

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**“RELAÇÃO DA CONSISTÊNCIA E DA ECOGENICIDADE TESTICULAR
COM A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM SUÍNOS”**

ALINE FERNANDA LOPES PASCHOAL

PORTO ALEGRE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“RELAÇÃO DA CONSISTÊNCIA E DA ECOGENICIDADE TESTICULAR COM A
MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM SUÍNOS”

Autor: Aline Fernanda Lopes Paschoal

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção de grau de mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Reprodução de Suínos

Orientador: Ivo Wentz

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes Paschoal, Aline Fernanda
Relação da consistência e da ecogenicidade
testicular com a morfologia espermática em suínos /
Aline Fernanda Lopes Paschoal. -- 2017.
49 f.

Orientador: Ivo Wentz.
Coorientador: Fernando Pandolfo Bortolozzo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Suínos. 2. Andrologia. 3. Consistência
testicular. 4. Ecogenicidade testicular. 5.
Morfologia espermática. I. Wentz, Ivo, orient. II.
Pandolfo Bortolozzo, Fernando, coorient. III. Título.

Aline Fernanda Lopes Paschoal

RELAÇÃO DA CONSISTÊNCIA E DA ECOGENICIDADE TESTICULAR COM A
MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM SUÍNOS

Aprovado em 03 de Março de 2017.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Ivo Wentz
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Paulo Eduardo Bennemann
Membro da Comissão

Dr. Rogério Oliveira Pinho
Membro da Comissão

Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meu pais, Edmilson e Fátima, por sempre me incentivarem incondicionalmente a desenvolver minha carreira acadêmica e por nunca medirem esforços para realização dos meus sonhos. Vocês são meu maior tesouro.

À minha irmã, Tânia, por ser minha companheira para todos os momentos, minha melhor amiga e cúmplice! Por estar ao meu lado apesar da distância. Te amo infinitamente.

Ao meu orientador, Prof. Ivo Wentz, pela confiança depositada, oportunidades, incentivos, aconselhamentos e principalmente por abrir as portas do setor para mim. Muito obrigada!

Aos meus coorientadores Prof^a Ana Paula Mellagi, Prof. Fernando Bortolozzo e Prof^a Mari Lourdes Bernardi pela dedicação incansável, orientação, ensinamentos compartilhados e por serem meus maiores exemplos de profissionais.

Ao Prof. David Barcellos, pelos ensinamentos e experiências compartilhados.

À todos os colegas da pós-graduação e graduação, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados. Especialmente àqueles que me auxiliaram e tanto se dedicaram ao experimento: Ana Paula, Joabel, Rafael, Matheus, Ludmila e André.

Carinhosamente, agradeço às amigas Tila e Ligiani, meus “presentinhos que o mestrado trouxe”, pela amizade, cumplicidade e por tornarem os meus dias melhores.

À ACSURS e à BRF, pela parceria e por proporcionar os meios para a realização do experimento.

Aos membros do PPGCV da UFRGS.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À UFRGS pelo ensino de qualidade.

RESUMO

RELAÇÃO DA CONSISTÊNCIA E DA ECOGENICIDADE TESTICULAR COM A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM SUÍNOS

Autor: Aline Fernanda Lopes Paschoal

Orientador: Prof. Ivo Wentz

Coorientadores: Prof^a. Ana Paula Gonçalves Mellagi

Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Prof^a. Mari Lourdes Bernardi

A morfologia espermática está entre as maiores causas de descarte de reprodutores nas centrais de difusão genética e, quando identificada precocemente, significa uma redução nos custos com reprodutores ociosos. O estudo objetivou avaliar a possibilidade de utilização de características testiculares (consistência à palpação manual, consistência à tonometria – tônus, ecogenicidade da imagem ultrassonográfica - em pixels, e heterogeneidade da ecogenicidade – em pixels) na identificação de reprodutores suínos com baixa qualidade de morfologia espermática. Foram avaliados 402 machos com idade média de $18,5 \pm 8,8$ meses, de cinco centrais de difusão genética. A avaliação espermática foi utilizada como critério de aptidão, sendo considerados aptos os reprodutores com menos de 20% de defeitos espermáticos, não ultrapassando o limite de 5% para defeitos de cabeça, acrossoma, colo e peça intermediária e 10% para defeitos de cauda (dobrada ou enrolada) e gota citoplasmática proximal. A porcentagem de animais aptos segundo a morfologia espermática foi de 71,9%. O tônus teve correlação positiva ($P \leq 0,05$) moderada com a consistência à palpação manual ($r = 0,64$). A heterogeneidade testicular foi fracamente correlacionada com a ecogenicidade ($r = 0,39$; $P \leq 0,05$) e com o percentual de anormalidades espermáticas ($r = 0,11$). Foram comparados os valores das características testiculares entre machos considerados aptos e inaptos, sendo a média de tônus inferior nos machos aptos ($P = 0,04$). A possível associação das características testiculares com o percentual de defeitos espermáticos foi analisada por regressão logística, incluindo as características (consistência à palpação manual, tônus, ecogenicidade e heterogeneidade do parênquima testicular) como variáveis contínuas ou classificatórias. A partir dos valores obtidos, foram criadas 4 classes de consistência à palpação e de tônus e 5 classes de ecogenicidade e heterogeneidade do parênquima testicular. Foi obtido um ponto de

corte de 5,03mm, baseado no tônus testicular, para discriminar animais aptos e inaptos e maiores valores de tônus (variável contínua) diminuiram a chance dos machos serem aptos, no entanto, com baixo poder discriminatório (AUC= 0,66). A probabilidade de ocorrência de aptidão tendeu a ser menor na classe de tônus 4 ($P= 0,07$). Menores valores de tônus estão associados à maior porcentagem de normalidades espermáticas em suínos, auxiliando na identificação de animais com alta qualidade espermática.

Palavras-chave: andrologia, ultrassonografia, tônus, anormalidade espermática, sêmen.

ABSTRACT

RELATIONSHIP OF TESTICULAR CONSISTENCY AND ECHOGENICITY WITH SPERM MORPHOLOGY IN BOARS

Author: Aline Fernanda Lopes Paschoal

Supervisor: Prof. Ivo Wentz

Cosupervisors: Prof^a. Ana Paula Gonçalves Mellagi

Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

Prof^a. Mari Lourdes Bernardi

Sperm morphology is an important cause of male culling in boar studs and if early detected may lead to a reduction on costs of exceeded males. The study aimed to evaluate the possibility for using testicular traits (testicular consistency by manual palpation and consistency by tonometry – tone, echogenicity by ultrasonography - pixels and heterogeneity of the echogenicity – pixels) on the identification of boars with high sperm morphology quality. Sperm evaluation was used as criteria for breeding soundness, being considered as satisfactory boars with less than 20% of total sperm abnormalities, with an upper limit of 5% head, acrosome, neck and mid piece defects and 10% of tail (coiled and bent) e proximal cytoplasmic droplet. The percentage of satisfactory boars was 71.9%. Tone was positively correlated ($P \leq 0.05$) with consistency by manual palpation ($r = 0.64$). Testicular heterogeneity was weakly correlated ($P \leq 0.05$) with echogenicity ($r = 0.39$) and with percentage of sperm abnormalities ($r = 0.11$). It was compared the values of testicular traits between satisfactory and unsatisfactory boars, and a lower mean of tone was found on satisfactory boars ($P = 0.04$). The possible association of testicular traits with the percentage of sperm defects was analyzed by logistic regression, including the traits (consistency by manual palpation, tone, echogenicity and heterogeneity) as continuous and categorical variables. Considering the values obtained, 4 classes were created for consistency by manual palpation and tone and 5 classes were created for echogenicity and heterogeneity of the testicular parenchyma. It was obtained a cut-off value of 5.03mm, based on testicular tone, to discriminate satisfactory and unsatisfactory boars and higher values of tone (as continuous variable) decreased the chance of boars to be satisfactory, however with low discriminatory power ($AUC = 0.66$). The probability of occurrence of satisfactory boars tended to be lower on class 4 of tone ($P = 0.07$). Lower values of tone are associated with higher percentage of sperm normality, contributing to the identification of boars with high sperm quality.

Key words: *Andrology, ultrasonography, tone, sperm abnormality, semen.*

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas no Artigo Científico

Tabela 1. Classes de consistência testicular quanto à palpação manual e tonometria (tônus, mm), escala de cinza (pixels) e heterogeneidade (pixels).....	31
Tabela 2. Correlação entre características testiculares, avaliadas por palpação manual (consistência), tonometria (tônus) ou ultrassonografia (escala de cinza e heterogeneidade), e percentual total de defeitos espermáticos.....	32
Tabela 3. Valores das características testiculares (Médias \pm erro padrão da média) nos machos classificados como aptos ou inaptos com base na morfologia espermática.....	32
Tabela 4. Porcentagem de animais classificados como aptos segundo a morfologia espermática para cada classe das características testiculares.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas no Artigo Científico

Figura 1. Painel da curva ROC, AUC e probabilidade de predição de aptidão dos reprodutores segundo o tônus testicular	33
---	----

LISTA DE ABREVIACOES

AUC – Area Under the Curve

CASA – Computer-Assisted Sperm Analysis

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CDG – Central de Difusão Genética

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio liberado de Gonadotrofinas

GRSC – Granja de Reprodutores Suínos Certificada

IA – Inseminaco Artificial

LH – Hormônio Luteinizante

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

μ L – Microlitro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

N – Newton

ROC – Receiver Operating Characteristics

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Anatomia Reprodutiva do Cachaço.....	13
2.2 Exame Andrológico.....	15
2.2.1 Exame Clínico.....	15
2.2.2 Avaliação da Consistência Testicular.....	17
2.2.3 Exame Ultrassonográfico.....	18
2.2.3.1 Escala de Cinza.....	18
2.2.4 Avaliação do Ejaculado.....	20
2.2.4.1 Avaliação Macroscópica.....	20
2.2.4.2 Avaliação de Motilidade Espermática.....	21
2.2.4.3 Avaliação de Concentração Espermática.....	21
2.2.4.4 Avaliação de Morfologia Espermática.....	22
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	25
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
5. REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas nas áreas de sanidade, nutrição, reprodução e genética, assim como a adoção de técnicas de manejo e biotecnologias aplicadas à reprodução têm papel importante no desenvolvimento do plantel suíno no Brasil. Nesse contexto, destaca-se a inseminação artificial (IA), uma biotecnologia já consolidada como manejo reprodutivo (BORTOLOZZO et al., 2015), que tem contribuído para o progresso genético (KNOX, 2016a) e em índices zootécnicos como taxa de parição e leitões produzidos por matriz (FLOWERS, 1997; KNOX, 2016b). Na espécie suína, a IA é realizada a partir de doses inseminantes resfriadas produzidas após coleta e diluição de ejaculados de animais com, em sua maioria, alto mérito genético (BORTOLOZZO et al., 2015; KNOX, 2016a).

Aproximadamente 90% das matrizes são inseminadas artificialmente nos principais países produtores de carne suína (RIESENBECK, 2011). Sendo assim, a capacidade produtiva do cachaço em produzir doses de alta qualidade é, economicamente, bastante importante. O plantel brasileiro de matrizes suínas no Brasil é de 1.720.255 (ABCS, 2016) e a proporção de cachaços para cobertura de fêmeas é de 1 macho para 150 a 250 matrizes (ALTHOUSE, 2014) com deposição intra-cervical da dose inseminante, podendo ser ainda maior para os métodos de inseminação intrauterina e em tempo fixo. Nesse contexto, é possível estimar que são necessários aproximadamente 9500 cachaços para a cobertura das matrizes no plantel brasileiro. Por ser muito inferior ao plantel de matrizes, muitas vezes os machos reprodutores não recebem a atenção necessária para averiguação de suas características reprodutivas.

