERFELD, 2011). Para diminuir esses efeitos, Orihuela et al. (2009) sugerem a
22 aplicação prévia de cetamina e xilasina (i.m.).

23 Buscando uma alternativa ao EE, a realização de massagem das glândulas
24 sexuais acessórias guiada por ultrassonografia foi avaliada. Embora os estímulos

1 elétricos (EE) proporcionaram uma melhor qualidade do ejaculado, a massagem
2 apresentou vantagens práticas em relação ao bem-estar animal: possibilitou uma coleta
3 mais rápida e menores níveis de cortisol (25,3 ng/mL) em comparação ao EE (51,4
4 ng/mL) (UNGERFELD et al., 2015).

5

6 *3.3 Exame ginecológico e biotécnicas da reprodução em fêmeas*

7 A manipulação do trato reprodutivo, tanto por palpação retal, quanto por
8 vaginoscopia, é uma prática comum no exame ginecológico com objetivo de determinar
9 a saúde genital, *status* do ciclo estral, bem como realizar inseminação artificial,
10 diagnóstico de gestação e de possíveis enfermidades. Em um dos poucos estudos que
11 buscaram avaliar o impacto desses manejos, Nakao et al. (1994) relatam que a
12 realização de vaginoscopia durante 1,5 min em vacas, não induz resposta significativa
13 nos níveis de cortisol. Já a palpação do útero e ovários por via transretal, por quatro
14 min, induziu uma elevação do cortisol plasmático 10 min após (12 ng/mL), retornando
15 aos níveis basais aos 25 min (8 ng/mL; Tabela 1).

16 Entre as biotécnicas reprodutivas, a inseminação artificial (IA) é utilizada com
17 maior frequência para multiplicar a genética de animais geneticamente superiores,
18 sendo que as taxas de prenhez podem ser afetadas pelo estresse. Conforme descrito por
19 Nakao et al. (1994), a IA transcervical é considerada um manejo estressor aos bovinos,
20 uma vez que provoca um pico de cortisol (12 ng/mL) já aos cinco minutos após a IA,
21 retornando ao valor basal (8 ng/mL) em 25 min. Em vacas de corte submetidas à IA em
22 tempo fixo (IATF), a inserção de dispositivos intravaginais induz à tentativas de
23 expulsão, sendo identificado um pico de cortisol (8,8 ng/mL) após cinco horas,
24 retornando aos níveis basais (1,3 ng/mL) em sete horas (LONG et al., 2011). Na IA

1 cervical em ovelhas, Houdeau et al. (2002) observaram uma elevação de cortisol
2 durante os 30 min após o procedimento, não sendo observado efeito do grau de
3 dificuldade para IA. Os autores utilizaram os valores da primeira coleta de sangue como
4 referência, sem grupo controle, não sendo possível isolar o efeito da IA sobre o cortisol.

5 Em ovinos, ao nosso conhecimento, foi apenas avaliado o impacto da
6 laparoscopia isoladamente, sem IA. Os níveis plasmáticos de cortisol apresentam um
7 aumento transitório (60 ng/mL) quatro horas após a realização de uma única
8 laparoscopia, diminuindo às oito horas. Quando uma segunda laparoscopia foi realizada,
9 12 h após a primeira, os valores do cortisol aumentaram imediatamente e não
10 retornaram aos valores basais, mantendo-se entre 70 e 100 ng/mL até a última
11 avaliação, às 36 h (MARTIN et al., 1981). Além de não ter sido realizada a IA, todos os
12 animais foram submetidos à laparoscopia, não havendo um grupo controle. Stafford et
13 al. (2006) demonstram que a administração de detomidina (analgésico e sedativo) 20
14 min antes da laparoscopia inibe a elevação de cortisol. O uso de sedação com
15 acepromazina causa elevação do cortisol plasmático até 20 min, e retorna aos níveis pré-
16 tratamento logo após. Os autores avaliaram apenas os efeitos imediatos da laparoscopia,
17 sem IA, e amostras de sangue foram coletadas apenas até três horas após a intervenção.
18 Por ser um procedimento cirúrgico, avaliações durante o período pós-operatório são
19 necessárias.

20 Embora menos frequentes que a IA, biotécnicas para produção de embriões *in*
21 *vitro* e *in vivo* são utilizadas em ruminantes. A aspiração folicular dos ovários (*ovum*
22 *pick-up*; OPU), guiada por ultrassonografia transvaginal, objetiva a obtenção de oócitos
23 para posterior produção de embriões bovinos *in vitro*. Embora executada após anestesia
24 epidural à base de lidocaína, representa um procedimento potencialmente estressante.

1 Em novilhas, o nível de cortisol, que apresentava valor médio de 5,7 nmol/L antes do
2 procedimento, aumentou significativamente após a contenção e realização da epidural.
3 O cortisol se manteve elevado até 10 min após a OPU (média de 46 nmol/L). As fêmeas
4 pararam a ingestão durante a contenção e apresentaram desconforto no momento da
5 inserção da agulha para anestesia, sem vocalizações ou ataxia (PETYIM et al., 2007).
6 Os níveis de cortisol em vacas submetidas à duas punções semanais (durante oito
7 semanas) aumentaram após cada sessão, mesmo nos animais controle, que passavam
8 pela contenção, anestesia e introdução da sonda, com exceção apenas da introdução da
9 agulha no ovário (CHASTANT-MAILLARD et al., 2003), sugerindo que o manejo é
10 mais estressante que o procedimento em si.

11 Durante a inovulação de embriões, Kasimanickam et al. (2018) observaram que
12 vacas receptoras com temperamento agitado apresentam taxas inferiores de prenhez,
13 havendo uma correlação positiva entre temperamento agitado e os níveis de cortisol e
14 substância P. O uso de flunixin meglumine no momento da inovulação foi capaz de
15 melhorar a taxa de prenhez nestas receptoras. Não é possível afirmar se os resultados
16 são decorrentes do menor desconforto ou da inibição da luteólise, pelo efeito do anti-
17 inflamatório. Entretanto, o estudo demonstra claramente que a identificação de pontos
18 críticos e o uso de estratégias para minimizar o desconforto podem trazer benefícios
19 para os animais, produtores e técnicos.

20 Os procedimentos de coleta e inovulação de embriões em ovelhas são mais
21 complexos que na vaca, uma vez que a cérvix apresenta anéis tortuosos e se estreita
22 conforme se aproxima do útero, dificultando o acesso. Para contornar esse problema,
23 normalmente se utiliza o acesso ao útero através de laparotomia. Ao avaliar o efeito de
24 dois diferentes métodos de recuperação embrionária em ovinos (laparotomia vs.

1 transposição cervical) sobre os níveis de marcadores inflamatórios, Oliveira et al.
2 (2018) concluíram que, embora a transposição cervical seja menos invasiva, ambos
3 métodos induzem uma reação inflamatória. Não houve diferença entre os métodos em
4 relação à haptoglobina, proteína total, fibrinogênio e PON1. Entretanto, após a
5 realização de ambos procedimentos, houve acréscimo de haptoglobina, a partir de três
6 até seis dias, e da proteína total, nove dias após o procedimento.

7

8 **Conclusão**

9 Embora vários marcadores de estresse, dor e reação inflamatória estejam
10 validados, poucos estudos investigaram o efeito da realização de manejos reprodutivos
11 sobre os mesmos. Mesmo sabendo-se das limitações e da variabilidade, o cortisol é o
12 mais utilizado para inferir sobre situações estressantes, porém, indica-se a inclusão de
13 grupo controle para considerar o efeito dos procedimentos de contenção e coleta de
14 sangue. O uso combinado de diferentes marcadores possibilita uma determinação mais
15 precisa do impacto dos manejos sobre os animais. Uma vez conhecidos os
16 procedimentos e momentos mais críticos, novas abordagens poderão ser desenvolvidas
17 para minimizar o desconforto.

18

19 **Referências**

20 ARTHINGTON, J., et al. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein
21 response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. **Journal of Animal Science**,
22 v.81, n.5, p.1120-1125. 2003.

23 BALET, L., et al. Immunization against gonadotropin-releasing hormone in dairy cattle:
24 Antibody titers, ovarian function, hormonal levels, and reversibility. **Journal of Dairy Science**,

- 1 v.97, n.4, p.2193-2203. 2014. Disponível em:
2 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214001350>>. Acesso em. doi:
3 <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7602>.
- 4 BENNETT, R. M.; R. J. BLANEY. Estimating the benefits of farm animal welfare legislation
5 using the contingent valuation method. **Agricultural Economics**, v.29, n.1, p.85-98. 2003.
- 6 BIONAZ, M., et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in
7 transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.4, p.1740-1750. 2007.
- 8 BLACHE, D.; S. K. MALONEY. New physiological measures of the biological cost of
9 responding to challenges. **Advances in Sheep Welfare**, v.1, p.73-104. 2017.
- 10 BRETSCHEIDER, G. Effects of age and method of castration on performance and stress
11 response of beef male cattle: A review. **Livestock Production Science**, v.97, n.2, p.89-100.
12 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301622605001429>>.
13 Acesso em. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.04.006>.
- 14 CAPUCILLE, D. J., et al. Castration in cattle: techniques and animal welfare issues.
15 **Compendium**, v.24, n.9, p.66-73. 2002.
- 16 CARROLL, J. A., et al. Differential acute phase immune responses by Angus and Romosinuano
17 steers following an endotoxin challenge. **Domest Anim Endocrinol**, v.41, n.4, p.163-73. 2011.
18 Disponível em: em. doi: 10.1016/j.domaniend.2011.06.002.
- 19 CARROLL, J. A., et al. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous
20 bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immunity**, v.15, n.2, p.81-89. 2009.
21 Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1753425908099170>>. Acesso
22 em. doi: 10.1177/1753425908099170.
- 23 CECILIANI, F., et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v.75, n.14,
24 p.4207-4231. 2012. Disponível em:
25 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912002102>>. Acesso em. doi:
26 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.004>.
- 27 CHASTANT-MAILLARD, S., et al. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-

