

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Escola de Veterinária**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Letícia Pinheiro Moreira

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ULTRASSONOGRAFIA, HISTOLOGIA TESTICULAR E  
QUALIDADE SEMINAL PARA A SELEÇÃO REPRODUTIVA DE VARRÕES DE  
ALTO POTENCIAL GENÉTICO**

Belo Horizonte

2025

Letícia Pinheiro Moreira

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ULTRASSONOGRAFIA, HISTOLOGIA TESTICULAR E  
QUALIDADE SEMINAL PARA A SELEÇÃO REPRODUTIVA DE VARRÕES DE  
ALTO POTENCIAL GENÉTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na área de Reprodução Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor (a) em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Coorientadores: Profa. Dra Ana Luísa Neves Alvarenga Dias, Prof. Dr. André Caldeira-Brant, Dr. Michael Kleve-Feld e Prof. Dr. Raphael Rocha Wenceslau

Belo Horizonte

2025

M838a            Moreira, Leticia Pinheiro, 1989 -  
                    Associação entre ultrassonografia, histologia testicular e qualidade seminal  
                    para a seleção reprodutiva de varrões de alto potencial genético/ Leticia  
                    Pinheiro Moreira.- 2025.  
                    f. 131 il.

Orientadora: Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Coorientadores: Ana Luísa Neves Alvarenga Dias  
                         André Caldeira -Brant  
                         Michael Kleve-Feld  
                         Raphael Rocha Wenceslau

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Medicina Veterinária da UFMG,  
como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Reprodução Animal.

Bibliografia: f. 64 – 80

1. Suino - Teses - 2. Ultrassonografia Veterinária- Teses - 3.  
Reprodução Veterinária – Teses – 4. Semem – Análise – Teses - I. Almeida,  
Fernanda Radicchi Campos Lobato de - II. Brant, André Caldeira - III. Feld,  
Michael Kleve – IV. Wenceslau, Raphael Rocha - V. Universidade Federal  
de Minas Gerais, Escola de Veterinária -VI. Título

**CDD – 636.085**

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA PINHEIRO MOREIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **DOUTOR(a)** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Reprodução Animal**. Defesa da tese intitulada: "**Associação entre ultrassonografia, histologia testicular e qualidade seminal para a seleção reprodutiva de varrões de alto potencial genético.**"

Aprovado(a) em 30 de maio de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida - Orientador(a)

Dr.(a). Fernanda Carolina Ribeiro Dias

Dr.(a). Carla Fernanda Paranhos de Moura Carvalho

Dr.(a). Guilherme Mattos Jardim Costa

Dr.(a). Ana Carolina Leite Albeny

Dr.(a). Mariana Groke Marques



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 30/05/2025, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Groke Marques, Usuária Externa**, em 02/06/2025, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Leite Albeny, Professora do Magistério Superior**, em 02/06/2025, às 14:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Mattos Jardim Costa, Professor do Magistério Superior**, em 04/06/2025, às 19:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Fernanda Paranhos de Moura Carvalho, Usuária Externa**, em 04/06/2025, às 23:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Carolina Ribeiro Dias, Usuária Externa**, em 10/06/2025, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4220782** e o código CRC **D6412AEC**.

*Dedico este projeto a todos os colaboradores de centrais  
de coleta e processamento de sêmen suíno*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde, proteção e por guiar meus passos, colocando em meu caminho boas oportunidades e pessoas especiais.

Sou infinitamente grata pelo amor e apoio incondicional dos meus pais, Geraldo e Denize. Com eles, descobri que sou mais forte do que imaginava. São meu alicerce, porque sigo seus exemplos de fé, generosidade, humildade, responsabilidade e carinho. À minha mãe, um agradecimento especial pela ajuda direta no projeto. Ao meu irmão Ricardo, obrigada por torcer sempre por mim e pelo apoio constante, que sorte ter você como irmão! Nenhum sonho seria possível sem vocês ao meu lado!