O exame andrológico realizado de forma minuciosa, auxilia na otimização do uso dos reprodutores e descarte de animais de baixa qualidade. A avaliação consiste em uma anamnese, exame físico, exame do ejaculado e de libido, nos quais são identificados animais inaptos à monta, à coleta de sêmen e à produção de doses inseminantes, sujeitando-os ao descarte. O andrológico pode contar com exames complementares, como a ultrassonografia, que pode fornecer dados referentes ao parênquima testicular. Com relação à avaliação laboratorial do ejaculado, que é o mais frequente na rotina das centrais, são avaliadas as características seminais, e essas características servem como parâmetro para descarte de ejaculados impróprios para produção de doses inseminantes e para a seleção de animais possivelmente subférteis. A seleção e descarte de machos jovens, assim como a permanência desses nas centrais, acontece, predominantemente, pelo melhoramento genético (KNOX, 2008). No entanto,

ao analisar reprodutores em centrais alemãs, Schulze et al (2014) observaram que 47,3% dos animais de alto mérito genético ainda seriam excluídos das centrais por não apresentarem parâmetros satisfatórios de qualidade seminal, desses 36,7% por anormalidades nas células espermáticas. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar a utilização da consistência à palpação e à tonometria (tônus) e da ultrassonografia como ferramentas na identificação de animais com qualidade morfológica espermática comprometida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia Reprodutiva do Cachaço

Os principais componentes do sistema reprodutor masculino são estruturas diferenciadas das quais se destacam cordão espermático, escroto, testículos, ductos de transporte, glândulas acessórias, pênis e músculos (SENGER, 2003).

Os cordões espermáticos estendem-se pelo canal inguinal (passagem entre a cavidade abdominal e o escroto), até seus anexos no polo ventral dos testículos, suspendendo-os dentro do escroto. Os cordões espermáticos contêm os ductos deferentes, músculo cremaster, vasos linfáticos, inervação, artérias e veias. A artéria testicular é uma ramificação da aorta e, após passar pelo canal inguinal, se torna bastante contorcida. As veias do cordão espermático formam uma rede elaborada, denominada plexo pampiniforme, que envolve a artéria testicular. A posição das veias em relação a artéria testicular é importante na regulação térmica dos testículos, que acontece pela perda de calor das veias para a superfície escrotal e por envolver a artéria testicular, resfriando o sangue que está indo para os testículos (SENGER, 2003).

O escroto é um saco de dois lobos, que serve como proteção e suporte para os testículos. Ele é composto por quatro estruturas, sendo a pele (mais externa), seguida pela túnica dartos, fáscia escrotal e túnica parietal vaginal (estrutura mais interna), que envolve os testículos. Os testículos são estruturas pareadas, que têm como função primária a produção de hormônios e células espermáticas (SENGER, 2003; FLOWERS, 2004a). As estruturas, na espécie suína, localizam-se externas à cavidade, e são conectados aos componentes internos do sistema reprodutivo pelo cordão espermático (SENGER, 2003; KNOX, 2016a). Eles são cobertos pela cápsula testicular composta pela túnica visceral (mais externa) e túnica albugínea (mais interna). Dentro desta cápsula é possível distinguir duas estruturas, o parênquima e o mediastino testicular.

O parênquima testicular é o conjunto de dois compartimentos, tubular e intersticial. O primeiro é composto pelos túbulos seminíferos, formados por uma membrana basal, uma camada de epitélio seminífero, contendo as células de Sertoli, e são envoltos por células peritubulares contráteis. O segundo é composto por vasos, nervos e células de Leydig e envolve o mediastino. O mediastino é localizado no centro do testículo e tem vários ductos, que formam uma rede denominada *rete testis*. Essa

rede serve como transporte dos espermatozoides para fora dos testículos, e converge em vários ductos denominados eferentes (SENGER, 2003).

Os ductos eferentes se unem em um ducto epididimário tanto do lado direito como esquerdo. Eles são bastante enovelados e cada um é envolto por uma camada muscular que gera contrações nas estruturas, permitindo que os espermatozoides transitem pelo epidídimo. Os ductos ficam dentro de cada epidídimo, que se localizam externos aos testículos, dentro do escroto. O epidídimo é dividido em três componentes anatômicos e, em suínos, a cauda está localizada no polo superior, cabeça no polo inferior e corpo é a união dos polos. A cabeça do epidídimo contém o ponto de conexão entre os ductos eferentes e o segmento inicial do ducto epididimário. O trânsito pelo epidídimo passa primeiro pela cabeça, depois pelo corpo e por fim pela cauda, onde as células espermáticas ficam armazenadas. É durante o transporte epididimário que o espermatozoide começa a adquirir a capacidade de fecundar o oócito. Sendo assim, conclui-se que o epidídimo tem como função promover a maturação e reserva de espermatozoides (SENGER, 2003; KNOX, 2016b).

Os ductos deferentes, esquerdo e direito, formam-se a partir dos epidídimos, unindo-se em um único ducto, chamado uretra pélvica. A uretra passa por diversos músculos e glândulas acessórias até a formação da uretra peniana, cuja função é o transporte tanto de urina como de sêmen (KNOX, 2016b).

As glândulas acessórias são responsáveis pela produção de secreções que contribuem para a porção não celular do ejaculado, conhecida como plasma seminal. As glândulas vesiculares são posicionadas lateralmente às porções terminais de cada ducto deferente e são responsáveis por produzir grande porção de volume do ejaculado (fase pobre). Na espécie suína, as glândulas prostáticas são do tipo disseminada, e o tecido glandular é distribuído ao longo da parede dorsal e lateral da uretra pélvica, podendo ser denominada de glândula uretral. Nas glândulas uretrais é produzida a fração pré-espermática do ejaculado ou fase uretral. As glândulas bulbouretrais são localizadas nos dois lados da uretra pélvica, próximas ao arco isquiático. Nos suínos, as bulbouretrais são bem desenvolvidas e responsáveis pela produção da porção gelatinosa do ejaculado (SENGER, 2003; BORTOLOZZO et al., 2005).

O pênis suíno possui é do tipo fibroelástico, possuindo tecido erétil limitado e tem a porção final em formato de saca-rolhas o que permite a penetração da cérvix espiralada da matriz (SENGER, 2003). Devido a característica do tecido peniano, animais sexualmente estimulados não são capazes de enrijecer e aumentar o volume

dessa estrutura. Nesse contexto, a flexura sigmoide é responsável, por manter o pênis dentro do corpo do animal e promover a exteriorização no macho sexualmente estimulado, através do relaxamento do músculo retrator do pênis e resultante extensão da flexura. No processo de exteriorização, o pênis passa por uma estrutura denominada de óstio prepucial, o qual contém um divertículo repleto de muco, urina, células mortas e bactérias acumuladas, que podem promover a contaminação do ejaculado (SENGER, 2003; KNOX, 2016b).

2.2 Exame Andrológico

O exame andrológico tem como objetivo avaliar o potencial reprodutivo dos machos, diagnosticar sub ou infertilidade e ocorrência da puberdade (FONSECA, 2000; FRANCO et al., 2006). Esse exame deveria ser inserido na rotina das centrais de difusão genética (CDG), porém a saúde dos órgãos sexuais parece ser pouco considerada no trabalho diário (WEITZE, 2010). O que se observa nas centrais é um acompanhamento pelos coletadores principalmente durante as coletas de ejaculado, no qual se verifica a presença de lesões, sinais de dor ou alterações comportamentais como perda de libido e apatia. Através dessa avaliação é possível retirar da rotina de coleta animais com alterações na observação do coletador.

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), o exame andrológico consiste em avaliar a aptidão reprodutiva de um animal destinado à reprodução e fundamenta-se na observação da saúde geral, do sistema genital, e da qualidade espermática do reprodutor. Para realizar um laudo, alguns quesitos mínimos devem ser avaliados (identificação, anamnese, exame clínico geral, exame especial dos órgãos reprodutivos, avaliação seminal) e outros são complementares, realizados a critério do profissional responsável. Essas avaliações permitem que se chegue a um diagnóstico sobre a condição reprodutiva do animal, otimizando seu uso.

2.2.1 Exame Clínico

O exame clínico consiste em duas etapas: anamnese e exame físico.

Na anamnese, é obtido o histórico do animal, incluindo a idade, identificação do reprodutor (número, moosa, tatuagem) e a raça. Deve-se averiguar o comportamento do animal em experiências sexuais anteriores, tipo de alojamento, condições ambientais,

ficha individual, condição corporal, dados anteriores de exames clínicos, libido, capacidade de realizar monta, dados obtidos a campo (taxa de parto e tamanho de leitegada produzida – quando houver), rebanho de origem, resultados de qualquer teste para detecção de doenças, frequência de coleta, doenças anteriores, tratamentos, e programa de medicina preventiva do rebanho (SHIPLEY, 1999).

Na anamnese do exame andrológico são obtidas informações relacionadas às condições sanitárias do rebanho. Essas são importantes, pois as granjas que comercializam doses devem ser Granjas de Reprodutores Suínos Certificadas (GRSC). Para isso, foi desenvolvido pelo MAPA uma instrução normativa (MAPA- Instrução Normativa nº19, de 15 de fevereiro de 2002), que estabelece uma série de exames para comprovação e manutenção da certificação. As granjas devem ser comprovadas como livres de Peste Suína Clássica, Doença de Aujeszky, Brucelose, Tuberculose, Sarna e Leptospirose (livre ou controlada). As condições a serem atendidas variam conforme a doença e devem ser rigorosamente seguidas para que a certificação não seja suspensa.

No exame físico, todos os animais devem ser avaliados quanto à possíveis dificuldades de locomoção, buscando traumas, degenerações articulares entre outras alterações (SHIPLEY, 1999). Outros parâmetros a serem analisados, são escrotos, testículos e epidídimos (CBRA, 2013). Os escrotos devem estar livres de abscessos, cicatrizes, espessamento, irritação ou lesões. Nos testículos, avalia-se a forma, tamanho, simetria, localização, consistência, deslocamento, calor e demonstração de dor à palpação. Os testículos devem ser móveis dentro do escroto, simétricos, firmes e nenhum líquido deve ser palpável (SHIPLEY, 1999). Na cabeça do epidídimo, avalia-se a forma, tamanho, localização, consistência, demonstração de dor e o destacamento da estrutura. Já na cauda do epidídimo, observa-se a forma, tamanho, simetria, localização, consistência, demonstração de dor e destacamento à palpação (SHIPLEY, 1999 e WEITZE, 2000). No prepúcio, são avaliados o orifício e o divertículo prepucial, buscando sinais de inflamação (SHIPLEY, 1999; WEITZE, 2010). Além destes, os tetos também são avaliados pela contagem, avaliação do espaçamento e simetria entre as cadeias mamárias e evidência de tetos invertidos (SHIPLEY, 1999).

Alguns exames podem ser adicionados ao exame clínico, de forma a torná-lo ainda mais completo e eficaz. Dentre os exames complementares estão a ultrassonografia, usada para várias espécies animais (PECHMAN, 1987; EILTS 1989; CARTEE, 1990; PUGH, 1990; LOVE, 1992), e também em suínos (CARTEE, 1986).