- 1 being in cows. **Reproduction**, v.125, n.4, p.555-563. 2003.
- 2 COETZEE, J. F., et al. Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after
3 castration or simulated castration. **American journal of veterinary research**, v.69, n.6, p.751-
4 762. 2008.
- 5 COHEN, R., et al. Efficacy and stress of chemical versus surgical castration of cattle. **Canadian**
6 **Journal of Animal Science**, v.70, n.4, p.1063-1072. 1990.
- 7 DAMIÁN, J.; R. UNGERFELD. The stress response of frequently electroejaculated rams to
8 electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural
9 parameters. **Reproduction in domestic animals**, v.46, n.4, p.646-650. 2011.
- 10 DE CAMPOS, F. T., et al. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on
11 serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine
12 dominant follicle. **Theriogenology**, v.89, p.244-249. 2017. Disponível em:
13 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.013>>. Acesso em: 2018/03/15. doi:
14 10.1016/j.theriogenology.2016.11.013.
- 15 EARLEY, B.; M. CROWE. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia
16 during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological, and inflammatory
17 responses. **Journal of Animal Science**, v.80, n.4, p.1044-1052. 2002.
- 18 ECKERSALL, P. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. **Comparative**
19 **Haematology International**, v.5, n.2, p.93-97. 1995.
- 20 ECKERSALL, P. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring
21 animal health, animal welfare and food safety. **Irish Veterinary Journal**, v.53, n.6, p.307-311.
22 2000.
- 23 ECKERSALL, P. D., et al. Acute phase protein response in an experimental model of ovine
24 caseous lymphadenitis. **BMC veterinary research**, v.3, n.1, p.35. 2007.
- 25 EMIR, L., et al. Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: A
26 minimally invasive method. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.26,
27 n.4, p.392-396. 2008. Disponível em:

- 1 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1078143907001378>>. Acesso em:
2 01/02/2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2007.05.013>.
- 3 ESHRAGHI, H. R., et al. The release of bradykinin in bovine mastitis. **Life Sciences**, v.64,
4 n.18, p.1675-1687. 1999. Disponível em:
5 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320599001058>>. Acesso em. doi:
6 [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00105-8).
- 7 FISHER, A., et al. Effects of surgical or banding castration on stress responses and behaviour of
8 bulls. **Australian Veterinary Journal**, v.79, n.4, p.279-284. 2001.
- 9 GABAY, C.; I. KUSHNER. Acute-phase proteins and other systemic responses to
10 inflammation. **New England journal of medicine**, v.340, n.6, p.448-454. 1999.
- 11 GONZÁLEZ, L. A., et al. Pain mitigation after band castration of beef calves and its effects on
12 performance, behavior, Escherichia coli, and salivary cortisol. **Journal of Animal Science**,
13 v.88, n.2, p.802-810. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1752>>. Acesso
14 em: 01/02/2018. doi: 10.2527/jas.2008-1752.
- 15 HAYASHI, S. A., et al. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and α 1-acid
16 glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. **Veterinary**
17 **research communications**, v.25, n.2, p.117-120. 2001.
- 18 HEID, A.; U. HAMM. Animal welfare versus food quality: Factors influencing organic
19 consumers' preferences for alternatives to piglet castration without anaesthesia. **Meat Science**,
20 v.95, n.2, p.203-211. 2013. Disponível em:
21 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174013001757>>. Acesso em. doi:
22 <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.052>.
- 23 HORADAGODA, N., et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and
24 chronic inflammation. **The Veterinary Record**, v.144, n.16, p.437-441. 1999.
- 25 HOUDEAU, E., et al. Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical
26 artificial insemination in the ewe. **Reproduction Nutrition Development**, v.42, n.4, p.381-392.
27 2002.

- 1 KAJIKAWA, T., et al. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, α 1-acid
2 glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation
3 and surgery. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.68, n.1, p.91-98. 1999.
- 4 KANEKO, J. J., et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**: Academic press. 2008
- 5 KASIMANICKAM, R., et al. Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient
6 beef cows with an excitable temperament. **Theriogenology**, v.107, p.70-77. 2018. Disponível
7 em: em. doi.
- 8 KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**,
9 v.148, n.4, p.279-282. 1992.
- 10 KENT, J. E., et al. Changes in plasma cortisol concentration in lambs of three ages after three
11 methods of castration and tail docking. **Research in Veterinary Science**, v.55, n.2, p.246-251.
12 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003452889390088W>>.
13 Acesso em. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90088-W](http://dx.doi.org/10.1016/0034-5288(93)90088-W).
- 14 LESTER, S., et al. Cortisol responses of young lambs to castration and tailing using different
15 methods. **New Zealand Veterinary Journal**, v.39, n.4, p.134-138. 1991.
- 16 LESTER, S. J., et al. Behavioural and cortisol responses of lambs to castration and tailing using
17 different methods. **New Zealand Veterinary Journal**, v.44, n.2, p.45-54. 1996. Disponível em:
18 <<https://doi.org/10.1080/00480169.1996.35933>>. Acesso em. doi:
19 10.1080/00480169.1996.35933.
- 20 LONG, S., et al. Plasma Cortisol Concentrations after CIDR Insertion in Beef Cows.
21 **Reproduction in domestic animals**, v.46, n.1, p.181-184. 2011.
- 22 MARTIN, G. B., et al. Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the
23 preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe. **Theriogenology**, v.16, n.1, p.39-44. 1981.
24 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X81901114>>.
25 Acesso em. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(81\)90111-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(81)90111-4).
- 26 MELCHES, S., et al. Castration of lambs: A welfare comparison of different castration
27 techniques in lambs over 10 weeks of age. **The Veterinary Journal**, v.173, n.3, p.554-563.

- 1 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023306000165>>.
- 2 Acesso em. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.01.006>.
- 3 MELLOR, D. Operational Details of the Five Domains Model and Its Key Applications to the
- 4 Assessment and Management of Animal Welfare. **Animals**, v.7, n.8, p.60. 2017. Disponível em:
- 5 <<http://www.mdpi.com/2076-2615/7/8/60>>.
- 6 MELLOR, D. J.; K. J. STAFFORD. Acute castration and/or tailing distress and its alleviation in
- 7 lambs. **New Zealand Veterinary Journal**, v.48, n.2, p.33-43. 2000. Disponível em:
- 8 <<http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2000.36156>>. Acesso em. doi:
- 9 10.1080/00480169.2000.36156.
- 10 MINUTI, A., et al. Assessment of gastrointestinal permeability by lactulose test in sheep after
- 11 repeated indomethacin treatment. **Journal of Animal Science**, v.91, n.12, p.5646-5653. 2013.
- 12 MOLONY, V., et al. Behavioural responses of lambs of three ages in the first three hours after
- 13 three methods of castration and tail docking. **Research in Veterinary Science**, v.55, n.2, p.236-
- 14 245. 1993. Disponível em:
- 15 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003452889390087V>>. Acesso em. doi:
- 16 [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90087-V](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90087-V).
- 17 MOLONY, V., et al. Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration
- 18 of calves. **Applied Animal Behaviour Science**, v.46, n.1, p.33-48. 1995. Disponível em:
- 19 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168159195006354>>. Acesso em. doi:
- 20 [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00635-4](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591(95)00635-4).
- 21 MURATA, H.; T. MIYAMOTO. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the
- 22 sera of transported calves. **British Veterinary Journal**, v.149, n.3, p.277-283. 1993. Disponível
- 23 em: em. doi.
- 24 NAKAO, T., et al. Plasma cortisol response in dairy cows to vaginoscopy, genital palpation per
- 25 rectum and artificial insemination. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.41, n.1- 10,
- 26 p.16-21. 1994.
- 27 NEGRÃO, J. A., et al. Cortisol in Saliva and Plasma of Cattle After ACTH Administration and

- 1 Milking. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.6, p.1713-1718. 2004. Disponível em:
2 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020473324X>>. Acesso em. doi:
3 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73324-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73324-X).
- 4 OLIVEIRA, F., et al. Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical
5 embryo collection. **Small Ruminant Research**, v.158, p.15-18. 2018.
- 6 OLIVEIRA, F. C., et al. Chemical castration in cattle with intratesticular injection of sodium
7 chloride: Effects on stress and inflammatory markers. **Theriogenology**, v.90, p.114-119. 2017.
8 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16305751>>.
9 Acesso em. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.001>.
- 10 ORIHUELA, A., et al. Breaking down the effect of Electro-Ejaculation on the serum cortisol
11 response, heart and respiratory rates in hair sheep (*Ovis aries*). **Journal of Animal and**
12 **Veterinary Advances**, v.8, n.10, p.1968-1972. 2009.
- 13 PALME, R., et al. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic
14 livestock. **Animal Reproduction Science**, v.43, n.1, p.43-63. 1996. Disponível em: em. doi.
- 15 PALMER, C. W. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to
16 electroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.469-479. 2005. Disponível em:
17 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05001639>>. Acesso em. doi:
18 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.032>.
- 19 PANG, W., et al. Effect of carprofen administration during banding or burdizzo castration of
20 bulls on plasma cortisol, in vitro interferon- γ production, acute-phase proteins, feed intake, and
21 growth. **Journal of Animal Science**, v.84, n.2, p.351-359. 2006.
- 22 PETERSEN, H. H., et al. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical
23 chemistry. **Veterinary research**, v.35, n.2, p.163-187. 2004.
- 24 PETYIM, S., et al. Ovum Pick- up in Dairy Heifers: Does it Affect Animal Well- being?
25 **Reproduction in domestic animals**, v.42, n.6, p.623-632. 2007.
- 26 PRICE, J.; A. NOLAN. Analgesia of newborn lambs before castration and tail docking with
27 rubber rings. **The Veterinary Record**, v.149, n.11, p.321-324. 2001.