Ao Shawn, agradeço pelo carinho e apoio emocional, principalmente durante o período experimental. À Camila Pittoli, obrigada pela companhia e suporte nesse desafio. Aos meus avós, sou grata pelos bons exemplos e por todos os momentos que, mesmo marcados pela saudade, me inspiraram. Ao meu avô Pinheiro, obrigada pela torcida de sempre! À tia Silma, meu reconhecimento por ser um exemplo de quem acreditou e transformou a ciência! A toda minha família, obrigada pelas orações, incentivo e carinho, especialmente à Giovanna, Dudu e Nanda, que estiveram tão perto nessa etapa.

À minha orientadora, Profa. Fernanda Almeida, agradeço pela atenção e, especialmente, pela confiança e por acreditar na minha ideia desde o início. Aos meus coorientadores, Profa. Ana Luísa Dias, Prof. André Caldeira Brant, Dr. Michael Kleve-Feld e Prof. Raphael Wenceslau, meu sincero agradecimento pela paciência, disponibilidade e suporte durante a execução deste trabalho. Aos membros da banca examinadora, obrigada pela disponibilidade e pelas contribuições para a avaliação deste projeto.

Aos professores/amigos que tive a oportunidade de conhecer ao longo da minha trajetória acadêmica, minha profunda admiração e gratidão. Vocês contribuíram de forma única para meu aprendizado e despertaram ainda mais minha paixão pela ciência. Às professoras Gleide Avelar e Monique Lagares, pela participação e importantes contribuições nas qualificações 1 e 2. Aos professores José Monteiro Filho, Fernando Bortolozzo, Mari L. Bernardi, David Barcellos, Glória Franco, Hélio Chiarini-Garcia, Makeli Aldrovandi, Ana Maria de Melo e Silvana Cançado, meu muito obrigada pelo exemplo e inspiração.

À minha irmã de coração, Ana Luísa N. A. Dias, obrigada pelo exemplo pessoal e profissional, pela amizade sincera, paciência, orientação desde a graduação, por todos os ensinamentos, conselhos, incentivo e, especialmente, por me inspirar na escolha da minha área de atuação. À sua família, Alexandre, Pedro César e Valentina, minha gratidão pelo carinho de sempre e por me acolherem de braços abertos, a qualquer hora.

À querida amiga Mariana Menegat, obrigada pelo carinho constante, especialmente durante minha estadia nos EUA. Sua acolhida, atenção aos detalhes e apoio foram fundamentais. À sua família, Henrique e Oliver, meu muito obrigada pelo carinho.

À Dra. Anja Riesenbeck, minha profunda gratidão pelo acolhimento generoso e por me proporcionar aprendizados tão significativos para a minha formação. A experiência na Alemanha foi transformadora. Sua confiança no meu conhecimento e os constantes incentivos foram fundamentais ao longo do doutorado.

Aos amigos de todas as fases da minha vida — de João Monlevade, do Marista, da Vet, do Setor de Suínos, do RS, SC, PR, SP, da Agroceres PIC, da Alemanha, dos EUA e de BH — obrigada por estarem sempre presentes, com uma palavra de carinho e amizade genuína! Sou muito grata a todos que contribuíram de alguma forma durante o doutorado, professores, alunos, funcionários, à turma do GES, do ICB e da Escola de Veterinária.

Agradeço ao LABER, pela estrutura disponibilizada e por viabilizar a execução e avaliação das lâminas histológicas, especialmente ao João Vitor Ferreira, pelo apoio durante o processamento. Agradeço também ao CAPI, em especial às “Natálias” (Natália Oliveira e Natália Maciel), pela atenção durante o processamento de microtomia.

Ao Dr. Michael Kleve-Feld, minha imensa gratidão pela atenção, confiança e amizade constante. Agradeço por estar ao meu lado durante todo o percurso deste doutorado, desde a concepção da ideia até a sua conclusão. Sou verdadeiramente grata pela oportunidade que me concedeu e por ter acreditado em mim desde o início.