2.2.2 Avaliação da Consistência Testicular

A consistência testicular faz parte do exame andrológico e pode servir como ferramenta para determinar o tônus dos testículos. Esse parâmetro pode ser utilizado para indicar a produção e qualidade seminal em bovinos (COULTER, 1976; FITZPLATZ et al., 2002), proporcionando dados importantes quanto a condição reprodutiva do macho (HAHN et al., 1969). A consistência de cada testículo na espécie suína é comumente determinada através da palpação manual (WEITZE, 2010). Para avaliação da consistência testicular os testículos devem ser tracionados com uma das mãos no sentido dorso cranial, o que vai promover a distensão do escroto, seguindo-se com a palpação manual e digital, a partir da qual será realizado um escore segundo a maciez dos testículos (CBRA, 2013). A partir dos resultados obtidos à palpação manual, diferentes distinções devem ser feitas quanto à firmeza da estrutura, variando de flácido a muito rígido (NICHOLS & THOMPSON, 1987).

A avaliação do parâmetro é importante na identificação de processos degenerativos agudos ou crônicos, pois mesmo animais saudáveis, com libido, podem apresentar alterações na consistência testicular devido às degenerações. A degeneração testicular é considerada como a principal causa de redução de fertilidade em mamíferos domésticos. Macroscopicamente os testículos com processos degenerativos podem apresentar, inicialmente, consistência flácida, tamanho normal ou discreta redução no volume. Em etapas avançadas o órgão tem redução do volume e a consistência torna-se firme à palpação, com aumento de tecido conjuntivo intersticial e, em alguns casos, mineralização dos túbulos seminíferos. Dependendo da gravidade da degeneração, os animais podem apresentar redução na concentração espermática, aumento de células anormais no ejaculado e, em casos graves, azoospermia (VAN CAMP, 1997; NASCIMENTO & SANTOS, 2003).

O método da palpação faz uma estimativa subjetiva da consistência testicular e, devido à importância de se avaliar a consistência com mais precisão, foi desenvolvido em 1969 por Hahn e colaboradores um equipamento capaz de mensurar a consistência testicular de forma menos subjetiva: o tonômetro. A técnica de mensuração com tonômetro, ou tonometria, já foi utilizada anteriormente em suínos, demonstrando ser uma técnica promissora (ESBENSHADE et al., 1979; MAHONE, 1979; KEßLER, 2010). O aparelho consiste em um visor, uma mola e uma haste de metal. Essa haste ao

ser pressionada contra uma superfície, gera um deslocamento, a partir do qual se obtém um valor. O visor, no qual se observa uma escala graduada em milímetros, varia os valores quando é exercida a pressão na superfície. Quanto maior a escala, mais rígida é a estrutura, pois maior é a força de deflexão da haste em relação a superfície testicular.

2.2.3 Exame Ultrassonográfico

Em 1960 os primeiros aparelhos ultrassonográficos foram utilizados para explorar o corpo humano. Entre 1980 e 1995, o progresso tecnológico, informático e eletrônico resultou em mais qualidade para as imagens ultrassonográficas e redução no peso dos aparelhos, permitindo que fossem usados em diversas situações (ALAIS et al., 1979; BOTTE, 1998). Após esse desenvolvimento, a ultrassonografia testicular tornou-se factível e o método passou a ser utilizado como complementação ao exame andrológico, auxiliando na identificação de desordens subclínicas em bovinos (GÁBOR et al., 1998).

A onda sonora é um fenômeno de vibração e, ao contrário da onda luminosa, não se propaga no vácuo, e sim em materiais sólidos e líquidos (BOUTON et al., 1984; CARNIEL, 1987; GODDARD, 1995). Cada tecido apresenta uma ecotextura diferente, que depende da sua capacidade de refletir as ondas geradas. Na medida em que ocorre a reverberação, a onda é captada na forma de eco, de onde segue para um console para ser processada, amplificada e condensada na forma de imagem. O transdutor age como um emissor de ondas sonoras e receptor de ecos e a imagem produzida por esse processo é transmitida na tela do equipamento (GRIFFIN & GINTHER, 1992; RIBADU & NAKAO, 1999).

2.2.3.1 Escala de Cinza

Pierson et al. (1988) descreveram um padrão de variação entre os tons de cinza produzidos na imagem ultrassonográfica, justificando que estes ocorrem pelas diferentes ecotexturas, características dos tecidos. Em relação à visualização e à interpretação das imagens, existem estruturas anecóicas que não refletem ondas sonoras, ou seja, não produzem ecos e aparecem como estruturas pretas no monitor. Quando se compara a escala de cinza de diferentes estruturas, é possível classificar as estruturas mais escuras (menor ecogenicidade e menos reverberação), como hipoecóicas. As estruturas de mais

brilho (maior ecogenicidade e mais reverberação) são classificadas como hiperecóicas (PECHMAN & EILTS, 1987; ABDEL-RAZEK & ALI, 2005).

Sabendo-se que a imagem de ultrassom é capaz de produzir em um monitor a representação de diferentes tecidos, essa composição da imagem pode ser utilizada como uma ferramenta para demonstrar informações úteis sobre os testículos. A distribuição de frequências ou histograma da imagem descreve a distribuição da intensidade de cinza (pixels) em cada segmento da imagem (CHANDOLIA et al., 1997). A ultrassonografia tem sido utilizada para avaliar os testículos de animais de várias espécies, como equinos (LOVE, 1992), bovinos (KASTELIC, 2001; ABDEL-RAZEK & ALI, 2005; GNEMMI & LEFEBVRE, 2009; CARDILLI et al., 2012; PINHO et al., 2013), ovinos (GOULETSOU et al., 2003; AHMADI et al., 2013), cães (GOULETSOU, et al., 2008; SOUZA et al., 2015; MOXON et al., 2015; ENGLAND et al., 2016) e suínos (CARTEE et al., 1986; PINHO et al., 2015). Nesse contexto, a espécie mais estudada ainda é a bovina.

As diferentes fases de maturação sexual de bovinos foram representadas nas imagens de ultrassom com diferentes luminosidades na escala de cinza (EVANS et al., 1996; CHANDOLIA et al., 1997). Segundo Evans et al. (1996), é possível perceber que a intensidade de pixels testicular, determinada pelo exame ultrassonográfico, aumenta, uma vez que sobe de 115 para mais de 180, quando se compara touros de 20 e 40 semanas de vida. Os autores concluíram que o aumento se dá durante a fase na qual há maior desenvolvimento dos túbulos seminíferos e produção de células germinativas maduras. Cardilli et al. (2012) apontaram que a ecogenicidade do parênquima testicular de bovinos pré-púberes aos 10 meses foi inferior (18,47%) quando comparada a de animais púberes aos 18 meses (42,11%). De fato, Pinho et al. (2013) concluíram que em animais púberes, não existe diferença na ecotextura, quando se comparou animais com idades entre 21 a 33 meses.

Estudos também foram desenvolvidos no intuito de utilizar a escala de cinza a partir da ultrassonografia como uma ferramenta na predição da fertilidade de reprodutores. Em caninos, Souza et al. (2015) verificaram que não há diferença na ecotextura de cães férteis ou inférteis. A ecogenicidade da imagem testicular apresenta resultados contraditórios, quando se analisa o percentual de células normais. Moxon et al. (2015) observaram correlação negativa ($r = -0,455$) com porcentagem de células morfológicamente normais ($P = 0,003$). No entanto, no estudo de England et al. (2016),

os autores não encontraram associação da imagem ultrassonográfica com os defeitos morfológicos de espermatozoides de cães.

Além da escala de cinza, o desvio padrão da média de escala de cinza também foi avaliado por alguns autores, buscando uma relação entre a heterogeneidade do parênquima testicular e qualidade espermática (MOXON et al., 2015). Esse refinamento da técnica foi utilizado no intuito de considerar a variação do parênquima testicular e não só a média. Moxon et al. (2015) verificaram que não existe uma relação entre a heterogeneidade da escala de cinza (desvio padrão da média da escala de cinza) e porcentagem de células espermáticas morfolologicamente normais em cães.

2.2.4 Avaliação do Ejaculado

A avaliação seminal é um procedimento essencial em muitos aspectos na reprodução de animais domésticos e faz parte do exame andrológico. Convencionalmente, a avaliação do sêmen inclui a mensuração do volume, da concentração espermática e da porcentagem de células com motilidade progressiva e morfolologicamente normais (COLENBRANDER et al., 1993). Considerando que as avaliações de sêmen *in natura* devem ser realizadas de forma rápida, para evitar que as células percam motilidade, quanto menor o intervalo entre a coleta e a análise, melhor é a confiabilidade da decisão por eliminar ou prosseguir com o processamento do ejaculado (WEITZE, 2012), sendo recomendado o intervalo entre coleta e análise inferior a 20 minutos.

2.2.4.1 Avaliação Macroscópica

A avaliação macroscópica do ejaculado consiste na avaliação do volume, cor, odor e aspecto do sêmen. De forma geral, o volume do ejaculado é aferido através da pesagem e para efeito prático, se aceita que cada 1 g de sêmen corresponde a 1 mL. A precisão dessa medida é importante para determinar o número total de espermatozoides do ejaculado. Na espécie suína, se aceita ejaculados de 50 a 600 mL, o que depende da idade do animal (CBRA, 2013). A cor do ejaculado deve ser avaliada por observação de um operador. Quando fisiológica a cor varia do branco ao branco acinzentado, podendo também ter coloração amarelo clara, variação que depende de características individuais e nutricionais do macho. Cores amarelo forte ou rosadas podem indicar presença de

células inflamatórias ou sangue no ejaculado, respectivamente (BORTOLOZZO et al., 2008). O odor também é avaliado e deve ser *sui generis* (CBRA, 2013), sendo possível detectar através dessa avaliação eventuais contaminações por secreções prepuciais e urina no ejaculado (BORTOLOZZO, et al., 2008). O aspecto também deve ser avaliado e varia de soroso a leitoso, sendo o soro-leitoso considerado como ideal (ALTHOUSE, 2007).

2.2.4.2 Avaliação de Motilidade Espermática

A motilidade espermática baseia-se no número total de células espermáticas móveis em vários campos examinados. A avaliação pode ser subjetiva, examinada em microscópio óptico em aumento de 100 a 200 vezes (BORTOLOZZO et al., 2008) ou através de técnicas computadorizadas (CASA – *Computer-Assisted Sperm Analysis*) que garantem resultados mais acurados, avaliando não só a vitalidade da célula, mas o tipo de movimento realizado (BORTOLOZZO et al., 2008). O parâmetro mínimo para o aceite de ejaculados na produção de doses é de 70% de motilidade progressiva (BENNEMANN, 2014). Ejaculados com percentuais de células móveis abaixo desse limiar devem ser descartados, pois o uso de ejaculados com menos de 60% de motilidade progressiva demonstram baixa taxa de parto (74,1%) e tamanho de leitegada (9,6 leitões nascidos vivos) (FLOWERS, 1997). Apesar de indicar a vitalidade das células espermáticas, servindo como fator limitante na fertilização das fêmeas inseminadas, o resultado da motilidade espermática não é capaz de predizer a fertilidade do reprodutor suíno (COLENBRANDER et al., 1993; WEITZE, 2012), evidenciando a importância da avaliação no exame andrológico.

2.2.4.3 Avaliação de Concentração Espermática

A concentração espermática representa o número de espermatozoides por milímetro ou centímetro cúbico do ejaculado. Na espécie suína a determinação da concentração pode ser feita por contagem direta em câmara hemocitométrica, fotolorimetria, espermodensímetro e contagem eletrônica de partículas (CBRA, 2013). O valor de concentração resultante é multiplicado pelo volume total do ejaculado, determinando a quantidade de células totais no ejaculado.