- 1 ROBERTSON, I. S., et al. Effect of different methods of castration on behaviour and plasma
2 cortisol in calves of three ages. **Research in Veterinary Science**, v.56, n.1, p.8-17. 1994.
3 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528894901899>>. Acesso
4 em. doi: [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(94\)90189-9](https://doi.org/10.1016/0034-5288(94)90189-9).
- 5 SPOONER, J. M., et al. Attitudes of Canadian citizens toward farm animal welfare: A
6 qualitative study. **Livestock Science**, v.163, p.150-158. 2014.
- 7 STAFFORD, K. J., et al. Stress caused by laparoscopy in sheep and its alleviation. **New**
8 **Zealand Veterinary Journal**, v.54, n.3, p.109-113. 2006. Disponível em:
9 <<https://doi.org/10.1080/00480169.2006.36621>>. Acesso em. doi:
10 10.1080/00480169.2006.36621.
- 11 UNGERFELD, R., et al. Physiological responses and characteristics of sperm collected after
12 electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands in
13 anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). **Theriogenology**,
14 v.84, n.7, p.1067-1074. 2015. Disponível em:
15 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X15003143>>. Acesso em. doi:
16 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.009>.
- 17 WHITLOCK, B. K., et al. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations
18 of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. **Theriogenology**, v.78, n.4,
19 p.737-746. 2012. Disponível em:
20 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X12001914>>. Acesso em. doi:
21 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.020>.

22

- 1 Tabela 1: Efeito de manejos reprodutivos sobre marcadores sistêmicos de desconforto,
2 inflamação e estresse.

Autores	Manejo reprodutivo	Esp	Principais resultados
Martin et al., 1981	Laparoscopia	Ov	Pico de cortisol de 60 ng/mL após uma laparoscopia e de 70 a 100 ng/mL após duas laparoscopias (intervalo de 12 h).
Cohen et al., 1990	Castração química	B	Menor liberação de cortisol comparada à orquiectomia.
Lester et al., 1991	Castração cirúrgica	Ov	Elevação do cortisol por até 4 h.
Kent et al., 1993	Castração cirúrgica	Ov	Pico de cortisol de 200 nmol/L.
Nakao et al., 1994	Vaginoscopia e palpação retal	B	Pico de cortisol de 12 ng/mL após palpação do útero e ovário.
Robertson et al., 1994	Castração cirúrgica	B	Presença de posturas anormais e níveis de cortisol até 107 nmol/L.
Nakao et al., 1994	IA	B	Pico de cortisol até 12 ng/mL.
Lester et al., 1996	Cast. por AB	Ov	Correlação positiva entre inquietação e níveis de cortisol.
Fisher et al., 2001	Cast. cirúrgica	B	Pico de liberação de haptoglobina de 639 µg/mL.
Houdeau et al., 2002	IA cervical	Ov	Aumento dos níveis de cortisol após 30 min.
Chastant-Maillard et al., 2003	Aspiração folicular	B	Vacas submetidas à OPU não diferiram quanto aos níveis de cortisol e leucograma em comparação às fêmeas controle.
Stafford et al., 2006	Laparoscopia	Ov	Detomidina inibe a elevação de cortisol em comparação com ovelhas sedadas com acepromazina.
Pang et al., 2006	Castração por AB	Ov	Elevação dos níveis de haptoglobina após três dias.
Melches et al., 2007	Castração por AB	Ov	Castração cirúrgica induz a maior elevação de cortisol em comparação à AB e emasculador. AB gera reação à palpação até 30 dias após.
Petyim et al., 2007	Aspiração folicular	B	Aumento dos níveis de cortisol até 46 nmol/L.

Orihuela et al., 2009	Eletroejaculador	Ov	A elevação de cortisol e da frequência cardíaca são resultantes do estímulo elétrico, e não do manejo.
González et al., 2010	Castração com cinta elástica	B	Xilazina epidural e flunixin e.v. inibem a elevação de cortisol salivar. Dor crônica não acompanhada por alterações de cortisol.
Long et al., 2011	IATF	B	Tentativa de expulsão do DIV e aumento do cortisol (8,8 ng/mL).
Damián & Ungerfeld, 2011	Eletroejaculador	Ov	Pico de cortisol de 2,5 µg/dL, aumento da PPT até 6,3 g/dL e presença de vocalizações.
Whitlock et al., 2012	Eletroejaculador	B	Pico de cortisol superior a 100 nmol/L e presença de vocalizações.
Ungerfeld et al., 2015	Eletroejaculador	Ov	Aumento do cortisol em relação à massagem das glândulas acessórias.
Oliveira et al., 2017	Castração cirúrgica	B	Elevação do cortisol até 60 min e aumento da temperatura escrotal.
Oliveira et al., 2017	Castração química	B	Pico de cortisol de 1,8±0,2 µg/dL apenas após 30 min.
Oliveira et al., 2018	TE	Ov	Acréscimo da haptoglobina de três a seis dias e da PPT após nove dias.
Kasimanickam et al. 2018	TE	B	Correlação positiva entre cortisol e substância P em receptoras de embrião.

-
- 1 Siglas: Esp: espécie; IA: inseminação artificial; Ov: ovino; B: bovino; AB: anel de
2 borracha; IATF: IA em tempo fixo; TE: transferência de embriões; DIV: dispositivo
3 intravaginal; PPT: proteína plasmática total.

2.2 Artigo 2

Intratesticular injection of sodium chloride for chemical castration in lambs: effects on testicular parenchyma and on stress and inflammation markers

V.G.G. Costa; J.H. Dias; F.C. Oliveira; S.F. Vargas Jr.; C.S. Haas; A.D. Vieira;
R.G. Mondadori; T. Lucia Jr; B.G. Gasperin

Será submetido à revista *Small Ruminant Research*

Intratesticular injection of sodium chloride for chemical castration in lambs: effects on testicular parenchyma and on stress and inflammation markers

V.G.G. Costa¹, J. H. Dias¹, F. C. Oliveira¹, S. F. Vargas Jr.¹, C. S. Haas¹, A. D. Vieira¹, R. G. Mondadori¹, T. Lucia Jr.¹, B. G. Gasperin^{1*}

¹Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Campus Universitário S/N, 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil.

*Correspondence author: bggasperin@gmail.com

Abstract

Castration is commonly performed in lambs to avoid undesired pregnancies, facilitate handling and to enhance meat quality. However, few studies have investigated alternative methods and the impact of the procedures on the animals. The objectives of the present study were: to assess the suitability of intratesticular injection (ITI) of a hypertonic solution of sodium chloride (NaCl) associated to anesthetic and analgesic to promote chemical castration; and to evaluate the impact of ITI on hematological and stress parameters. Eleven lambs were allocated in two groups: ITI (n = 5) and control (C; n = 6). No significant effects of procedure were observed on red blood cells (hematocrit and number of red blood cells), total plasma protein levels, cortisol levels and leucogram (number of white blood cells, lymphocytes, segmented neutrophils and neutrophil-to-lymphocyte ratio). Increased fibrinogen levels were observed in animals from ITI group on D3 after procedure. No significant differences in daily weight gain were observed. The ITI procedure was not

1 efficient in inhibiting testis development, although it induced focal inflammation,
2 alterations in basement membrane integrity and necrosis. In conclusion, the ITI
3 of NaCl does not represent a suitable alternative for lamb castration. The
4 potential contraceptive method did not significantly alter most of the blood
5 parameters evaluated.

6 **Key words:** animal welfare, castration, lambs, stress.

7

8 1. Introduction

9 There is an increasing worldwide concern about food safety and, when
10 the products are derived from animals, the consumers require that they are
11 produced respecting animal welfare (Heid and Hamm, 2013). In the extensive
12 milk, meat or wool production systems, the presence of pubertal animals
13 increases the risk of undesired pregnancies. Furthermore, reproductive
14 hormones, such as testosterone, increase aggressiveness and alter meat
15 characteristics. To avoid all these issues, the animals are usually castrated
16 during the first weeks of life (Fahmy et al., 1999).

17 In sheep production systems, an efficient technique to castrate male
18 lambs is the use of rubber rings above the scrotum, which induces ischemia
19 and, consequently, tissue necrosis. Although the technique is efficient, fast and
20 easy to perform, it induces acute discomfort and, in some cases, later
21 complications as a consequence of myiasis and infection (Melches et al., 2007),
22 being restricted in some countries. Other techniques, such as orchiectomy and
23 the use of emasculator, are also efficient and widely used, but they also induce

1 changes in animal behavior and increase cortisol levels, indicating pain and
2 stress (Kent et al., 1993; Molony et al., 1995; Melches et al., 2007).

3 As an alternative, the use of intratesticular injection (ITI) of hypertonic
4 solutions was proven efficient in promoting sterility in different species such as
5 goats, water buffaloes, rats, dogs and cats (Jana et al., 2005; Jana and
6 Samanta, 2006; Jana and Samanta, 2007; Jana and Samanta, 2011; Martins et
7 al., 2011b), through the injection of calcium chloride (CaCl), and in rats and
8 cattle (Emir et al., 2008; Neto et al., 2014), using sodium chloride (NaCl).
9 Similarly, other sclerosing agents such as lactic acid (Fordyce et al., 1989),
10 ethanol (Canpolat et al., 2006) and calcium gluconate (Soto et al., 2007) were
11 efficient in promoting testicular parenchyma disorganization, representing non-
12 toxic and inexpensive alternatives. Thus, ITI is a potential technique to promote
13 sterilization, although its use has not been reported in lambs. Furthermore,
14 studies are necessary to investigate whether ITI is advantageous to the animals
15 since it involves inducing local inflammation.

16 The efficiency of ITI using NaCl seems to be related to the age of the
17 animals, since in cattle it was more efficient in calves during the first three
18 weeks of life (Neto et al., 2014), probably because of the reduced size of the
19 testis. Bretschneider (2005) states that castration during the first weeks of life
20 minimize the stress, decreasing significant weight losses. In most farms, the
21 use anesthetic and analgesic for pain relief is not common (Coetzee et al.,
22 2010), because it takes time to get the desired effects and due to the costs of
23 the products. However, the ITI technique would allow the addition of anesthetic
24 and analgesic to the hypertonic solution. According to Mellor and Stafford

1 (2000), the farmers should be encouraged to use efficient and affordable
2 techniques that cause minimal discomfort to the animals.