À PIC (Pig Improvement Company), obrigada por acreditar e fornecer apoio financeiro a este projeto. Sou grata a todos os colaboradores que tanto me ajudaram: Marney Jobin, Joe Jobin, Sue Paterson, Steve Dritz, Eric Psota, Lexie Chen, Brandon Fields, Bradley Didion, Philip Dorn (in memoriam), José Piva, Uislei Orlando e Karen Burkhalter. A toda a equipe da Apex Genetic Nucleus Farm, Sítio 1, GTC, escritório e, especialmente, ao Sítio 2, meu sincero agradecimento pelo carinho, atenção e apoio incansáveis durante a execução do experimento.

Finalmente, agradeço às instituições que apoiam e fomentam a pesquisa no Brasil: CNPq, FAPEMIG e especialmente a CAPES, pela bolsa de doutorado.

"Há que ter alguma coragem.  
Há que ter algum sonho correndo nas veias,  
e um grão de loucura faiscando na alma."

Lya Luft

## RESUMO

A ultrassonografia é uma ferramenta não invasiva e promissora para monitorar as mudanças morfofisiológicas no parênquima testicular durante o desenvolvimento reprodutivo. Sua aplicação, aliada à análise objetiva da escala de cinza (GSA), pode contribuir para programas de melhoramento genético, otimizando a seleção precoce de reprodutores com alto potencial produtivo em diferentes linhagens genéticas. O objetivo deste estudo foi prever precocemente a aptidão reprodutiva de varrões de diferentes linhas genéticas com base em avaliações ultrassonográficas, crescimento e histologia testicular, do nascimento aos 370 dias de idade. Machos das linhas Landrace (LD, n = 424), Large White (LW, n = 278), Duroc (DU, n = 431) e Sintética Terminal (ST, n = 385) foram avaliados em diferentes fases quanto à biometria testicular, parâmetros de GSA e, posteriormente, alocados em dois subgrupos: avaliação histológica (n = 39; LD, n = 10; LW, n = 9; ST, n = 10; DU, n = 10); avaliação da produtividade seminal (n = 182; LD, n = 32; LW, n = 40; SP, n = 69; DU, n = 41). No subgrupo de avaliação histológica foram mensurados a área e diâmetro médio dos túbulos seminíferos, a proporção volumétrica testicular e número de células de Sertoli por túbulo. No subgrupo de avaliação do sêmen, os machos foram classificados em “produtivos” e “não-produtivos” com base nos parâmetros de qualidade seminal. Trata-se de um estudo observacional longitudinal do tipo coorte. Os resultados demonstraram que LD e LW apresentaram menor peso ao nascer ( $P < 0,05$ ), enquanto ST manteve maior peso corporal ao longo do desenvolvimento ( $P < 0,05$ ) e DU apresentou menor desenvolvimento testicular ( $P < 0,05$ ). A biometria testicular e os parâmetros da GSA variaram significativamente entre as linhas genéticas, apresentando correlações com o peso corporal ( $P < 0,05$ ). LD apresentou maior peso testicular e maior proporção de túbulos seminíferos, ao passo que DU teve maior proporção de tecido intersticial ( $P < 0,05$ ). Entre os parâmetros da GSA, a heterogeneidade (HET), o valor médio de cinza (MEANGV) e o desvio do valor médio de cinza (DEVOFTHEMEAN) demonstraram valor preditivo para a qualidade do sêmen, especialmente na fase de off-test. Conclui-se que a análise ultrassonográfica do parênquima testicular por meio dos parâmetros de GSA é uma ferramenta objetiva e promissora para a avaliação precoce de reprodutores suínos. Os parâmetros de GSA variam entre diferentes linhagens genéticas e apresentam associação com componentes histológicos testiculares. Além disso, a realização da ultrassonografia no momento do off-teste permite prever, de forma antecipada, a qualidade seminal futura dos machos, contribuindo para estratégias mais eficientes de seleção e aproveitamento de varrões de alto mérito genético.

Palavras chaves: Andrologia; Túbulo seminífero; Produção de sêmen, Puberdade, Análise de escala de cinza (GSA).