2.2.4.4 Avaliação de Morfologia Espermática

A morfologia espermática tem por objetivo avaliar qualitativamente as células espermáticas, de modo a determinar o percentual de alterações morfológicas (BORTOLOZZO et al., 2008). Esse é um parâmetro importante relacionado à fertilidade, pois ejaculados com alta proporção de defeitos celulares podem apresentar redução na capacidade fecundante (JUNG et al., 2015). Contudo, mesmo os reprodutores saudáveis apresentam células espermáticas defeituosas no ejaculado em baixas proporções (KNOX, 2016b). A análise morfológica pode ser realizada em microscopia óptica, com aumento de 1000 vezes, sem contraste de fase em amostras coradas com eosina-nigrosina, Trypan Blue, Giemsa ou com contraste de fase e óleo de imersão. Amostras para avaliação em preparo úmido não são coradas e devem ser fixadas em solução de formalina (BORTOLOZZO et al., 2008). Recomenda-se que sejam avaliadas 200 células espermáticas, classificando-as como normais e anormais e convertendo esses valores para percentual (CBRA, 2013). O exame pode ser realizado ainda com o recurso de análise morfológica disponível em sistemas CASA (FOXCROFT, 2008).

Apesar de fornecer uma estimativa do funcionamento no epitélio seminífero, maturação epididimária das células (GADEA, 2005) e condições de estresse às quais os reprodutores são submetidos (KNOX, 2016b), nem sempre a avaliação morfológica é realizada nas centrais, pois exige tempo e mão de obra especializada. Nesse contexto, as CDG acabam optando pelo envio de amostras para laboratórios especializados (BORTOLOZZO et al., 2008). Todos os machos jovens devem ser avaliados ao serem introduzidos nas centrais de difusão genética e, periodicamente, todos os doadores em coleta devem ser submetidos ao exame (BORTOLOZZO et al., 2008). Recomenda-se que amostras de sêmen *in natura* fixadas sejam enviadas para análise em períodos de aproximadamente 50 dias, devido ao período de espermatogênese e maturação espermática (FLOWERS, 2004a; FLOWERS, 2004b), ou sempre que houver suspeita de alteração morfológica durante os exames de motilidade na rotina. No Brasil, é estipulado pelo CBRA (2013) que a soma de defeitos em um ejaculado não deve ser superior a 20%, para sêmen *in natura*. Os limites máximos aceitáveis para anormalidades, ao se individualizar cada região da célula, são: 5% de alterações de

cabeça, colo, acrossoma e peça intermediária; 10% de gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda dobrada ou enrolada. No suíno, a gota citoplasmática distal não tem sido qualificada como patológica, não sendo computada no total de alterações (BORTOLOZZO et al., 2008).

Em geral as anormalidades são classificadas como primárias ou secundárias. As primárias são oriundas das más formações das células durante a espermatogênese ou espermiogênese, ao passo que as secundárias são oriundas do processo de amadurecimento das células no epidídimo. É possível ainda encontrar defeitos oriundos do processamento do ejaculado no laboratório, classificados como defeitos terciários (BRIZ et al., 2013).

As alterações mais comuns identificadas na cabeça incluem cabeça muito grande, muito pequena e perda da morfologia normal. Em muitos casos esses defeitos representam uma pequena subpopulação do total de células ejaculadas e estão muito associadas com a genética, raça, idade do reprodutor (FLOWERS, 2004b; KOPP et al., 2008; SCHULZE et al., 2014; KNOX, 2016b). A avaliação do acrossoma busca células com degeneração, má formação ou danos na estrutura e os defeitos mais comuns à microscopia são localizados na porção apical, que pode estar destacada, ausente ou danificada (PURSEL et al., 1972; KNOX, 2016b). As alterações de acrossoma estão relacionadas com a genética do reprodutor, envelhecimento da célula, condições ambientais como temperatura e deficiência nutricional (FLOWERS, 2004b; PURSEL et al., 1972). A avaliação dessas estruturas é de grande importância, pois a cabeça com morfologia alterada e redução das enzimas acrosina e hialuronidase no acrossoma podem resultar em dificuldade de penetração no oócito, resultando em redução na fertilização (FLOWERS, 2004b; KNOX, 2016b).

Defeitos na cauda são os mais comumente encontrados, destacando-se, pela frequência de ocorrência, a gota citoplasmática proximal e distal (KNOX, 2016b). A presença dessas anormalidades pode acontecer devido à maturação incompleta da célula espermática pela aceleração no intervalo de coleta ou estresse (FLOWERS, 2004b; KNOX, 2016b). A presença de gota citoplasmática proximal pode estar associada à redução na fertilidade devido à redução na motilidade da célula (KNOX, 2016b). No entanto, não é comprovada a redução da fertilidade em amostras com gota citoplasmática distal (FLOWERS, 2004b). Caudas dobradas e enroladas também podem ser encontradas nas amostras, estando relacionadas principalmente com condições de

temperatura, pH, osmolaridade, pressão, radiação UV, componentes tóxicos e bactérias, ou seja, fatores extrínsecos ao reprodutor (KNOX, 2016b).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO A SER SUBMETIDO

RELAÇÃO DA CONSISTÊNCIA E DA ECOGENICIDADE TESTICULAR COM A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM SUÍNOS

Paschoal A. F. L.¹, Santos, J. T., Mellagi A. P. G.¹, Bernardi M. L.², Wentz I.¹,
Bortolozzo F. P.^{1*}

¹Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS, Brasil;

²Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor para correspondência: fpbortol@ufrgs.br

Resumo

A morfologia espermática está entre as maiores causas de descarte de reprodutores nas centrais de difusão genética e, quando identificada precocemente, significa uma redução nos custos com reprodutores ociosos. O estudo objetivou avaliar a possibilidade de utilização de características testiculares (consistência à palpação manual, consistência à tonometria – tônus, ecogenicidade da imagem ultrassonográfica – em pixels, e heterogeneidade da ecogenicidade – em pixels) na identificação de reprodutores suínos com baixa qualidade de morfologia espermática. Foram avaliados 402 machos com idade média de $18,5 \pm 8,8$ meses, de cinco centrais de difusão genética. A avaliação espermática foi utilizada como critério de aptidão, sendo considerados aptos os reprodutores com menos de 20% de defeitos espermáticos, não ultrapassando o limite de 5% para defeitos de cabeça, acrossoma, colo e peça intermediária e 10% para defeitos de cauda (dobrada ou enrolada) e gota citoplasmática proximal. A porcentagem de animais aptos segundo a morfologia espermática foi de 71,9%. O tônus teve correlação positiva ($P \leq 0,05$) moderada com a consistência à palpação manual ($r = 0,64$). A heterogeneidade testicular foi fracamente correlacionada com a ecogenicidade ($r = 0,39$; $P \leq 0,05$) e com o percentual de anormalidades espermáticas ($r = 0,11$). Foram comparados os valores das características testiculares entre machos considerados aptos e inaptos, sendo a média de tônus inferior nos machos aptos ($P = 0,04$). A possível associação das características testiculares com o percentual de defeitos espermáticos foi analisada por regressão logística, incluindo as características (consistência à palpação manual, tônus, ecogenicidade e heterogeneidade do parênquima testicular) como variáveis contínuas ou classificatórias. A partir dos valores obtidos, foram criadas 4 classes de consistência à palpação e de tônus e 5 classes de ecogenicidade e heterogeneidade do parênquima testicular. Foi obtido um ponto de corte de 5,03mm, baseado no tônus testicular, para discriminar animais aptos e inaptos e maiores valores de tônus (variável contínua) diminuiram a chance dos machos serem aptos, no entanto, com baixo poder discriminatório ($AUC = 0,66$). A probabilidade de ocorrência de aptidão tendeu a ser menor na classe de tônus 4 ($P = 0,07$). Menores valores de tônus estão associados à maior porcentagem de normalidades espermáticas em suínos, auxiliando na identificação de animais com alta qualidade espermática.

Palavras-chave: andrologia, ultrassonografia, tônus, anormalidade espermática, sêmen.

Abstract

Sperm morphology is an important cause of male culling in boar studs and if early detected may lead to a reduction on costs of exceeded males. The study aimed to evaluate the possibility for using testicular traits (testicular consistency by manual palpation and consistency by tonometry – tone, echogenicity by ultrasonography - pixels and heterogeneity of the echogenicity – pixels) on the identification of boars with high sperm morphology quality. Sperm evaluation was used as criteria for breeding soundness, being considered as satisfactory boars with less than 20% of total sperm abnormalities, with an upper limit of 5% head, acrosome, neck and mid piece defects and 10% of tail (coiled and bent) e proximal cytoplasmic droplet. The percentage of satisfactory boars was 71.9%. Tone was positively correlated ($P \leq 0.05$) with consistency by manual palpation ($r = 0.64$). Testicular heterogeneity was weakly correlated ($P \leq 0.05$) with echogenicity ($r = 0.39$) and with percentage of sperm abnormalities ($r = 0.11$). It was compared the values of testicular traits between satisfactory and unsatisfactory boars, and a lower mean of tone was found on satisfactory boars ($P = 0.04$). The possible association of testicular traits with the percentage of sperm defects was analyzed by logistic regression, including the traits (consistency by manual palpation, tone, echogenicity and heterogeneity) as continuous and categorical variables. Considering the values obtained, 4 classes were created for consistency by manual palpation and tone and 5 classes were created for echogenicity and heterogeneity of the testicular parenchyma. It was obtained a cut-off value of 5.03mm, based on testicular tone, to discriminate satisfactory and unsatisfactory boars and higher values of tone (as continuous variable) decreased the chance of boars to be satisfactory, however with low discriminatory power ($AUC = 0.66$). The probability of occurrence of satisfactory boars tended to be lower on class 4 of tone ($P = 0.07$). Lower values of tone are associated with higher percentage of sperm normality, contributing to the identification of boars with high sperm quality.

Key words: *Andrology, ultrasonography, tone, sperm abnormality, semen.*

Introdução

A eficiência do rebanho suíno está relacionada com o potencial genético e reprodutivo dos cachacos. Estima-se que anualmente um reprodutor possa ser utilizado para a inseminação de 150 a 250 fêmeas nas coberturas com deposição intracervical de doses inseminantes (ALTHOUSE, 2014). Com isso, houve uma redução no plantel de machos que possibilitou melhoramento do índice genético e gerou uma necessidade ainda maior de maximizar a capacidade reprodutiva desses animais (KNOX, 2014). Em centrais de difusão genética (CDG), as causas mais frequentes de descarte de reprodutores estão relacionadas ao baixo mérito genético, morfologia espermática de má qualidade, falhas reprodutivas e problemas locomotores, que causam um impacto econômico negativo na central. A utilização de reprodutores subférteis também pode ter

um impacto negativo no resultado produtivo de centenas de matrizes, reduzindo índices como taxa de parição e tamanho de leitegada. Nesse contexto, o exame andrológico criterioso é uma ferramenta útil na avaliação dos reprodutores (WEITZE, 2010). No entanto, apesar do impacto econômico que o reprodutor pode gerar, nem sempre a avaliação da aptidão reprodutiva dos cachacos recebe a atenção necessária (FLOWERS & ALHUSEN, 1992).