3 Based on the above mentioned, we have formulated the hypothesis that
4 intratesticular injection of NaCl associated to local anesthetic and analgesic is
5 efficient in promoting sterility, in a minimally invasive way. Thus, the objectives
6 of the present study were: to investigate the viability of ITI of NaCl in promoting
7 chemical castration; and to evaluate the impact of the ITI procedure on
8 hematologic parameters and cortisol levels.

9

10 2. Materials and methods

11

12 Experimental design

13 All the procedures were approved by the *Ethics Commission in Animal*
14 *Experimentation, Federal University of Pelotas (CEEAA/UFPel; protocol 2720)*.
15 Eleven healthy male lambs, aged up to three weeks, were allocated in two
16 experimental groups: control (C; n=6), composed by non-castrated animals; and
17 ITI group (n=5), composed by animals submitted to intratesticular injection. The
18 animals were gently restrained before performing blood collection and the
19 experimental procedures. The ITI was performed using a 30 x 0.7 mm
20 hypodermic needle, being administered approximately 0.5 mL of solution per
21 testis, being the volume adjusted according to individual size, to avoid testis
22 rupture. The hypertonic solution was performed diluting 200 mg/mL NaCl
23 (Synth®, SP, Brazil) in ultrapure water containing anesthetic and analgesic. The

1 solution was filtered using syringe filters with a 0.22 µm pore size and kept in
2 sterile glass flasks at room temperature.

3 Approximately 45 days after the procedures, five animals (one from
4 control group and four from ITI group) were submitted to surgical orchiectomy
5 under local anesthesia. After trichotomy, skin antisepsis was performed with
6 iodine-alcohol. Before orchiectomy, each spermatic cord was ligated.

7 Local anesthesia was performed with 2% lidocaine infiltration in the site
8 of incision and in the spermatic cords (for orchiectomy) or bupivacaine 0.25%
9 (ITI). After the procedures, the animals were administered the analgesic flunixin
10 meglumine (2.2 mg/kg). An oxytetracycline (20 mg/kg) injection was
11 administered after orchiectomy.

12

13 Blood samples collection

14 Blood samples were collected by jugular venipuncture using Vacutainer®
15 needles (BD Vacutainer®, SP, Brazil) and tubes with anticoagulant for
16 assessing hematological parameters, and without anticoagulant for serum
17 cortisol evaluation.

18

19 Cortisol

20 Serum cortisol levels were assessed at different time points: before the
21 experiment (D0), 5 h after procedure (D1) and on D2 and D3. Samples were
22 centrifuged at 3,000 rpm/10 min to obtain the serum samples, which were sent
23 to a private laboratory where cortisol levels were quantified through

1 electrochemiluminescence assay (Cortisol II Cobas; Roche Diagnostics,
2 Germany; REF 06687733). The inter and intra-assay coefficients of variation
3 were below 10%.

4 5 Hematologic parameters

6 Blood samples to evaluate the erythrogram and leukogram were
7 obtained at three time-points: before the experiment (D0), and on D2 and D3.
8 Samples were also collected seven days after the procedure to ensure that the
9 animals were healthy. It was evaluated the hematocrit (HT), the number of red
10 blood cells (RBC), the number of white blood cells (WBC), total plasma protein
11 (TPP), fibrinogen, the number of lymphocytes, band and segmented
12 neutrophils, neutrophil-to-lymphocyte ratio (N:L), basophils, eosinophils and
13 monocytes.

14 Samples were diluted 1:500 for total leukocytes count and 1:49,999 for
15 red blood cells count in DA-500 (CELM, SP, Brazil). Cells were counted in an
16 automatic cell counter (CC-530, CELM, SP, Brazil). Then, blood smears were
17 performed and stained with Romanowsky stain (Panótico Rápido; LaborClin®,
18 PR, Brazil) and 100 cells were counted under an optic microscope (Nikon®
19 Eclipse E200, Japan) to assess the differential leukocyte count.

20 To determine the hematocrit, total plasma protein and fibrinogen (FIB)
21 levels, samples were centrifuged in micro-hematocrit capillary tubes at
22 18,000xg/5min. From the serum obtained after centrifugation, it was obtained
23 the total plasma protein, which was measured by refractometry. Immediately

1 after, the fibrinogen levels were determined through heat precipitation, also
2 using a refractometer.

3

4 Testicular histology

5 Testicles obtained after orchiectomy were immediately fixed in 10%
6 formaldehyde. A fragment of each sample was dehydrated in decreasing
7 concentrations of ethanol, clarified in xylene and then embedded in paraffin.
8 The tissues were sectioned in a microtome (RM2245, Leica Biosystems, San
9 Diego, CA, USA) and the sections (5 μ m) were mounted on slides. Finally, part
10 of the slides was stained with hematoxylin and eosin (HE) to evaluate the
11 integrity of seminiferous tubules and the presence of inflammatory cells and/or
12 necrosis. Some slides were also stained with periodic acid-schiff (PAS) to
13 evaluate basement membrane integrity. The slides were evaluated under an
14 optical microscope.

15

16 Statistical analysis

17 The assessment of group (G), time (T) and interaction (GxT) effects on
18 cortisol levels and hematologic parameters was performed as repeated
19 measures data and analyzed using the MIXED procedure (SAS). Continuous
20 data were tested for normal distribution and normalized, when necessary. TPP
21 levels were rank transformed for analysis. The daily weight gain and the

1 neutrophil-to-lymphocyte ratio was compared through ANOVA. The significance
2 was set at $P < 0.05$ and data are shown as average \pm standard error.

3 4 3. Results

5 Cortisol levels tended ($P = 0.08$) to be affected by group, whereas a
6 significant time effect ($P = 0.007$), was observed. According to Jackson and
7 Cockcroft (2007b), cortisol levels were within the reference values for sheep
8 ($1.40 - 3.1 \mu\text{g/dL}$).

9 The mean values obtained for hematologic parameters were within the
10 reference values for sheep, HT = 27-45%, RBC = $9-15 \times 10^6$ cells/ μl , TPP = 6-
11 7,9 g/dL and FIB = 200-500 mg/dL (Jackson and Cockcroft, 2007a), except for
12 FIB. There was a significant time ($P = 0.02$) and group ($P = 0.04$) effect for HT.
13 Only a time effect was observed for TPP ($P < 0.0001$) and RBC ($P = 0.04$; Fig. 2).
14 There was a significant group ($P = 0.04$) and group*time interaction ($P = 0.007$) for
15 FIB. On D3, significantly higher levels of FIB were observed in ITI compared to
16 control group.

17 It was not possible to evaluate band neutrophils, basophils, eosinophils
18 and monocytes, because a significant proportion of the animals, regardless of
19 the group, did not present those cells. It was observed a time effect for
20 lymphocytes ($P = 0.02$; Fig. 3), whereas no significant effect on segmented
21 neutrophils was observed (Fig. 3). The neutrophil-to-lymphocyte ratio did not
22 differ ($P > 0.05$) between groups on D2 (0.48 ± 0.1 and 0.5 ± 0.1 , for C and ITI,
23 respectively) and D3 (0.42 ± 0.1 and 0.5 ± 0.1 , for C and ITI, respectively). The
24 mean values for number of white blood cells ($4,000 - 12,000/\mu\text{l}$), lymphocytes

1 (2,000–9,000/ μ l) and neutrophils (700–6,000/ μ l) were within the reference
2 values for sheep (Jackson and Cockcroft, 2007a). In the end of the evaluation
3 period (seven days after procedures) all the animals were healthy, based on
4 hematologic parameters.

5 The average weight gain (AWG) from 24 to 72 h after procedures did not
6 differ between groups ($P>0.05$), being observed 166 ± 50 g/day for C and $140 \pm$
7 35 g for ITI. Likewise, the AWG from D3 to D7 was 170 ± 20 g/day for C and
8 208 ± 80 g/day for ITI, which did not differ from each other.

9 It was observed that only one testicle (out of 8), from ITI animals
10 underwent atrophy, which was considerably smaller than the others and with a
11 firm consistency. Although the other testicles were visually normal for the age,
12 similar to those from C group, after histological evaluation it was observed that
13 ITI induced focal inflammatory cells infiltration. Furthermore, it was observed the
14 substitution of testicular parenchyma by connective tissue, coagulative necrosis
15 of seminiferous tubules and basement membrane rupture in some areas,
16 compared to C group, which presented normal testicular parenchyma (Fig. 4).

17

18 4. Discussion

19 In the present study, it was investigated the efficacy of the intratesticular
20 injection of sodium chloride as an alternative for castration in lambs. Although
21 ITI was efficient in several species, it was observed that the development of
22 only one testis was impaired and that ITI induced alterations only in the sites of
23 injection. The ITI injection of NaCl in rats induced complete coagulative

1 necrosis, with mild testicular atrophy. However, the treatment did not induce
2 infection, skin necrosis or edema, suggesting that the procedure, besides
3 minimally invasive, is efficient (Emir et al., 2008). In cattle, ITI also induced
4 infertility, especially when performed during the first 20 days of life (Neto et al.,
5 2014). When CaCl was used for ITI in rats, the histopathological evaluation of
6 testes revealed the presence of giant multinuclear cells in seminiferous tubules
7 with leukocytes infiltration and connective tissue deposition. The infertility was
8 confirmed by the absence of sperm cells in the uterus of the females after
9 mating (Jana and Samanta, 2006). In goats, the same CaCl solution induced
10 testicular necrosis (Jana et al., 2005).

11 Besides the species-specific differences in the number and dimension of
12 seminiferous tubules, which influence testicular size and sperm production, the
13 amount of connective tissue in the testes also varies among mammals (Russell
14 et al., 1993). Furthermore, among other possible explanations for the
15 inefficiency of the technique in lambs, it is possible that the abundant scrotum
16 tissue and, by the other side, the reduced size of the testicles, are obstacles for
17 the uniform administration of the NaCl solution. It is important to highlight that
18 the reduced size of the testicles is convenient, because the stress induced by
19 castration is negatively associated to the size of the testicles (Mellor et al.,
20 1991).