## ABSTRACT

Ultrasonography is a non-invasive and promising tool for monitoring physiological changes in the testicular parenchyma throughout reproductive development. Its application, combined with objective gray-scale analysis (GSA), may support genetic improvement programs by optimizing the early selection of boars with high productive potential across different genetic lines. This study aimed to predict the reproductive potential of boars from distinct genetic lines early in life, based on ultrasonographic evaluations, growth performance, and testicular histology from birth to 370 days of age. Boars from the Landrace (LD, n = 424), Large White (LW, n = 278), Duroc (DU, n = 431), and Synthetic Terminal (ST, n = 385) lines were evaluated at different stages regarding testicular biometry and GSA parameters. Animals were subsequently allocated into two subgroups: histological evaluation (n = 39; LD = 10; LW = 9; ST = 10; DU = 10); and semen productivity assessment (n = 182; LD = 32; LW = 40; ST = 69; DU = 41). In histological evaluation, seminiferous tubule area and average diameter, volumetric proportion of testicular components, and the number of Sertoli cells per tubule were assessed. In the semen productivity assessment, boars were classified as “productive” or “non-productive” based on semen quality parameters. This was a longitudinal observational cohort study. Results showed that LD and LW boars had lower birth weights ( $P < 0.05$ ), while ST maintained higher body weight across all stages ( $P < 0.05$ ), and DU showed the least testicular development ( $P < 0.05$ ). Testicular biometry and GSA parameters varied significantly among genetic lines and were positively correlated with body weight ( $P < 0.05$ ). LD boars exhibited greater testicular weight and higher seminiferous tubule proportion, whereas DU had a greater proportion of interstitial tissue ( $P < 0.05$ ). Among GSA parameters, heterogeneity (HET), mean gray value (MEANGV), and standard deviation of the mean gray value (DEVOFTHEMEAN) demonstrated predictive value for semen quality, particularly at the off-test stage. It is concluded that the ultrasonographic evaluation of testicular parenchyma using GSA parameters is an objective and promising tool for the early assessment of boars. GSA parameters vary across different genetic lines and are associated with testicular histological components. Furthermore, performing ultrasonography at the off-test stage allows for the early prediction of future semen quality in males, contributing to more efficient selection strategies and the utilization of boars with high genetic merit.

Keywords: Andrology; Seminiferous tubules; Semen production; Puberty; Grey Scale Analysis (GSA).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento do embrião durante o período pré-implantação.....	20
Figura 2. Esquema do desenvolvimento embrionário de suínos, de acordo com o estágio de desenvolvimento da linha germinativa e formação dos órgãos genitais.....	21
Figura 3. Análise macroscópica e histológica das gônadas de embriões machos de 24 a 35 dpf.....	22
Figura 4. Representação anatômica do sistema genital do varrão.....	24
Figura 5. Diagrama ilustrando a morfologia das células germinativas ao longo dos oito estágios do ciclo do epitélio seminífero em suínos.....	28
Figura 6. Desenvolvimento testicular e variação hormonal do período fetal à puberdade em humanos.....	31
Figura 7. Desenvolvimento dos cordões/túbulos seminíferos nos testículos suínos ao longo das diferentes idades.....	33
Figura 8. Principais modelos de transdutores utilizados em animais de produção e imagem característica de cada modelo.....	50
Figura 9. Comportamento dos feixes de ultrassom ao propagar pelos tecidos.....	50
Figura 10. Diferenças entre as ondas sonoras de alta e baixa frequências.....	53
Figura 11. Exemplo de ROI e histograma gerado pela análise GSA .....	55
Figura 12. Seção transversal ultrassonográfica do testículo esquerdo de um varrão.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas de herdabilidade para características do sêmen suíno.....	42
Tabela 2. Características do sêmen suíno.....	47
Tabela 3. Propriedades acústicas de vários meios biológicos.....	52
Tabela 4. Panorama da literatura sobre as mudanças fisiológicas entre espécies nos parâmetros ultrassonográficos e escala de cinza do parênquima testicular.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{m}$  – Micrômetro