O exame clínico do trato genital inclui a avaliação do sistema locomotor, escroto, prepúcio, pênis, testículos e epidídimos. Nos testículos, avalia-se a forma, tamanho, simetria, localização e consistência (SHIPLEY, 1999). A consistência é aceita como indicador da qualidade espermática (HAHN et al., 1969), uma vez que, processos degenerativos nos testículos já foram associados com distúrbios transitórios ou permanentes na espermatogênese em bovinos (COULTER & FOOTE, 1979; VAN CAMP, 1997). Os quadros de degeneração aguda podem causar flacidez, mas quando evoluem, para forma crônica, causam fibrose testicular. O método de eleição para a avaliação do tônus testicular é a palpação manual (CBRA, 2013), pela qual se atribui um escore variando de 1 (muito flácido) a 5 (muito rígido). No entanto, a subjetividade do exame e a variação nos valores atribuídos por diferentes examinadores são desvantagens do método. O tonômetro é um equipamento que pode ser utilizado para tornar essa avaliação mais objetiva. O aparelho mostra em milímetros a deflexão resultante do contato de uma haste com a superfície testicular (HAHN et al., 1969) que pode, ser transformada em uma força segundo o deslocamento gerado. A correlação dos valores obtidos à tonometria entre diferentes examinadores já foi testada e os valores foram altos 0,89 a 0,99 (HAHN et al., 1969), mostrando a alta repetitividade entre avaliações de diferentes examinadores.

O exame ultrassonográfico dos testículos fornece dados do parênquima testicular em intensidade de pixels (escala de cinza) de modo não invasivo. Em bovinos, esse exame tem sido utilizado para examinar os efeitos da degeneração testicular induzida por incidência solar e sua associação com porcentagem de células espermáticas anormais (BRITO et al., 2003) e fertilidade (BRITO et al., 2012). Em carneiros, Ahmadi et al. (2013) concluem que a ecotextura está associada à composição do parênquima testicular, podendo influenciar a espermatogênese. Em caninos, Moxon et al. (2015) constataram que a ecogenicidade está negativamente correlacionada com a porcentagem de células morfolologicamente normais ($r = -0,455$; $P = 0,003$). Em suínos, há relatos da utilização do exame ultrassonográfico testicular na avaliação do diâmetro

testicular e sua associação com a produção espermática (CLARK et al., 2003), para acompanhar as fases da puberdade (FORD & WISE, 2011), qualidade espermática em animais com hidrocele (CASPARI et al., 2012) e para avaliar animais de diferentes raças quanto a volume, concentração do ejaculado e motilidade das células espermáticas (PINHO et al., 2015). No entanto não há estudos que verificam se existe uma associação da ecogenicidade do parênquima testicular com a morfologia espermática.

A necessidade de métodos mais precisos, para avaliar os reprodutores, é constante na busca da maximização da eficiência reprodutiva em suínos, possibilitando o descarte precoce de animais com baixa aptidão reprodutiva. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização dos exames de consistência à palpação, consistência à tonometria (tônus) e ultrassonografia testicular (ecogenicidade e heterogeneidade da ecogenicidade) como ferramentas na identificação de animais com qualidade morfológica espermática comprometida.

Material e Métodos

O delineamento experimental do projeto desenvolvido foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número 31329).

Local e período de execução

O estudo foi realizado entre os meses de maio e julho do ano de 2016, em cinco centrais de difusão genética tecnificadas, sendo duas delas localizadas no estado do Rio Grande do Sul e três no estado de Santa Catarina, Brasil. As análises de morfologia espermática foram realizadas no Setor de Suínos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Animais e instalações

Foram utilizados 402 reprodutores suínos (50, 121, 94, 85 e 52 das centrais A, B, C, D e E, respectivamente), em regime de uma coleta semanal, com idade de 7 a 40 meses ($18,5 \pm 8,8$; média \pm DP), de cinco linhagens genéticas. Os animais eram alojados sob conforto térmico, em gaiolas individuais com dimensões variando de 65 a 70 cm de largura, 2,20 a 2,40 m de comprimento. O acesso à água foi *ad libitum* e foram fornecidos 2,1 a 2,4 kg de ração comercial baseada em milho e soja (15% de proteína bruta, 0,55% de lisina digestível e 3300 kcal EM/kg).

Avaliação da consistência testicular

Para a avaliação da consistência testicular, foram utilizados dois métodos: palpação manual e tonometria. O método de palpação manual seguiu as normas propostas pelo CBRA (2013), pelas quais o órgão deve ser fixado e levemente tracionado no sentido dorso-cranial, proporcionando distensão leve. Cada testículo foi classificado pelo mesmo avaliador, com escore variando de 1 a 5, sendo 1 atribuído a testículos muito flácidos e 5 atribuído para testículos muito rígidos.

Para a tonometria foi utilizado um tonômetro digital (Starrett®, modelo 3600, Athol, MA, USA), adaptado pela equipe do Laboratório de Mecânica do Instituto de Física da UFRGS, com escala de 0 a 12 mm, correspondendo à força de 0 a 2,075 N. O método utilizado foi uma adaptação do proposto por HAHN et al. (1969), em que o aparelho foi posicionado na região média dos testículos, perpendicular à face caudal e pressionado para aferição da deflexão da haste de metal. Foram realizadas 4 aferições no mesmo ponto de cada testículo, obtendo-se a média aritmética dessas aferições. Para o cálculo da conversão de milímetros para força em Newtons, a partir da deflexão da haste, pode ser utilizada a fórmula: $F = K \cdot d$, na qual:

F = força em Newtons;

K= constante elástica da mola (708,8139);

d= deformação da mola * deslocamento em mm (107,90057*x).

Avaliação ultrassonográfica

O exame de ultrassonografia testicular foi realizado com auxílio de uma solução de carboximetilcelulose, aplicada de forma tópica no escroto e na superfície do transdutor. Para este exame foi utilizado um aparelho de ultrassom (Mindray®, modelo DP2200 Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China), com transdutor linear de 7,5 MHz (Mindray®, modelo 75L50EAVet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China). Os testículos foram fixados pela tração no sentido dorso-cranial, quando necessário. O transdutor era posicionado no ponto médio de cada testículo, perpendicular ao eixo longitudinal da estrutura, na superfície caudal, produzindo uma imagem bidimensional. Quando o mediastino era identificado em seu maior diâmetro (área hiperecoica), claramente distinto do parênquima testicular, a imagem era congelada e salva em um dispositivo móvel (FORD & WISE, 2011).

As imagens foram analisadas, posteriormente, com o programa ImageJ (National Institute of Health, USA), para mensuração da ecogenicidade (intensidade de pixels, variando de 0 a 255) e heterogeneidade (desvio-padrão da ecogenicidade) do parênquima testicular. Foi selecionado um ponto de referência, delimitado por um quadrado de 200 mm² (PINHO et al., 2013), localizado no polo dorsal do testículo, excluindo-se o mediastino, pele, túnicas e epidídimo (CLARK et al., 2003).

Avaliação de morfologia espermática

Para o exame de morfologia dos espermatozoides, alíquotas de 20 µL de ejaculado foram diluídas em 1 mL de solução formol citrato (96 mL de uma solução de citrato de sódio 2,94% e 4 mL de formalina), previamente aquecida (32 a 35°C). Foram contadas 200 células em microscópio óptico com contraste de fase (Olympus, modelo BX41, Olympus Latin America Inc., Miami, USA) e aumento de 1000x, para obtenção da porcentagem de defeitos de acrossoma, cabeça, formas teratológicas, colo, peça intermediária, cauda dobrada, cauda enrolada e gotas citoplasmáticas proximal e distal. A partir dos resultados obtidos no exame de morfologia espermática, os animais foram classificados como aptos ou inaptos para reprodução. Animais considerados aptos apresentaram menos de 20% de defeitos totais e não excediam os limites de 5% para defeitos de cabeça, acrossoma, peça intermediária ou colo e 10% de defeitos de gota citoplasmática proximal, cauda dobrada ou enrolada. Não foi considerada como critério de classificação a presença de gota citoplasmática distal (CBRA, 2013).

Análise Estatística

Os dados foram analisados usando a versão 9.2 do programa SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Os níveis de significância e tendência foram de 5% ($P \leq 0,05$) e 10% ($P > 0,05$ e $\leq 0,10$), respectivamente.

Para as análises estatísticas foram obtidas as médias dos testículos direito e esquerdo de cada animal para todas as variáveis testiculares estudadas. Foi utilizado o coeficiente de Pearson ou de Spearman (no caso da consistência à palpação) para definir a correlação (PROC CORR) entre as características testiculares estudadas, além de sua correlação com o percentual total de defeitos morfológicos.

Foi efetuada análise de variância (PROC GLIMMIX) para verificar se os valores médios das características testiculares foram diferentes entre os machos aptos e inaptos.

Modelos de regressão logística (PROC GLIMMIX) foram utilizados para verificar a associação da idade e das características testiculares com a aptidão dos reprodutores. A resposta binária foi considerada como tendo ou não aptidão, com base na morfologia espermática. Em uma primeira análise, as variáveis estudadas foram incluídas como valores contínuos. Em seguida, foram testadas como variáveis classificatórias, de acordo com as classes apresentadas na Tabela 1. Os machos incluídos nas classes inferior e superior possuíam, respectivamente, valores próximos da média menos um desvio-padrão e média mais um desvio-padrão, para cada característica testicular em questão. Em ambas as análises, as características testiculares foram incluídas como efeito fixo e a central como efeito aleatório.

Tabela 1. Classes de consistência testicular à palpação manual e tonometria, ecogenicidade e heterogeneidade.

Itens	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Consistência ^{&}	1-2,25 n=83	2,50-2,75 n=97	3,0 n=174	3,25-4,0 n=48	-
Tônus (mm) [#]	2,68-4,25 n=78	4,26-4,85 n=85	4,86-5,85 n=175	5,86-7,80 n=64	-
Ecogenicidade (pixels)	40,90-67,0 n=81	67,05-76,0 n=83	76,05-83,0 n=78	83,05-92,0 n=87	92,01-121,95 n=73
Heterogeneidade (pixels)	10,40-15,5 n=74	15,51-16,89 n=91	16,9-18,0 n=81	18,01-19,19 n=91	19,20-25,25 n=65

[&] Escore variando de 1 a 5, sendo 1 atribuído a testículos muito flácidos e 5 atribuído para testículos muito rígidos. Não foi observado nenhum macho com escore 5.

[#] Nenhum macho foi observado com valor acima de 7,80, sendo que o valor máximo possível de ser registrado com o tonômetro é de 12 mm. O valor máximo de 12 mm corresponde a 2,07 N.

A habilidade para a discriminação entre animais aptos ou inaptos foi analisada usando a curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*). Foi obtida a AUC (*Area Under the Curve*), que varia de 0,5 a 1,0, sendo valores próximos de 0,5 como não tendo habilidade de discriminação e 1,0, como tendo habilidade perfeita. Em seguida, foi obtido o ponto de corte da consistência à tonometria, o qual consiste no ponto com valor máximo combinado de sensibilidade e especificidade.

Resultados

As médias gerais (média \pm DP) de consistência à palpação, tônus, ecogenicidade e heterogeneidade da ecogenicidade foram $2,72 \pm 0,48$, $4,99 \pm 0,88$ mm, $79,11 \pm 14,85$ pixels e $17,46 \pm 2,15$ pixels, respectivamente. A porcentagem geral de reprodutores considerados aptos, com base na morfologia espermática, foi 71,9%. O percentual total de defeitos espermáticos foi $14,96\% \pm 17,10$, sendo 7,79%, 5,07%, 0,90%, 0,85%, 0,22% e 0,10% defeitos de cauda, gota citoplasmática proximal, cabeça, peça intermediária, acrossoma e colo, respectivamente. Não houve efeito da idade nas características testiculares avaliadas e na aptidão dos reprodutores avaliados ($P > 0,05$).