21 Although there are no specific markers of pain and stress (Ceciliani et al.,
22 2012), since the simple restraint and blood collection procedures can induce
23 alterations in some parameters (Alam and Dobson, 1986), cortisol levels are
24 commonly used to indicate stressful situations after different procedures in

1 animals. In the present study the cortisol levels only tended to be affected by
2 treatment, whereas a significant effect of the time was observed, which may be
3 a consequence of handling the animals. Oliveira et al. (2017) did not observe
4 significant differences in cortisol levels in calves submitted to surgical or
5 chemical (NaCl, ITI) castration compared to control. However, it was observed
6 an effect of the time, with an increase on cortisol levels 30 min after ITI,
7 returning to previous values around 60 min after procedure. It is important to
8 highlight that, in the present study, an acute effect of the procedure on cortisol
9 levels cannot be ruled out because Jongman et al. (2016) observed that plasma
10 cortisol levels increased in lambs castrated with rubber rings, compared to
11 control, from 30 to 180 min after procedure.

12 Regarding blood parameters, contrary to our findings, it was expected a
13 differential regulation between groups, because inflammation and/or stress
14 response results in a cascade of reactions, including modification of blood cells.
15 To increase body oxygenation, cortisol together with catecholamines, in
16 response to epinephrine in the acute stress, induce spleen contractions,
17 increasing the number of circulating erythrocytes (Marco and Lavin, 1999).
18 Furthermore, in the acute inflammatory response, the increased cortisol
19 secretion induces muscular proteolysis, aiming to increase the free amino acids
20 availability for acute phase proteins (APP) production (Abcouwer et al., 1995).
21 The increased fibrinogen levels observed after ITI suggest an inflammatory
22 response, since it is known to occur around two days after stimulus and is
23 supposed to be a better marker of inflammation than leukocyte alterations
24 (Jones and Allison, 2007).

1 In response to a stressful situation, the leukogram is also affected, being
2 observed an initial increase in neutrophils, followed by a decrease in
3 lymphocyte release as a consequence of the increase in cortisol, due to its anti-
4 inflammatory effect (Dhabhar et al., 1994). During the course of inflammation in
5 ruminants, it is also observed neutropenia, which induces a decrease in the
6 neutrophil-to-lymphocyte ratio (N:L), 24 to 48 h after the initial stimulus (Jones
7 and Allison, 2007), which was not observed in the present study. In accordance
8 with our findings, Paull et al. (2012) did not observe significant differences in
9 N:L ratio in lambs castrated using rubber ring, compared to control animals.
10 However, to our knowledge, the effect of ITI on white blood cells in lambs had
11 not been previously evaluated.

12 A possible explanation for the absence of alteration in most of the
13 hematologic parameters, could be the fact that only a transitory increase in
14 cortisol levels was observed, being the values within the reference values for
15 sheep (Jackson and Cockcroft, 2007b). Furthermore, the magnitude of the
16 effect of stress on the leucogram in ruminants is less than in other species
17 (Jones and Allison, 2007).

18 Behavioral responses are commonly used as indicators of pain in lambs,
19 and previous studies have proved that different castration methods cause
20 different discomfort-related reflexes (Molony et al., 2002; Stewart et al., 2014;
21 Futro et al., 2015). For instance, rubber-ring castration induces necrosis of
22 scrotal tissue, taking four to six weeks until the necrotic tissue loss is complete
23 (Mellor and Stafford, 2000), representing a potential long-term discomfort,
24 although abnormal behaviors are usually observed only during the first two

1 hours after procedure. The animals submitted to ITI presented reactions only
2 after needle introduction, as reported in water buffaloes (Martins et al., 2011a),
3 and no significant painful reactions were observed in the subsequent
4 evaluations.

5 Lester et al. (1996) demonstrated that rubber-ring castration induces
6 abnormal behavior and stress in the first two hours after procedure. The same
7 authors observed that cortisol levels in lambs submitted to the procedure
8 returned to basal levels at 4 h after procedure, similarly to results reported by
9 Stewart et al. (2014). However, Paull et al. (2012) observed a biphasic increase
10 in cortisol levels at 90 min and 24 h after rubber-ring castration, suggesting that
11 it is important to consider acute and chronic effects of the procedure. In the
12 present study, seven days after the procedures, the animals from both groups
13 were healthy, according to hematologic parameters.

14 The results of the present study have refuted the hypothesis that ITI is
15 efficient in promoting lamb castration. Therefore, further studies are deemed
16 necessary to find alternatives to minimize the discomfort caused by the well-
17 established and efficient techniques. However, it is important to develop
18 alternatives that are suitable for use under field conditions, allowing wide
19 adoption by the farmers. In this regard, Stewart et al. (2014) reported a mild
20 decrease in lamb's pain response when rubber rings coated with lidocaine were
21 used, suggesting a potential approach to decrease the discomfort. Another
22 alternative would be the infiltration of anesthetics in spermatic cords before
23 applying the rubber ring, which decreases the cortisol levels and some
24 abnormal behaviors (Kent et al., 1998). However, this approach requires a

1 trained technician to perform the procedure, which would represent extra-costs.
2 The administration of anti-inflammatory locally, in the scrotum, also seems to
3 represent a viable alternative to decrease the discomfort (Paull et al., 2012).
4 Finally, the immunocastration using GnRH antigens would be the less invasive
5 technique to promote sterilization, since it is able to block spermatogenesis and
6 promotes testicular atrophy. However, the technique is costly, is usually
7 performed in older animals (around 13 months), and at least two doses are
8 necessary to promote adequate immunization. Furthermore, there is high
9 individual variation in responses to the treatment (Cooper and Larsen, 2006),
10 representing an important limitation in extensive farming, where males and
11 females are raised together.

12

13 5. Conclusion

14 The ITI was not efficient in promoting lamb castration, because it did not
15 inhibit the development of the testicles, although focal alterations were
16 observed in histological sections. The potential contraceptive method did not
17 significantly alter most of the blood parameters evaluated, although a significant
18 increase in fibrinogen levels was observed, suggesting a systemic inflammatory
19 response.

20

21 Funding

22 This research was funded with a scholarship given to the first author by CAPES.

23

24 References

- 1 Abcouwer, S.F., Bode, B.P., Souba, W.W., 1995. Glucocorticoids regulate rat
2 glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. *Journal of*
3 *Surgical Research* 59, 59-65.
- 4 Alam, M., Dobson, H., 1986. Effect of various veterinary procedures on plasma
5 concentrations of cortisol, luteinising hormone and prostaglandin F2 alpha
6 metabolite in the cow. *The Veterinary Record* 118, 7-10.
- 7 Bretschneider, G., 2005. Effects of age and method of castration on
8 performance and stress response of beef male cattle: A review. *Livestock*
9 *Production Science* 97, 89-100.
- 10 Canpolat, I., Gur, S., Gunay, C., Bulut, S., Eroksuz, H., 2006. An evaluation of
11 the outcome of bull castration by intra-testicular injection of ethanol and calcium
12 chloride. *Revue de médecine vétérinaire* 157, 420.
- 13 Ceciliani, F., Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Sauerwein, H., 2012. Acute phase
14 proteins in ruminants. *Journal of Proteomics* 75, 4207-4231.
- 15 Coetzee, J.F., Nutsch, A.L., Barbur, L.A., Bradburn, R.M., 2010. A survey of
16 castration methods and associated livestock management practices performed
17 by bovine veterinarians in the United States. *BMC Veterinary Research* 6, 12-
18 12.
- 19 Cooper, D.W., Larsen, E., 2006. Immunocontraception of mammalian wildlife:
20 ecological and immunogenetic issues. *Reproduction* 132, 821-828.
- 21 Dhabhar, F.S., Miller, A.H., Stein, M., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1994.
22 Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood
23 leukocyte subpopulations. *Brain, behavior, and immunity* 8, 66-79.

- 1 Emir, L., Dadalı, M., Sunay, M., Erol, D., Çaydere, M., Üstün, H., 2008.
2 Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: A
3 minimally invasive method. *Urologic Oncology: Seminars and Original*
4 *Investigations* 26, 392-396.
- 5 Fahmy, M.H., Sairam, M.R., Proulx, J.G., Petit, H.V., Jiang, L.G., Dufour, J.J.,
6 1999. Effect of active immunization against luteinizing hormone on carcass and
7 meat quality of Romanov lambs. *Small Ruminant Research* 34, 87-96.
- 8 Fordyce, G., Beaman, N.J., Laing, A.R., Hodge, P.B., Campero, C., Shepherd,
9 R.K., 1989. An evaluation of calf castration by intra-testicular injection of a lactic
10 acid solution. *Australian Veterinary Journal* 66, 272-276.
- 11 Futro, A., Masłowska, K., Dwyer, C.M., 2015. Ewes direct most maternal
12 attention towards lambs that show the greatest pain-related behavioural
13 responses. *PloS one* 10, e0134024.
- 14 Heid, A., Hamm, U., 2013. Animal welfare versus food quality: Factors
15 influencing organic consumers' preferences for alternatives to piglet castration
16 without anaesthesia. *Meat Science* 95, 203-211.
- 17 Jackson, P., Cockcroft, P., 2007a. Appendix 2: Laboratory Reference Values:
18 Haematology. *Clinical Examination of Farm Animals*, Blackwell Science Ltd.,
19 pp. 302-302.
- 20 Jackson, P., Cockcroft, P., 2007b. Appendix 3: Laboratory Reference Values:
21 Biochemistry. *Clinical Examination of Farm Animals*, Blackwell Science Ltd., pp.
22 303-305.