$\mu\text{m}^2$  – Micrômetro quadrado

ANOVA – Análise de variância

AUC – *Area under the curve*; Área sob a curva

BLUP – *Best Linear Unbiased Prediction*; Melhor preditor linear não enviesado

CCPS – Central de Coleta e Processamento de Sêmen

DEVOFTHEMEAN – *Standard deviation of the mean gray value*; Desvio padrão do valor médio de cinza

dpf – Dias pós fecundação

DSP – *Daily sperm production*; Produção espermática diária

DU – Duroc

EBV – *Estimated Breeding Value*; Valor Genético Estimado

EPD – *Expected Progeny Difference*; Diferença Esperada de Progênie

FSH – Hormônio folículo estimulante

GATA-4 – *GATA binding protein 4*

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

GPD – Ganho de peso diário

GRAD – *Mean gradient value*; Valor médio do gradiente de cinza

GSA – Grey Scale Analysis - Análise em escala de cinza

HET – *Heterogeneity*; Heterogeneidade

HHG – Eixo Hipotalâmico - Hipofisário - Gonadal

Hz – Hertz

IA – Inseminação artificial

IGF-1 – *Insulin-like Growth Factor 1*; Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1

INSL3 – *Insulin-like factor 3*; Fator de Insulina do Tipo 3

kDa – Quilodalton

kg – Quilograma

LD – Landrace

LH – Hormônio luteinizante

LW – Large White

MAXGV – *Maximum gray value*; Máximo valor de cinza

MEANGV – *Mean gray value*; Valor médio de cinza

MHz – Mega-hertz

MINGV – *Minimum gray value*; Mínimo valor de cinza

mL – Mililitro

mm –Milímetro

n – Número amostral

NORMGSH – *Normalized grayscale histogram width at the 5% level*; Largura normalizada do histograma em escala de cinza no nível de 5%

PDGF-A – *Platelet-Derived Growth Factor A*; Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas A

PGC – Célula germinativa primordial

PMC – Células mióides peritubulares

ROI – *Region of interest*; Região de interesse

ST – Synthetic Terminal

TGF $\alpha$  – *Transforming Growth Factor alpha*; Fator de Crescimento Transformador alfa

TGF $\beta$  – *Transforming Growth Factor beta*; Fator de Crescimento Transformador beta

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	17
<b>2. Objetivo Geral</b> .....	19
2.1. Objetivos específicos.....	19
<b>3. Revisão de Literatura</b> .....	20
3.1. Embriologia e desenvolvimento gonadal do varrão.....	20
3.2. Sistema genital do varrão .....	24
3.2.1. Anatomia.....	24
3.2.2. Histologia.....	26
3.2.3. Fisiologia e endocrinologia.....	29
3.3. Desenvolvimento pós-natal e puberdade do varrão.....	31
3.4. Espermatogênese e esteroidogênese.....	38
3.5. Seleção do macho reprodutor suíno.....	40
3.6. Influência da genética sobre o desenvolvimento dos machos.....	44
3.7. Ejaculado e qualidade do sêmen .....	47
3.8. Princípios de ultrassonografia .....	49
3.8.1. Modos de exibição do ultrassom .....	54
3.8.2. Análise em escala de cinza.....	55
3.9. Ultrassonografia no exame andrológico veterinário.....	56
3.10. Avaliação ultrassonográfica reprodutiva em suínos.....	59
3.11. Aspectos associados a ecogenicidade testicular .....	61
3.11.1. Evolução da ecogenicidade ao longo da idade.....	61
3.11.2. Relação entre ecogenicidade e produção espermática.....	63
3.12. Referências .....	64
<b>4. Artigo 1</b> .....	81
4.1 Selecting elite boars: a comparative approach to reproductive development and ultrasonography across genetic lines.....	81
<b>5. Artigo 2</b> .....	99
5.1 Ultrasonographic and histological assessment of testicular development for predicting reproductive performance in high-genetic-merit boars.....	99
<b>6. Considerações finais</b> .....	131