O tônus teve correlação positiva moderada com a consistência à palpação manual e fraca com a ecogenicidade ($P \leq 0,05$). A heterogeneidade foi fracamente correlacionada ($P \leq 0,05$) com a ecogenicidade e com o percentual de defeitos espermáticos (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre características testiculares, avaliadas por palpação manual (consistência), tonometria (tônus) ou ultrassonografia (ecogenicidade e heterogeneidade), e percentual total de defeitos espermáticos.

Características testiculares	Tônus	Ecogenicidade	Heterogeneidade	Defeitos espermáticos
Consistência	0,64**	0,04	-0,02	0,05
Tônus	-	0,11*	-0,04	0,06
Ecogenicidade	-	-	0,39**	0,08
Heterogeneidade	-	-	-	0,11*

* $P \leq 0,05$ ** $P < 0,0001$

O tônus testicular foi superior em animais inaptos ($P < 0,05$), quando comparados aos aptos, mas não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) na consistência à palpação, ecogenicidade e heterogeneidade entre animais aptos e inaptos (Tabela 3).

Tabela 3. Valores das características testiculares (Médias \pm erro padrão da média) nos machos classificados como aptos ou inaptos com base na morfologia espermática.

Itens	Consistência (Escala 1-5)	Tônus (mm)	Ecogenicidade (pixels)	Heterogeneidade (pixels)
Aptos (n=289)	2,73 \pm 0,09	5,03 \pm 0,16	79,59 \pm 3,17	17,18 \pm 0,48
Inaptos (n=113)	2,79 \pm 0,10	5,22 \pm 0,17	81,39 \pm 3,33	17,51 \pm 0,50
Valor de P	0,29	0,04	0,25	0,14

No modelo em que as características testiculares foram incluídas como variáveis contínuas, houve associação entre tônus ($P= 0,04$) e aptidão, mas a consistência à palpação manual, a ecogenicidade e a heterogeneidade testicular não foram associadas ($P > 0,05$) com a aptidão dos reprodutores.

Na análise de curva ROC do tônus, o ponto de corte encontrado foi de 5,03 mm. A variável, quando considerada de forma contínua, demonstrou habilidade limitada (AUC= 0,66) na predição de animais aptos quanto à morfologia espermática (Figura 1).

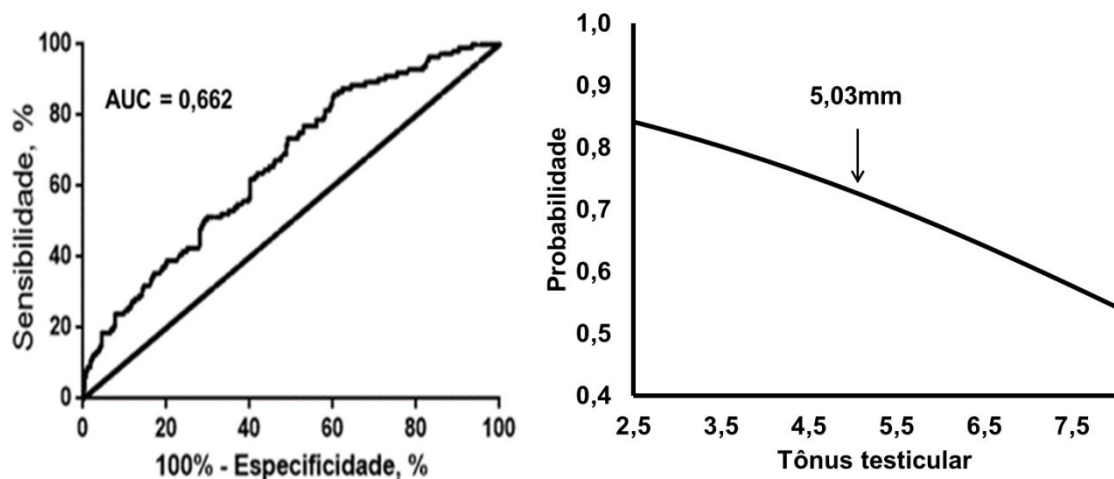


Figura 1. À esquerda, painel da curva ROC, na qual a proporção do verdadeiro positivo (sensibilidade) é plotada contra a proporção do falso positivo (100-especificidade). À direita, probabilidade de predição de aptidão dos reprodutores estimada com uso de modelos de regressão logística. Seta (\downarrow) indica o melhor ponto de corte da consistência à tonometria para a aptidão.

Quando analisadas como variáveis classificatórias, a consistência à palpação manual e heterogeneidade testicular não foram associadas ($P > 0,05$) com a aptidão dos machos (Tabela 4). Foi observada tendência ($P = 0,07$) de menor chance de presença de animais aptos na classe 4 de tônus e na classe 5 de escala de cinza ($P = 0,08$).

Tabela 4. Porcentagem de animais classificados como aptos com base na morfologia espermática de acordo com as classes de características testiculares

Características	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Consistência	68,7	74,2	73,0	68,7	-
Tônus*, mm	73,1	78,8	74,3	54,7	-
Ecogenicidade*, pixels	71,6	79,5	73,1	77,0	56,2
Heterogeneidade, pixels	77,0	71,4	72,8	69,2	69,2

* $P < 0,10$.

Para detalhes dos critérios usados para a definição das classes, consultar a Tabela 1.

Discussão

Com os avanços observados na inseminação artificial em suínos, busca-se otimizar o uso do reprodutor. O exame andrológico é uma ferramenta que pode ser empregada para esse fim, mas o que se observa na prática é apenas a avaliação do ejaculado e pouca atenção é dada ao reprodutor. Por questão práticas, métodos precisos e de fácil execução devem ser testados para que o exame andrológico seja realmente aplicado. Sendo assim, o objetivo foi verificar se a avaliação da consistência, tônus e ecogenicidade podem ser inseridos no exame andrológico como indicativos da qualidade espermática dos reprodutores. Foi constatado que alto valor de tônus e ecogenicidade testicular podem indicar animais com alta porcentagem de anormalidades espermáticas.

Com base nas amostras de sêmen submetidas à análise de morfologia espermática, 28,1% dos animais avaliados teriam o ejaculado descartado por não atingirem os parâmetros mínimos de qualidade. Utilizando parâmetros alemães (até 25% de defeitos totais, e não ultrapassando 5% de cabeça, 10% de acrossoma, 15% de gota citoplasmática, 15% de cauda dobrada e 15% de outros defeitos), Schulze et al. (2014) observaram que 36,7% das amostras não alcançaram estes parâmetros. Esses

autores observaram que amostras oriundas de machos com menos de 8 meses de idade tinham maior percentual de defeitos espermáticos do que machos mais velhos. É possível que o menor percentual de ejaculados que não satisfizeram os critérios de qualidade morfológica, observado no presente estudo, seja devido à diferença na idade dos animais analisados por Schulze et al. (2014). No presente estudo, as amostras de machos com idade de 8 até 10 meses representaram, 17,2% do total de amostras, em contraste com 45,5% no estudo de Schulze et al. (2014).

A consistência de cada testículo é comumente determinada através da palpação manual (WEITZE, 2010), variando de muito flácido a tenso, sendo que a consistência ideal é a firme-elástica (KEßLER, 2010). No presente estudo, 67,4% dos animais tiveram consistência à palpação que variou de 2,5 a 3,0 (firme-elástica), indicando que a maioria dos animais estava na faixa de consistência testicular considerada normal (ALTHOUSE, 2014). Apenas 7 animais tiveram os testículos classificados como muito flácidos (escore 1) e nenhum como tenso (escore 5). Cabe salientar que, por se tratar de animais em rotina de coleta e por estarem em condições ambientais de conforto térmico, as chances de alterações na consistência eram reduzidas. A consistência testicular à palpação já foi objeto de estudo em bovinos (FITZPATRICK et al., 2002) e cães (SOUZA et al., 2015). Em bovinos, Fitzpatrick et al. (2002) não encontraram nenhuma correlação significativa entre a consistência testicular à palpação manual e anormalidades espermáticas, o que está de acordo com o observado no presente estudo, para reprodutores suínos. Em cães com quadros graves de fertilidade, essa associação foi mais facilmente detectada visto que Souza et al. (2015) observaram que os cães inférteis possuíam consistência testicular flácida à palpação e alto percentual de defeitos espermáticos. Na rotina de centrais de difusão genética de suínos, a morfologia espermática é analisada periodicamente. Dessa forma, a manutenção de cachos com a qualidade espermática comprometida por longos períodos não é uma realidade nas condições comerciais de produção de doses de sêmen suíno, o que pode ter contribuído para os resultados obtidos.

Apesar da importância da avaliação da consistência testicular para a identificação de processos degenerativos, o método preconizado pelo CBRA (palpação manual) é subjetivo. Sendo assim, foi investigado na espécie suína a mensuração da consistência através da tonometria (ESBENSHADE et al., 1979; MAHONE, 1979; KEßLER, 2010), tornando o resultado numérico e mais objetivo. O coeficiente de correlação em bovinos, quando comparados valores obtidos por examinadores

diferentes foi bastante alto, variando entre 0,89 e 0,99, o que demonstra que o método possui menor subjetividade do que a palpação manual (HAHN et al., 1969). Em trabalho recente realizado em suínos, foram encontradas correlações significativas ($P < 0,01$), com coeficientes de 0,70 a 0,73 em diferentes CPS entre a avaliação de consistência testicular a partir da palpação manual e da tonometria (PASCHOAL et al., 2016), o que demonstra que a tonometria está associada ao método sugerido pelo CBRA (2013). No presente estudo foi observada uma correlação de 0,64 ($P < 0,0001$) entre os métodos de avaliação da consistência, o que permitiu explorar o método como um complemento a avaliação da palpação manual no exame andrológico.

Uma correlação positiva entre o tônus testicular e a porcentagem de células espermáticas morfolologicamente normais foi relatada, pela primeira vez, em bovinos, por Hahn et al. (1969). No entanto, a correlação entre tônus e percentual total de defeitos espermáticos não foi significativa no presente estudo. Kastelic et al. (2001) também não observaram correlação entre o tônus e total de defeitos espermáticos em touros Angus, com aproximadamente 16 meses. Degenerações testiculares influenciam a qualidade espermática (ARTEAGA et al., 2005; HOFLACK et al., 2008) e podem gerar alterações na consistência testicular (NASCIMENTO & SANTOS, 2003). Em quadros de degeneração, inicialmente a consistência testicular é flácida e, se não removida a causa, torna-se crônica com redução do tamanho, atrofia e fibrose, e a consistência se torna mais firme. Nestes casos pode ser observada alteração na espermatogênese (VAN CAMP, 1997). No entanto, em degenerações leves ou moderadas há possibilidade de recuperação da função testicular após a remoção da causa (NASCIMENTO & SANTOS, 2003), mas a cicatrização do processo ainda poderia ser verificada à tonometria. Dessa forma, infere-se que a tendência de redução no percentual de animais aptos, observada em machos de maior tonometria (classe 4), pode ser em decorrência de processos degenerativos leves a moderados, transitórios, que se resolveram.

Considerando que alto percentual de defeitos espermáticos é um dos critérios para o descarte de reprodutores nas centrais de difusão genética, machos com degeneração testicular grave e alto percentual de anormalidades espermáticas dificilmente estariam disponíveis para serem avaliados no presente estudo. Embora a capacidade discriminatória, com base na AUC, tenha sido baixa para o ponto de corte de 5,03 mm, a separação em classes mostrou que machos com tônus abaixo de 5,85mm são mais propensos a terem baixa porcentagem de defeitos espermáticos. Esses resultados apontam para a necessidade de investigação sistemática do tônus testicular, mesmo em

machos destinados ao descarte, de modo a estabelecer a real magnitude da relação entre tónus e morfologia espermática.