- 1 Jana, K., Ghosh, D., Samanta, P.K., 2005. Evaluation of single intratesticular
2 injection of calcium chloride for non-surgical sterilization of male goats (*Capra*
3 *hircus*): a dose dependent study. *Anim Reprod Sci* 86.
- 4 Jana, K., Samanta, P.K., 2006. Evaluation of single intratesticular injection of
5 calcium chloride for non-surgical sterilization in adult albino rats. *Contraception*
6 73.
- 7 Jana, K., Samanta, P.K., 2007. Sterilization of male stray dogs with a single
8 intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study.
9 *Contraception* 75, 390-400.
- 10 Jana, K., Samanta, P.K., 2011. Clinical Evaluation of Non-surgical Sterilization
11 of Male Cats with Single Intra-testicular Injection of Calcium Chloride. *BMC*
12 *Veterinary Research* 7, 39.
- 13 Jones, M.L., Allison, R.W., 2007. Evaluation of the ruminant complete blood cell
14 count. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 23, 377-
15 402, v.
- 16 Jongman, E.C., Borg, S., Hemsworth, P.H., 2016. Assessment of pain
17 responses associated with castration of 10-week-old lambs using the Callicrate
18 'WEE Bander' compared with a standard elastrator. *Applied Animal Behaviour*
19 *Science* 179, 46-52.
- 20 Kent, J.E., Molony, V., Graham, M.J., 1998. Comparison of methods for the
21 reduction of acute pain produced by rubber ring castration or tail docking of
22 week-old lambs. *The Veterinary Journal* 155, 39-51.

- 1 Kent, J.E., Molony, V., Robertson, I.S., 1993. Changes in plasma cortisol
2 concentration in lambs of three ages after three methods of castration and tail
3 docking. *Research in Veterinary Science* 55, 246-251.
- 4 Lester, S.J., Mellor, D.J., Holmes, R.J., Ward, R.N., Stafford, K.J., 1996.
5 Behavioural and cortisol responses of lambs to castration and tailing using
6 different methods. *N Z Vet J* 44, 45-54.
- 7 Marco, I., Lavin, S., 1999. Effect of the method of capture on the haematology
8 and blood chemistry of red deer (*Cervus elaphus*). *Research in veterinary*
9 *science* 66, 81-84.
- 10 Martins, L., Gonçalves, M., Tavares, K., Gaudêncio, S., Neto, P.S., Dias, A.,
11 Gava, A., Saito, M., Oliveira, C., Mezzalira, A., 2011a. Castration methods do
12 not affect weight gain and have diverse impacts on the welfare of water buffalo
13 males. *Livestock Science* 140, 171-176.
- 14 Martins, L.T., Gonçalves, M.C., Tavares, K.C.S., Gaudêncio, S., Santos Neto,
15 P.C., Dias, A.L.G., Gava, A., Saito, M.E., Oliveira, C.A., Mezzalira, A., Vieira,
16 A.D., 2011b. Castration methods do not affect weight gain and have diverse
17 impacts on the welfare of water buffalo males. *Livestock Science* 140, 171-176.
- 18 Melches, S., Mellema, S.C., Doherr, M.G., Wechsler, B., Steiner, A., 2007.
19 Castration of lambs: A welfare comparison of different castration techniques in
20 lambs over 10 weeks of age. *The Veterinary Journal* 173, 554-563.
- 21 Mellor, D., Molony, V., Robertson, I., 1991. Effects of castration on behaviour
22 and plasma cortisol concentrations in young lambs, kids and calves. *Research*
23 *in Veterinary Science* 51, 149-154.

- 1 Mellor, D.J., Stafford, K.J., 2000. Acute castration and/or tailing distress and its
2 alleviation in lambs. *New Zealand Veterinary Journal* 48, 33-43.
- 3 Molony, V., Kent, J.E., McKendrick, I.J., 2002. Validation of a method for
4 assessment of an acute pain in lambs. *Applied animal behaviour science* 76,
5 215-238.
- 6 Molony, V., Kent, J.E., Robertson, I.S., 1995. Assessment of acute and chronic
7 pain after different methods of castration of calves. *Applied Animal Behaviour*
8 *Science* 46, 33-48.
- 9 Neto, O.A., Gasperin, B.G., Rovani, M.T., Ilha, G.F., Nóbrega, J.E., Mondadori,
10 R.G., Gonçalves, P.B.D., Antoniazzi, A.Q., 2014. Intratesticular hypertonic
11 sodium chloride solution treatment as a method of chemical castration in cattle.
12 *Theriogenology* 82, 1007-1011.e1001.
- 13 Oliveira, F.C., Ferreira, C.E.R., Haas, C.S., Oliveira, L.G., Mondadori, R.G.,
14 Schneider, A., Rovani, M.T., Gonçalves, P.B.D., Vieira, A.D., Gasperin, B.G.,
15 Lucia, T., 2017. Chemical castration in cattle with intratesticular injection of
16 sodium chloride: Effects on stress and inflammatory markers. *Theriogenology*
17 90, 114-119.
- 18 Paull, D.R., Small, A.H., Lee, C., Palladin, P., Colditz, I.G., 2012. Evaluating a
19 novel analgesic strategy for ring castration of ram lambs. *Veterinary*
20 *anaesthesia and analgesia* 39, 539-549.
- 21 Russell, L.D., Ettlín, R.A., Hikim, A.P.S., Clegg, E.D., 1993. Histological and
22 histopathological evaluation of the testis. *International journal of andrology* 16,
23 83-83.

1 Soto, F., Viana, W., Sousa, A., Pinheiro, S., Mucciolo, G., Hosomi, F., Azevedo,
2 S., Dias, R., 2007. Evaluation of zinc gluconate, either associated or not to
3 dimethyl sulfoxide, as contraceptive method for male dogs. *Anim Reprod* 4,
4 119-124.

5 Stewart, M., Beausoleil, N.J., Johnson, C.B., Webster, J.R., Schütz, K.E., Cox,
6 N., Stafford, K.J., 2014. Do rubber rings coated with lignocaine reduce the pain
7 associated with ring castration of lambs? *Applied Animal Behaviour Science*
8 160, 56-63.

9

10

1 Figure legends

2 Figure 1: Serum cortisol levels (average \pm standard error) in lambs submitted to
3 intratesticular injection (ITI) and control lambs (C; non-castrated), in different
4 moments, before and after procedure. Probabilities for significant main effects
5 (T = time; G = group): T: P=0.007 and G: P=0.08.

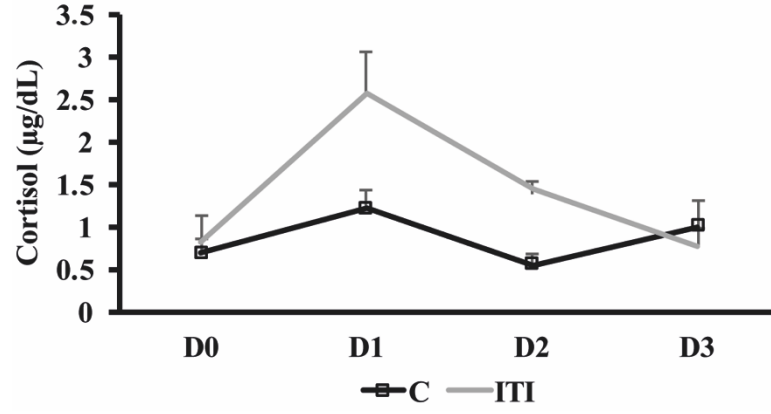
6 Figure 2: Hematocrit (HT), number of red blood cells (RBC), total plasma
7 protein (TPP), and fibrinogen (FIB) (average \pm standard error) in lambs
8 submitted to intratesticular injection (ITI) and control lambs (C; non-castrated),
9 in different moments, before and after procedure. Probabilities for significant
10 main effects (T = time; G = group) and the interaction (GxT): HT- T: P=0.02 and
11 G: P=0.04; RBC- T: P=0.04; TPP- T: P<0.0001 and FIB- G: P=0.04 and GxT:
12 P=0.007.

13 Figure 3: Number of white blood cells, lymphocytes and segmented neutrophils
14 (average \pm standard error) in lambs submitted to intratesticular injection (ITI)
15 and control lambs (C; non-castrated), in different moments, before and after
16 procedure. A significant effect of time (P=0.02) was observed for lymphocytes.

17 Figure 4: Representative images of histological sections from testicular
18 parenchyma of lambs from control (A) or ITI groups (B and C). A and B: intact
19 seminiferous tubules can be seen in histological sections stained with HE. C:
20 alterations in testicular parenchyma can be seen in histological sections stained
21 with PAS. The red arrows indicate inflammatory cells infiltration in B and C.