## 1. Introdução

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2025), o Brasil produziu 5,305 milhões de toneladas de carne suína no ano de 2024, gerando um valor bruto de produção de 56,159 bilhões de reais. Esses números comprovam a importância do setor suinícola para a economia nacional. Entre os principais pilares da suinocultura — sanidade, bem-estar, nutrição e reprodução — a reprodução desempenha um papel fundamental para obtenção de altos níveis de produtividade. Tal destaque é resultante da eficiência reprodutiva, indicador produtivo e econômico essencial para o agronegócio, que possibilita a redução dos custos de produção e o atendimento às crescentes exigências dos consumidores.

A inseminação artificial é a biotecnologia mais importante já concebida para acelerar o melhoramento genético e sua aplicação permite uma seleção genética intensa e relativamente rápida (Waberski *et al.* 2019). Essa técnica é usada em mais de 90% das granjas comerciais em diferentes países, sendo os métodos mais utilizados a inseminação cervical e intrauterina (Bortolozzo *et al.*, 2024). Nesse contexto, o varrão apresenta um papel crucial, pois tem capacidade de produzir cerca de 1.500 a 2.600 doses inseminantes por ano, gerando aproximadamente 10.000 leitões desmamados por ano (Beyer, 2020), em comparação com a matriz, que produz cerca de 37,7 leitões desmamados no mesmo período (Agriness, 2024). Portanto, a otimização dos processos de seleção do reprodutor é essencial para o sucesso dessa tecnologia.

A previsão da fertilidade e aptidão reprodutiva dos machos é vital para o sucesso da inseminação artificial (Carvajal-Serna *et al.*, 2022). Deste modo, estimando uma taxa de reposição de 65% e a vida útil de um macho de 15 meses em uma Central de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) suíno (Beyer, 2020), o reprodutor tem um grande impacto no fluxo de produção. Assim, o conhecimento sobre o sistema genital masculino, desenvolvimento testicular, crescimento, puberdade e uso de tecnologias no processo de seleção são de fundamental importância para aprimorar a eficiência reprodutiva do plantel.

A fertilidade é uma característica complexa influenciada por múltiplos fatores, incluindo genética, nutrição, estado metabólico, ambiente e manejo (Dyck *et al.* 2011; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024). Entre esses fatores, a influência genética é particularmente relevante, uma vez que a precocidade sexual e a capacidade de produção espermática variam entre os genótipos (Resende *et al.*, 2019; Smital, 2009). Tradicionalmente, a seleção de reprodutores tem se concentrado em avaliações genéticas e do sistema locomotor (Hensel *et al.*, 2024), tornando essencial a realização de estudos que forneçam informações sobre o sistema

reprodutivo para aprimorar esse processo. Além disso, compreender a fisiologia do desenvolvimento testicular é fundamental para otimizar a seleção e o desempenho reprodutivo.

A avaliação ultrassonográfica é uma técnica valiosa e não invasiva para o diagnóstico do trato genital masculino (Carvajal-Serna *et al.*, 2022; Schulze *et al.*, 2020) e vem sendo usada como complemento do exame clínico andrológico (Ahmadi *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2012; Hensel *et al.*, 2024). Além disso, se faz necessário o monitoramento das mudanças fisiológicas progressivas que ocorrem no parênquima testicular nas diferentes fases do desenvolvimento reprodutivo, como o crescimento e maturação dos túbulos seminíferos (Ford & Wise, 2011; Zheng *et al.*, 2022), diferenciação e proliferação das células de Sertoli e germinativas (Flowers, 2022). A incorporação de novas tecnologias como ultrassonografia e avaliação objetiva da escala de cinza é promissora. A seleção eficiente do reprodutor e a incorporação de tecnologia, combinadas, permitirão maior otimização no uso de machos de alto índice genético.