O aspecto do parênquima pode ser investigado pela ultrassonografia. Pinho et al. (2015) avaliaram animais de diferentes raças e buscaram associações entre a ecogenicidade do parênquima testicular e características seminais como volume, concentração e motilidade espermática, mas nenhuma associação foi observada entre esses parâmetros e a avaliação ultrassonográfica. Em nosso estudo, apesar de não ter sido encontrada correlação entre a ecogenicidade e o percentual de defeitos espermáticos, foi observada uma tendência ($P= 0,08$) de redução na aptidão dos animais em classe de maior ecogenicidade testicular (classe 5: 92,0-121,9 pixels). Pode ser especulado que animais dessa classe teriam passado por processos degenerativos transitórios, leves ou moderados, que não causaram seu descarte, mas resultaram em algum grau de fibrose. Ao investigar o efeito da degeneração por calor, Arteaga et al. (2005) verificaram uma redução na ecogenicidade e, no mesmo período, na qualidade espermática. Apesar da degeneração aguda ter ficado evidente na baixa ecogenicidade da imagem, não foi observada correlação entre ecotextura testicular e alterações espermáticas, corroborando com o observado no presente estudo.

Esse foi o primeiro estudo em que foi avaliada a associação da heterogeneidade do parênquima testicular de suínos com a qualidade das células espermáticas. Em outras espécies, os resultados têm sido controversos, pois em cães a heterogeneidade do parênquima testicular não foi correlacionada com a porcentagem de células morfologicamente normais (MOXON et al., 2015; ENGLAND et al., 2016), mas em carneiros, foi correlacionada ($r= -0,73$) negativamente (AHMADI et al., 2012). No presente estudo, foi observado que testículos mais heterogêneos podem ter melhor qualidade espermática, mas a variável explicaria apenas 1% da variação. É importante salientar que a heterogeneidade testicular foi mensurada como a variação da intensidade de pixels, sendo assim, tanto testículos com baixa ecogenicidade e muitos focos hiperecogênicos, quanto muito ecogênicos com focos hipoecóicos, poderiam resultar na mesma heterogeneidade, sem indicar algum processo degenerativo.

Conclusão

Menores valores de tónus e ecogenicidade estão associados à maior aptidão, baseada na morfologia espermática, em suínos. Portanto, a utilização da tonometria e da

ultrassonografia testicular em suínos são técnicas promissoras que devem ser aprimoradas, para utilização na rotina das centrais.

Referências

- AHMADI, B.; LAU, C. P. S.; GIFFIN, J. et al. Suitability of epididymal and testicular ultrasonography and computerized image analysis for assessment of current and future semen quality in the ram. **Experimental Biology and Medicine**. v. 237, p. 186-193. 2012.
- AHMADI, B.; MIRSHAHI, A.; GIFFIN, J.; et al. Preliminary assessment of the quantitative relationships between testicular tissue composition and ultrasonographic image attributes in the ram. **The Veterinary Journal**. v. 198, p – 282-285. 2013.
- ALTHOUSE, G. C. Applied Andrology in Swine. In CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. P. **Animal Andrology: Theories and Applications**. 1st edition. CABInternacional. Londres. p. 404- 417. 2014.
- ARTEAGA, A. A., BARTH, A. D., BRITO, L. F. C. Relationships between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**. v.64, p.408-415. 2005.
- BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T. B. et al. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**. v. 79, p. 1-15. 2003.
- BRITO, L. F.; BARTH, A. D.; WILDE, R. E. et al. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production and quantitative testicular histology in beef bulls. **Theriogenology**. v.78, p. 69-78. 2012.
- CASPARI, K.; HENNING, H.; SCHALLER, C., et al. Semen quality in boar with a complex hydrocele. **Journal of Swine Health and Production**. v.20, n.4, p.174-178. 2012.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Introdução ao exame andrológico – Fundamentos. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3^a edição. Belo Horizonte CBRA. cap.1 p.15. 2013.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Suínos. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3^a edição. Belo Horizonte CBRA. cap.7, p. 47 – 50. 2013.
- CLARK, S. G.; SCHAEFFER, D.J.; ALTHOUSE, G. C. B-Mode ultrasonographic evaluation of paired testicular diameter of mature boars in relation to average total sperm numbers. **Theriogenology**. v. 60, p. 1011-1023. 2003.
- COULTER G. H.; FOOTE, R. H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: A review. **Theriogenology**. v.11, n.4, p. 297-311. 1979.

- ENGLAND, G. C. W.; BRIGHT, L.; PRITCHARD, B. et al. Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 51 (Suppl. 3), p. 1-6. 2016.
- ESBENSHADE, K. L.; SINGLETON, W. L.; CLEGG, E. D. et al. Effect of housing management on reproductive development and performance of young boars. **Journal of Animal Science**. v. 48, n.2, p. 246- 250, 1979.
- FITZPATRICK, L. A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; et al. Bull selection and use in northern Australia Part2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**. v.71, p.39-79. 2002.
- FLOWERS, W. L.; ALHUSEN, H. D. Reproductive performance and estimates of labor requirements associated with combinations of artificial insemination and natural service in swine. **Journal of Animal Science**. v. 70, p. 615-621. 1992.
- FORD, J. J.; WISE T. H. Assessment of pubertal development of boars derived from ultrasonographic determination of testicular diameter. **Theriogenology**. v. 75, p. 241-247. 2010.
- HAHN, J.; FOOTE, R.H.; CRANCH, E. T. Tonometer for measuring testicular consistency of bulls to predict semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 18 (Suppl.1), p.483-489. 1969.
- HOFACK, G.; BROECK W.V.; MAES, D. et al., Testicular dysfunction is responsible for low sperm quality in Belgian Blues bulls. **Theriogenology**. v.69, n.3, p.323-332. 2008.
- KASTELIC, J. P; COOK, R. B.; PIERSON, R. A. Relationships among scrotal and testicular characteristic, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.65, p.111-115. 2001.
- KEBLER, M. R. H. Sonográfica das pesquisas do epidídimo no macho. Tese de doutorado em medicina veterinária, Universidade de Gießen, Alemanha, p. 48-54, 2010.
- KNOX, R. V. Impact of swine reproduction technologies on pig and global food production. In: LAMB G. C., DILOREZENZO N. (eds), **Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production**. New York: Springer. p.131-160. 2014.
- MAHONE, J. P.; BERGER, T.; CLEGG, E. D. et al. Photoinduction of puberty in boars during naturally occurring short day lengths. **Journal of Animal Science**. v. 48, n. 5, p. 1159-1164, 1979.
- MOXON, R.; BRIGHT, L.; PRITCHARD, B. et al. Digital image analysis of testicular and prostatic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. **Animal Reproduction Science**. v.160, p. 112-119. 2015.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan. Cap.8: Patologias da bolsa escrotal e dos testículos. p.93-116. 2003.

PASCHOAL, A. F. L.; SANTOS, J. T.; GIANLUPPI, R. D. F. et al., relação entre tónus e consistência testicular com morfologia espermática em reprodutores suínos. In: VIII Fórum Internacional de Suinocultura. Concórdia, SC. 2016.

PINHO, R. O.; COSTA, D. S.; SIQUEIRA, J. B. et al. Correlation of sexual maturity with testicular echotexture in Young nelore bulls. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 41, p. 1-7. 2013.

PINHO, R. O.; CAMILO, B. S.; LIMA, D. M. A. et al. The use of ultrasonography in the reproductive evaluation of boars. In: VIII INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, n.8, Illinois. Short Talk. Illinois, USA: Wiley Blackwell. 2015.

SCHULZE, M; BUDER, S.; RÜDIGER, K. et al. Influences on semen traits used for selection of young AI boars. **Animal Reproduction Science**. v.148, p. 164-170. 2014.

SHIPLEY, C. F. Breeding soundness examination of the boar. **Swine health production**. v.7 (Suppl.3), p. 117-120. 1999.

SOUZA, M. B.; ENGLAND, G. C. W.; MOTA FILHO, A. C. et al. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. **Theriogenology**. v.84, p. 805-810. 2015.

VAN CAMP, S. D. Common causes of infertility in the bull. **Bull Infertility**.v.20, p. 749-720. 1997.

WEITZE, K. F. Resumo: Seleção de suínos machos jovens como doadores de sêmen. I **Simpósio Satélite do V SINSUI**. Porto Alegre, p.1-13. 2010.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Rotineiramente são realizadas avaliações referentes a cada ejaculado coletado nas centrais de difusão genética, sendo analisada a motilidade e o volume do ejaculado. No entanto essas características não refletem completamente a saúde e capacidade reprodutiva dos machos e pouca atenção é dada às condições de sua saúde. Dessa forma, esse estudo foi válido para detectar métodos simples de indicar animais de má qualidade espermática. Primeiramente, é importante salientar que houve uma elevada porcentagem de animais com alta porcentagem de células espermáticas anormais, o que enfatiza a importância de examinar os reprodutores, talvez deva ser considerado aumentar a frequência de análise morfológica nas centrais. Um resultado bastante válido foi a correlação encontrada entre a mensuração da consistência à palpação e à tonometria, que demonstra que a avaliação que trazia valores subjetivos pode ser realizada de forma rápida e simples, pela tonometria e que isso gera dados objetivos da consistência testicular. A tonometria está correlacionada com a qualidade espermática, indicando que os animais com tônus testicular muito alto precisam receber mais atenção e inclusive serem avaliados quanto à morfologia espermática com maior frequência. A ultrassonografia testicular também pode ser utilizada na identificação de animais aptos à reprodução, no entanto esse método ainda precisa ser mais explorado.

5. REFERÊNCIAS

- ABCS - Associação Brasileira dos Criadores de Suínos (ABCS). A suinocultura do Brasil e as suas dimensões. **Mapeamento da suinocultura brasileira** 1.ed, Gráfica Qualytá, Brasília, p.37-57, 2016.
- ABDEL-RAZEK, ALI A. K. Development Changes of Bull (*Bos taurus*) genitália as evaluated by caliper and ultrasonography. **Reproduction of Domestic Animals**, v.40, p. 23-37,2005.
- AHMADI, B.; MIRSHAHI, A.; GIFFIN, J.; et al.; Preliminary assessment of the quantitative relationships between testicular tissue composition and ultrasonographic image attributes in the ram. **The Veterinary Journal**. v. 198, p – 282-285, 2013.
- ALAIS, P., FINK, M., RICHARD, B. Les imagesultrasonores. **La Recherche**, v.101, p.642-650. 1979.
- ALTHOUSE, G. C. Artificial insemination in swine: Boar stud management. In: YOUNGQUIST R. S.; THRELFALL, W. R. (2ed.) **Current therapy in large animal theriogenology** v2. Missouri. Saunders Elsevier. p.731 – 738. 2007.
- ALTHOUSE, G. C. Applied Andrology in Swine. In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. P. **Animal Andrology: Theories and Applications**. Londres. CABInternacional. Londres. p. 404- 417. 2014.
- BENNEMANN, P. E. Manejo reprodutivo do macho suíno - Sistemas de alojamento de machos doadores de sêmen. **Produção de suínos teoria e prática**. 1.ed. ABCS p.323-327. 2014.
- BORTOLOZZO F. P.; WENTZ, I; FERREIRA, F. M. et al. Exame do Ejaculado. In:BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P. E. et al. Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre: Pallotti. p. 69 -89. 2005.
- BORTOLOZZO, F. P.; BERNARDI, M. L.; BENNEMANN, P. E. et al., Inseminação Artificial em Suínos. In: GONÇALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (2ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução Animal**. São Paulo: ROCA, p.125-145. 2008.
- BORTOLOZZO, F. P.; MENEGAT. M. B.; MELLAGI, A. P. G. et al. New Artificial Insemination Technologies for Swine. **Reproduction of Domestic Animals**. v. 50 (Suppl. 2), p.80-84, 2015.
- BOTTE, M. F., et al. Le principe de l'échographie. **Echographie & Reproduction chez la truie**. INRA Paris, cap1: p.10-11. 1998.
- BOUTON, J. M., DENHEZ, M., EBOUE, F. Principe d'échographie ultrasonore. **Pratique de l'échographie em gynécologie et obstétrique**. Vigot Paris, p.7-22. 1984.
- BRIZ, M. D.; FÀBREGA, A. The boar spermatozoa. In BONET, S. CASA, I, HOLT, W. V. et al.(ed). **Boar Reproduction – Fundamental and New biotechnological trends**. Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 1st ed. p.3-48, 2013.