1 Figure 1

2



3

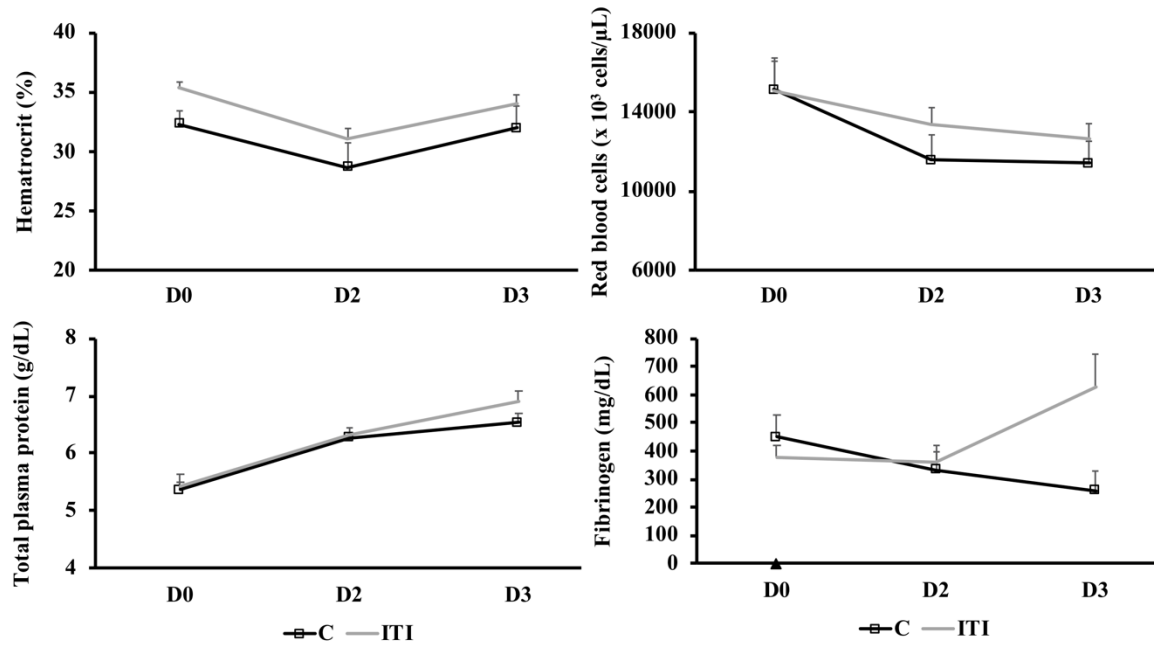
4

5

6

1 Figure 2

2



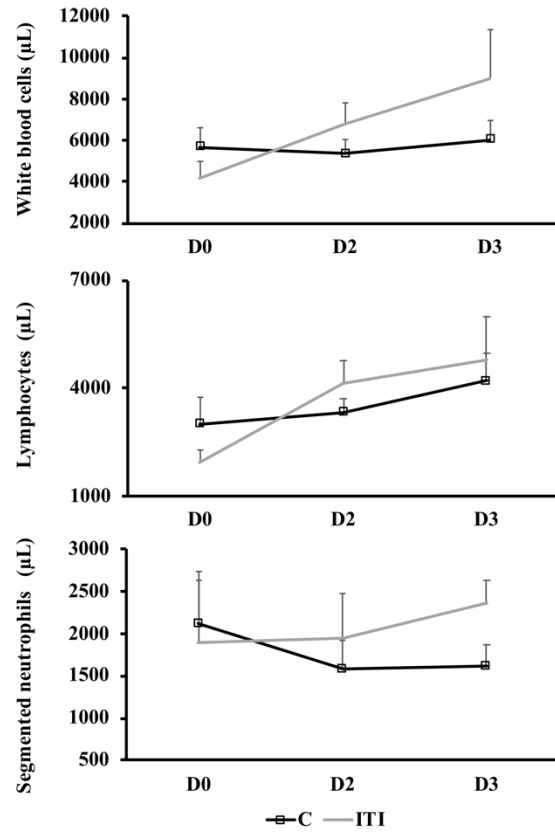
3

4

5

1 Figure 3

2

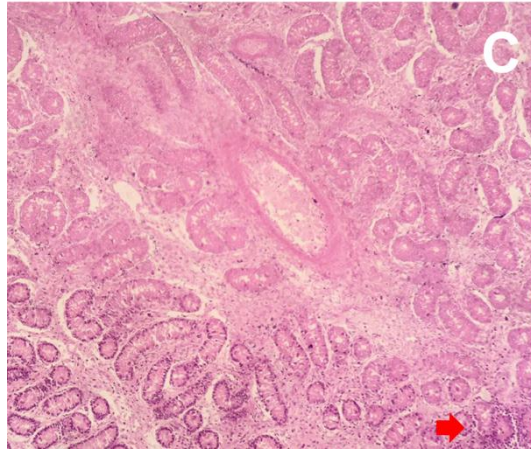
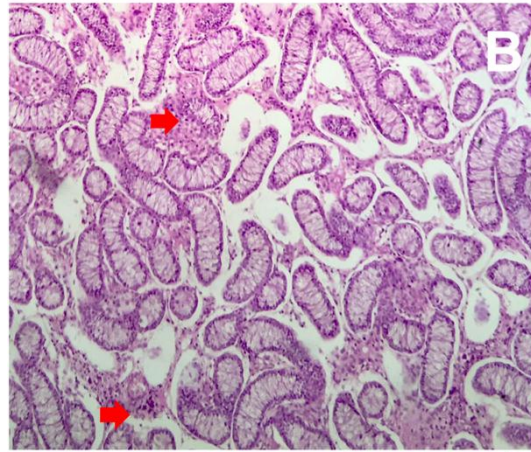
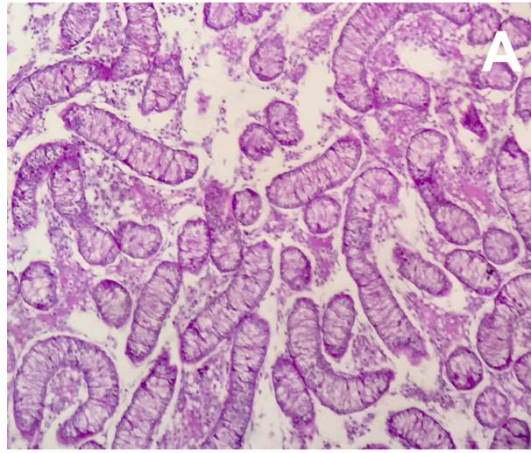


3

4

1 Figure 4

2



3

4

3 Considerações Finais

Com foco em determinar as condições de bem-estar animal, existem diversos marcadores validados para avaliar a presença de inflamação, dor e estresse que podem ser utilizados durante a experimentação. Os trabalhos revisados para execução deste estudo demonstram que o cortisol ainda é o parâmetro mais utilizado para definir situações de desconforto, mas sugere-se que utilizar as avaliações de modo combinado fornece uma resposta mais precisa. Com base nas informações geradas sobre como e quando diferentes procedimentos impactam sobre estes parâmetros, podem-se desenvolver alternativas viáveis para diminuir o desconforto aos animais.

Objetivando mensurar o impacto dos manejos de castração e testar a viabilidade de um método alternativo, nas condições do presente estudo, a IIT não foi eficiente em promover a castração de cordeiros, embora alterações focais tenham sido observadas nos cortes histológicos testiculares. O método IIT não alterou significativamente a maiorias dos parâmetros séricos avaliados, embora tenha induzido um aumento nos níveis de fibrinogênio três dias após o procedimento.

Uma vez que a hipótese de que a IIT representa uma alternativa viável para castração não foi confirmada, o próximo passo é avaliar a possibilidade de diminuir o estresse causado pela castração utilizando métodos mais eficientes e já estabelecidos. Porém, esses devem ser viáveis economicamente e fáceis de serem aplicados na rotina, para que tenham ampla adoção nas propriedades rurais.

Referências

ABCOUWER, S. F.; BODE, B. P.; SOUBA, W. W. Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. **Journal of Surgical Research**, v. 59, n. 1, p. 59-65, 1995.

ALAM, M.; DOBSON, H. Effect of various veterinary procedures on plasma concentrations of cortisol, luteinising hormone and prostaglandin F2 alpha metabolite in the cow. **The Veterinary Record**, v. 118, n. 1, p. 7-10, 1986.

ARTHINGTON, J. et al. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 5, p. 1120-1125, 2003.

BALET, L. et al. Immunization against gonadotropin-releasing hormone in dairy cattle: Antibody titers, ovarian function, hormonal levels, and reversibility. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2193-2203, 2014.

BENNETT, R. M.; BLANEY, R. J. Estimating the benefits of farm animal welfare legislation using the contingent valuation method. **Agricultural Economics**, v. 29, n. 1, p. 85-98, 2003.

BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1740-1750, 2007.

BLACHE, D.; MALONEY, S. K. New physiological measures of the biological cost of responding to challenges. **Advances in Sheep Welfare**, v. 1, p. 73–104, 2017.

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 intratesticular injection of ethanol and calcium chloride. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 157, n. 8/9, p. 420, 2006.

CAPUCILLE, D. J.; POORE, M. H.; ROGERS, G. M. Castration in cattle: techniques and animal welfare issues. **Compendium**, v. 24, n. 9, p. 66-73, 2002.

CARROLL, J. A. et al. Differential acute phase immune responses by Angus and Romosinuano steers following an endotoxin challenge. **Domest Anim Endocrinol**, v. 41, n. 4, p. 163-73, 2011.

CARROLL, J. A. et al. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immunity**, v. 15, n. 2, p. 81-89, 2009.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 2012.

CHASTANT-MAILLARD, S. et al. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. **Reproduction**, v. 125, n. 4, p. 555-563, 2003.

COETZEE, J. F. et al. Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration. **American journal of veterinary research**, v. 69, n. 6, p. 751-762, 2008.

COETZEE, J. F. 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, p. 12-12, 2010.

COHEN, R. et al. Efficacy and stress of chemical versus surgical castration of cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 70, n. 4, p. 1063-1072, 1990.

COOPER, D. W.; LARSEN, E. Immunocontraception of mammalian wildlife: ecological and immunogenetic issues. **Reproduction**, v. 132, n. 6, p. 821-828, 2006.

DA SILVA, R. R. **O agronegócio brasileiro da carne caprina e ovina**. RR da Silva, 2002.

DAMIÁN, J.; UNGERFELD, R. The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 4, p. 646-650, 2011.

DE CAMPOS, F. T. et al. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v. 89, p. 244-249, 2017.

DHABHAR, F. S. et al. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. **Brain, behavior, and immunity**, v. 8, n. 1, p. 66-79, 1994.

EARLEY, B.; CROWE, M. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological, and inflammatory responses. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 1044-1052, 2002.

ECKERSALL, P. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. **Comparative Haematology International**, v. 5, n. 2, p. 93-97, 1995.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. **Irish Veterinary Journal**, v. 53, n. 6, p. 307-311, 2000.

ECKERSALL, P. D. et al. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. **BMC veterinary research**, v. 3, n. 1, p. 35, 2007.

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.

ESHKAGHI, H. R. et al. The release of bradykinin in bovine mastitis. **Life Sciences**, v. 64, n. 18, p. 1675-1687, 1999.

FAHMY, M. H. et al. Effect of active immunization against luteinizing hormone on carcass and meat quality of Romanov lambs. **Small Ruminant Research**, v. 34, n. 1, p. 87-96, 1999.

FISHER, A. et al. Effects of surgical or banding castration on stress responses and behaviour of bulls. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 4, p. 279-284, 2001.

FORDYCE, G. et al. An evaluation of calf castration by intra-testicular injection of a lactic acid solution. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, n. 9, p. 272-276, 1989.

FUTRO, A.; MASŁOWSKA, K.; DWYER, C. M. Ewes direct most maternal attention towards lambs that show the greatest pain-related behavioural responses. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0134024, 2015.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England journal of medicine**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GONZÁLEZ, L. A. et al. Pain mitigation after band castration of beef calves and its effects on performance, behavior, Escherichia coli, and salivary cortisol¹. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 2, p. 802-810, 2010.

GRANDIN, T. **Improving animal welfare: a practical approach**. Cabi, 2015.

HAYASHI, S. A. et al. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. **Veterinary research communications**, v. 25, n. 2, p. 117-120, 2001.

HEID, A.; HAMM, U. Animal welfare versus food quality: Factors influencing organic consumers' preferences for alternatives to piglet castration without anaesthesia. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 203-211, 2013.

HORADAGODA, N. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **The Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p. 437-441, 1999.

HOUDEAU, E. et al. Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 4, p. 381-392, 2002.

IBGE 2015. Produção da Pecuária Municipal, 2015. <Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015>> Acessado em 27 de Janeiro de 2018.

JACKSON, P.; COCKCROFT, P. Appendix 2: Laboratory Reference Values: Haematology. In: (Ed.). **Clinical Examination of Farm Animals**: Blackwell Science Ltd., 2007a. p.302-302.

JACKSON, P.; COCKCROFT, P. Appendix 3: Laboratory Reference Values: Biochemistry. In: (Ed.). **Clinical Examination of Farm Animals**: Blackwell Science Ltd., 2007b. p.303-305.

JANA, K.; GHOSH, D.; SAMANTA, P. K. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for non-surgical sterilization of male goats (*Capra hircus*): a dose dependent study. **Anim Reprod Sci**, v. 86, 2005.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for non-surgical sterilization in adult albino rats. **Contraception**, v. 73, 2006.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v. 75, n. 5, p. 390-400, 2007.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Clinical Evaluation of Non-surgical Sterilization of Male Cats with Single Intra-testicular Injection of Calcium Chloride. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 1, p. 39, 2011.

JONES, M. L.; ALLISON, R. W. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 23, n. 3, p. 377-402, 2007.

JONGMAN, E. C.; BORG, S.; HEMSWORTH, P. H. Assessment of pain responses associated with castration of 10-week-old lambs using the Callicrate 'WEE Bander' compared with a standard elastrator. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 179, p. 46-52, 2016.

KAJIKAWA, T. et al. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, α 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 68, n. 1, p. 91-98, 1999.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008.

KASIMANICKAM, R. et al. Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient beef cows with an excitable temperament. **Theriogenology**, v. 107, p. 70-77, 2018.

KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 4, p. 279-282, 1992.

KENT, J. E.; MOLONY, V.; GRAHAM, M. J. Comparison of methods for the reduction of acute pain produced by rubber ring castration or tail docking of week-old lambs. **The Veterinary Journal**, v. 155, n. 1, p. 39-51, 1998.

KENT, J. E.; MOLONY, V.; ROBERTSON, I. S. Changes in plasma cortisol concentration in lambs of three ages after three methods of castration and tail docking. **Research in Veterinary Science**, v. 55, n. 2, p. 246-251, 1993.

LESTER, S. et al. Cortisol responses of young lambs to castration and tailing using different methods. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 39, n. 4, p. 134-138, 1991.

LESTER, S. J. et al. Behavioural and cortisol responses of lambs to castration and tailing using different methods. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 44, n. 2, p. 45-54, 1996a.

LESTER, S. J. et al. Behavioural and cortisol responses of lambs to castration and tailing using different methods. **N Z Vet J**, v. 44, n. 2, p. 45-54, 1996b.

LONG, S. et al. Plasma Cortisol Concentrations after CIDR Insertion in Beef Cows. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 1, p. 181-184, 2011.

MADRUGA, M. S. et al. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês terminados com diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 309-315, 2005.

MARCO, I.; LAVIN, S. Effect of the method of capture on the haematology and blood chemistry of red deer (*Cervus elaphus*). **Research in Veterinary Science**, v. 66, n. 2, p. 81-84, 1999.

MARTIN, G. B.; OLDHAM, C. M.; LINDSAY, D. R. Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe. **Theriogenology**, v. 16, n. 1, p. 39-44, 1981.

MARTINS, L. et al. Castration methods do not affect weight gain and have diverse impacts on the welfare of water buffalo males. **Livestock Science**, v. 140, n. 1, p. 171-176, 2011.

MARTINS, L. T. et al. Castration methods do not affect weight gain and have diverse impacts on the welfare of water buffalo males. **Livestock Science**, v. 140, n. 1-3, p. 171-176, 2011.

MELCHES, S. et al. Castration of lambs: A welfare comparison of different castration techniques in lambs over 10 weeks of age. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 3, p. 554-563, 2007.

MELLOR, D. Operational Details of the Five Domains Model and Its Key Applications to the Assessment and Management of Animal Welfare. **Animals**, v. 7, n. 8, p. 60, 2017.

MELLOR, D.; MOLONY, V.; ROBERTSON, I. Effects of castration on behaviour and plasma cortisol concentrations in young lambs, kids and calves. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 2, p. 149-154, 1991.

MELLOR, D. J.; STAFFORD, K. J. Acute castration and/or tailing distress and its alleviation in lambs. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 48, n. 2, p. 33-43, 2000.

MINUTI, A. et al. Assessment of gastrointestinal permeability by lactulose test in sheep after repeated indomethacin treatment. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 12, p. 5646-5653, 2013.

MOLONY, V.; KENT, J. E.; MCKENDRICK, I. J. Validation of a method for assessment of an acute pain in lambs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 76, n. 3, p. 215-238, 2002.

MOLONY, V.; KENT, J. E.; ROBERTSON, I. S. Behavioural responses of lambs of three ages in the first three hours after three methods of castration and tail docking. **Research in Veterinary Science**, v. 55, n. 2, p. 236-245, 1993.

MOLONY, V.; KENT, J. E.; ROBERTSON, I. S. Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration of calves. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 46, n. 1-2, p. 33-48, 1995.

MORRIS, S. Economics of sheep production. **Small Ruminant Research**, v. 86, n. 1, p. 59-62, 2009.

MURATA, H.; MIYAMOTO, T. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. **British Veterinary Journal**, v. 149, n. 3, p. 277-283, 1993.

NAKAO, T. et al. Plasma cortisol response in dairy cows to vaginoscopy, genital palpation per rectum and artificial insemination. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 41, n. 1-10, p. 16-21, 1994.

NEGRÃO, J. A. et al. Cortisol in Saliva and Plasma of Cattle After ACTH Administration and Milking. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1713-1718, 2004.

NETO, O. A. et al. Intratesticular hypertonic sodium chloride solution treatment as a method of chemical castration in cattle. **Theriogenology**, v. 82, n. 7, p. 1007-1011.e1, 2014.

OLIVEIRA, F. et al. Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection. **Small Ruminant Research**, v. 158, p. 15-18, 2018.

OLIVEIRA, F. C. et al. Chemical castration in cattle with intratesticular injection of sodium chloride: Effects on stress and inflammatory markers. **Theriogenology**, v. 90, p. 114-119, 2017.

ORIHUELA, A. et al. Breaking down the effect of Electro-Ejaculation on the serum cortisol response, heart and respiratory rates in hair sheep (*Ovis aries*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 10, p. 1968-1972, 2009.

PALME, R. et al. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 43-63, 1996.

PALMER, C. W. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 469-479, 2005.

PANG, W. et al. Effect of carprofen administration during banding or burdizzo castration of bulls on plasma cortisol, in vitro interferon- γ production, acute-phase proteins, feed intake, and growth. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 2, p. 351-359, 2006.

PAULL, D. R. et al. Evaluating a novel analgesic strategy for ring castration of ram lambs. **Vet Anaesth Analg**, v. 39, n. 5, p. 539-49, 2012.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary research**, v. 35, n. 2, p. 163-187, 2004.

PETYIM, S. et al. Ovum Pick-up in Dairy Heifers: Does it Affect Animal Well-being? **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 6, p. 623-632, 2007.

PRICE, J.; NOLAN, A. Analgesia of newborn lambs before castration and tail docking with rubber rings. **The Veterinary Record**, v. 149, n. 11, p. 321-324, 2001.

ROBERTSON, I. S.; KENT, J. E.; MOLONY, V. Effect of different methods of castration on behaviour and plasma cortisol in calves of three ages. **Research in Veterinary Science**, v. 56, n. 1, p. 8-17, 1994.

RUSSELL, L. D. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International journal of andrology**, v. 16, n. 1, p. 83-83, 1993.

SOTO, F. et al. Evaluation of zinc gluconate, either associated or not to dimethyl sulfoxide, as contraceptive method for male dogs. **Anim Reprod**, v. 4, p. 119-24, 2007.

SPOONER, J. M.; SCHUPPLI, C. A.; FRASER, D. Attitudes of Canadian citizens toward farm animal welfare: A qualitative study. **Livestock Science**, v. 163, p. 150-158, 2014.

STAFFORD, K. J. et al. Stress caused by laparoscopy in sheep and its alleviation. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, n. 3, p. 109-113, 2006.

STEWART, M. et al. Do rubber rings coated with lignocaine reduce the pain associated with ring castration of lambs? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 160, p. 56-63, 2014.

UNGERFELD, R. et al. Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands in anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1067-1074, 2015.

WHITLOCK, B. K. et al. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 737-46, 2012.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 04 de agosto de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Validação de método alternativo para castração de cordeiros com foco no bem estar animal**", registrada com o nº23110.005139/2016-73, sob a responsabilidade de **Bernardo Garziera Gasperin** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 04/07/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	30/07/2016 a 30/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Ovina/Cruzas (Ideal X Texel) e Corriedale
Nº de animais	72
Idade	7-21 dias
Sexo	Machos
Origem	Centro Agropecuário da Palma-UFPeI e Cabanha Duas Coronilhas, BR 293 Km58, Piratini-RS (Propriedade Particular)

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEE A 2720-2016**).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2016