CARDILLI, D. J.; TONIOLLO, G. H., PASTORE, A. A. et al., Ultrassonografia testicular em bovinos jovens da raça nelore criados em sistema extensivo. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. v. 1, n.1, p. 75-83, 2012.

CARNIEL, P. Données de base de l'échographie. **Le point Vét.**v. 19 (Suppl. 105), p.199-212, 1987.

CARTEE, R. E., POWE, T. A., GRAY, B. W. et al. Ultrasonographic evaluation of normal boar testicles. **American Journal of Veterinarian Research**. V.47. p.2543-2548. 1986.

CARTEE, R. E. RUMPH, P. F. ABUZOID, S. et al. Ultrassonographic examination and measurement of ram testicles. **Theriogenology**. v.33.n.4.p. 867-875. 1990.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Introdução ao exame andrológico – Fundamentos. **Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal**. 3 edição. Belo Horizonte CBRA. cap.1 p.15. 2013.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Suínos. **Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal**. 3 edição. Belo Horizonte CBRA. cap.7, p. 47 - 50, 2013.

CHANDOLIA, R. K., HONARAMOOZ, A. OMEKE, B. C. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in Bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**. v.48, p.119-132, 1997.

COLENBRANDER, B.; FEITSMA, H.; GROOTEN, H. J. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 48, p. 207-215. 1993.

COULTER, G. H.; FOOTE, R. H. Effect of season of year of measurement on testicular growth and consistency of Holstein bulls. **Journal of animal science**. V.42, n.2, p. 434-438, 1976.

EILTS, B. E., PECHMAN, R. D. TAYLOR, H. W. et al. Ultrasonographic evaluation of induced testicular lesions in male goats. **American Journal of Veterinary Research**. V.50. p.1361- 1364. 1989.

ENGLAND, G. C. W.; BRIGHT, L.; PRITCHARD, B., et al. Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 51 (Suppl. 3), p. 1-6, 2016.

ESBENSHADE, K. L.; SINGLETON, W. L.; CLEGG, E. D. et al. Effect of housing management on reproductive development and performance of young boars. **Journal of Animal Science**. v. 48, n.2, p. 246- 250, 1979.

- EVANS, A. C. O., PIERSON, R. A., GARCIA, A. et al. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**. v.46, p.345-357, 1996.
- FITZPATRICK, L. A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; et al. Bull selection and use in northern Australia Part2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**. v.71, p.39-79. 2002.
- FLOWERS, W. L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.52, p.67-78. 1997.
- FLOWERS, W.L. An overview of anatomy and physiology of the boar. **Proceedings of the Midwest Boar Stud Conference II**. Missouri, USA. p. 6-14, 2004a.
- FLOWERS, W.L. Detailed Description of Sperm Motility/Morphology and Causes of Abnormalities. **Proceedings of the Midwest Boar Stud Conference II**. Missouri, USA. p. 15-22, 2004b.
- FONSECA, V. O. O touro no contexto da eficiência reprodutiva no rebanho. **II Simpósio Intenacional de produção de gado de corte**. P.383 – 386. 2000.
- FOXCROFT, G. R.; DYCK, M. K.; RUIZ-SANCHEZ, et al. Identifying usable semen. **Theriogenology**. V. 770, p. 1324-1336, 2008.
- FRANCO, C. S., FONSECA, V. O., GASTE, L. Potencial Reprodutivo de touros nelore acasalados coletivamente na proporção de um touro para 100 vacas. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. v.58, p.1156-1161. 2006.
- GÁBOR, G., SASSES, R. G., KASTELIC, J. P. Computer analyses of vídeo and ultrasonographic images for evaluationof Bull testes. **Theriogenology**, v. 50, p.223-228, 1998.
- GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**. v. 63, p. 431-444, 2005.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Spermatozoa and seminal plasma. In: HAFEZ, E. S. E. (ed) **Reproduction in far animals**, 7th Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, p. 96 a 109, 2000.
- GNEMMI, G.; LEFEBVRE, R. C. Ultrasound imaging of the bull reproductive tract: An important field of expertise for veterinarians. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.25 (Issue 3), p. 767-779, 2009.
- GODDARD P. J. General principles. **Veterinary Ultrasonography**, C.A.B. London, cap 1, p. 1-19. 1995.
- GOULETSOU, P. G.; AMIRIDIS, G. S.; CRIPPS, P. J., et al. Ultrasonographic appearence of clinically healthy testicles and epididymides of rams.**Theriogenology**. v. 59, p. 1959-1972, 2003.

GOULETSOU, P. G.; GALATOS, A. D.; LEONTIDES, L. S. Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volume in dog. **Animal Reproduction Science**. v. 108, p.1-12, 2008.

GRIFFIN, P. G., GINTHER, O. J. Research and application of ultrasonic imaging in reproductive biology. **Journal of Animal Science**.v.70, p. 953-972, 1992.

HAHN, J.; FOOTE, R.H.; CRANCH, E. T. Tonometer for measuring testicular consistency of bulls to predict semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 18 (Suppl.1), p.483-489, 1969.

JUNG, M.; RÜDIGER, K.; SCHULZE, M. *In vitro* measures for assessing boar semen fertility. **Reproduction of domestic animals**. v.50 (Suppl. 2), p. 20-24, 2015.

KASTELIC, J. P., COOK, R.B., PIERSON, R. A., et al. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production and seminal quality in 129 beef bulls. **Canadian Journal of Veterinary Research**.v.65, p. 111-115, 2001.

KEßLER, M. R. H. Sonographische untersuchungen des epididymis beim eber. Tese de doutorado em medicina veterinária, Universidade de Gießen, Gießen, Alemanha, p. 48-54, 2010.

KNOX, R. V., LEVIS, D., SAFRANSKI, T., et al. An update on North American boar stud practices. **Theriogenology**. v.70, p.1202-1208, 2008.

KNOX, R.V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, p. 83–93, 2016a.

KNOX, R. V. The physiology of sperm production and the reproductive management of boars for fertility. **Midwest Boar Stud Managers Conference (BSMC)** St. Louis Missouri. p.1-19. 2016b.

KOPP, C. SIRONEN, A; IJÄS, R, et al. Infertile boars with Knobbed and Immotile Short-tail Sperm Defects in the Finnish Yorkshire Breed. **Reproduction of Domestic Animals**. v. 43, p. 690-695. 2008.

LOVE, C. C. Ultrasonographic evaluation of the testis, epididymis and spermatic dorc of the satllion. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**.v.8, p.167-182, 1992.

MAHONE, J. P.; BERGER, T.; CLEGG, E. D. et al. Photoinduction of puberty in boars during naturally occurring short day lengths. **Journal of Animal Science**. v. 48, n. 5, p. 1159-1164, 1979.

MAPA - Instrução Normativa nº19, de 15 de fevereiro de 2002, disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br>.

MOXON, R.; BRIGHT, L.; PRITCHARD, B. et al. Digital image analysis of testicular and prostatic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. **Animal Reproduction Science**. v.160, p. 112-119, 2015.

- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da bolsa escrotal e dos testículos. **Patologia da reprodução dos animais domésticos** In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 93 -104. 2003.
- NICHOLS, M., THOMPSON, J. Field Application of a Bull Breeding Soundness Examination. **Iowa State University Veterinarian**: v. 49, issue 1, 1987.
- PECHMAN, R. D., EILTS, B. E. B-mode ultrasonography of the Bull testicle. **Theriogenology**. v.27, p. 431-441. 1987.
- PIERSON, R. A., KASTELIC, J. P., GINTHER, O. J. Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. **Theriogenology**.v.29, p. 3-20, 1988.
- PINHO, R. O.; COSTA, D. S.; SIQUEIRA, J. B. et al. Correlation of sexual maturity with testicular echotexture in Young nelore bulls. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 41, p. 1-7, 2013.
- PINHO, R. O.; CAMILO, B. S.; LIMA, D. M. A. et al. The use of ultrasonography in the reproductive evaluation of boars. In: VIII INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, n.8, Illinois. Short Talk. Illinois, USA: Wiley Blackwell, 2015.
- PUGH, C. R., KONDE, L. J. Testicular ultrasound in the normal dog. **Veterinary Radiology** v.31, p.195-199. 1990.
- PURSEL, V. C.; JOHNSON, L. A.; RAMPACEZ, G.B.; Acrossome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**. v.34, p. 278-283, 1972.
- RIBADU, A. Y., NAKAO, T. Bovine Reproduction ultrasonography: A review. **Journal of Reproduction and Development**. v. 45, n.1, p.13-28. 1999.
- RIESENBECK, A. Review on International Trade with Boar Semen. **Reproduction in domestic animals**. v. 46, n.2. p.1-3. 2011.
- SCHULZE, M; BUDER, S.; RÜDIGER, K. et al. Influences on semen traits used for selection of young AI boars. **Animal Reproduction Science**. v.148, p. 164-170. 2014.
- SENGER, P. L. et al., The organization and function of the male reproductive system. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2nd edition. Innovative Technologies in print, Pullman – WA. cap. 3 p.44-79. 2003.
- SENGER, P. L. et al., Regulation of reproduction – nerves, hormones and target tissues. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2nd edition. Innovative Technologies in print, Pullman – WA. cap.5 p.102-127. 2003.
- SENGER, P. L. et al., Puberty. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2nd edition. Innovative Technologies in print, Pullman – WA. cap. 6 p.128 - 143. 2003.

SHIPLEY, C. F. Breeding soundness examination of the boar. **Swine health production**. v.7 (Suppl.3),p. 117-120, 1999.

SOUZA, M. B.; ENGLAND, G. C. W.; MOTA FILHO, A. C.; et al. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and sérum testosterone concentrations in dogs with established infertility. **Theriogenology**. v.84, p. 805-810, 2015.

VAN CAMP, S. D. Common causes of infertility in the bull. **Bull Infertility**.v.20, p. 749-720, 1997.

WEITZE, K. F. Update on the World-wide Application of Swine AI. **Boar Semen Presevation IV** Allen Press Inc. Lawrence – KS p.141-145. 2000.

WEITZE, K. F. Resumo: Seleção de suínos machos jovens como doadores de sêmen. I **Simpósio Satélite do V SINSUI**. Porto Alegre, p.1-13, 2010.

WEITZE, K. F. The importance of boar sperm motility and morphology for fertility. **International pig topic**. v. 27, n.5, p.13, 2012.