Os programas de melhoramento genético em suínos têm como objetivo selecionar machos com as melhores características produtivas, ajustadas às particularidades de cada linhagem, seja ela materna ou terminadora. Atualmente, a seleção de reprodutores está amplamente baseada em ferramentas avançadas, como análises de genealogia utilizando EBV, BLUP e EPD, além de dados genômicos, que têm ampliado a precisão do processo (Zak *et al.*, 2017; Hensel *et al.*, 2024). No entanto, embora tais estratégias priorizem o valor econômico e o desempenho produtivo, a capacidade de produção de sêmen dos machos geralmente não é considerada como um critério de seleção, deixando uma lacuna importante na avaliação da eficiência reprodutiva desses indivíduos.

O pré-requisito mais relevante para um reprodutor suíno geneticamente selecionado é a produção de grandes quantidades de espermatozoides no ejaculado, apresentando atributos necessários para alcançar alta fertilidade, dois conceitos inerentes, que não são necessariamente relacionados de forma positiva entre si (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024). Em geral, os reprodutores passam por rigorosos controles reprodutivos para garantir que produzam ejaculados com uma média de  $50 \times 10^9$  espermatozoides totais, com a maioria das células apresentando motilidade acima de 70% e morfologia normal acima de 75% (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024). Esses parâmetros refletem diretamente a qualidade do sêmen, a qual representa um fator-chave para a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, para a produtividade do macho reprodutor. Dessa forma, os achados relacionados à avaliação testicular e à qualidade seminal podem auxiliar no estabelecimento de critérios objetivos para a seleção precoce de reprodutores, especialmente em machos de alto mérito genético.

## **2. Objetivo Geral**

Avaliar a aptidão reprodutiva de varrões diferentes linhas genéticas (Landrace, Large White, Terminal Sintético e Duroc) ao longo do seu desenvolvimento, associando biometria testicular, histologia e ultrassonografia, do nascimento até os 370 dias de idade, visando prever a qualidade seminal e a capacidade reprodutiva. A longo prazo, busca-se aprimorar a eficiência na seleção de reprodutores suínos para inseminação artificial, por meio da padronização de critérios e procedimentos, contribuindo para a eficiência reprodutiva.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Determinar a eficácia dos parâmetros ultrassonográficos (MAXGV, MINGV, MEANGV, DEVOFTHEMEAN, HET, NORMGSH, AUC, MEANGRAD) baseados na escala de cinza (GSA) do parênquima testicular na previsão precoce da qualidade seminal em diferentes linhas genéticas.
- Avaliar os efeitos do peso ao nascimento e da biometria testicular sobre o desenvolvimento reprodutivo dos varrões.
- Monitorar as alterações estruturais do parênquima testicular por meio da análise de escala de cinza (GSA) nas fases pós-desmame (30 dias), on-teste (75 dias) e off-teste (135 dias).
- Investigar as associações entre os parâmetros de GSA, a composição histológica do parênquima testicular e medidas histomorfométricas, incluindo o número de células de Sertoli por secção transversal do túbulo seminífero.
- Comparar as linhas genéticas quanto ao desempenho zootécnico (peso corporal, ganho de peso médio, espessura de toucinho, profundidade de músculo), parâmetros de GSA, histologia e testicular e qualidade de sêmen.

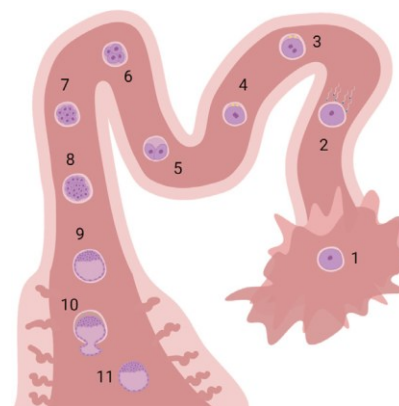
### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1. Embriologia e desenvolvimento gonadal do varrão

A fecundação é o processo inicial para o desenvolvimento de um novo indivíduo, a partir da fusão dos gametas masculino e feminino, dando origem ao embrião ou zigoto. O embrião passa por sucessivas clivagens, sendo então denominado mórula (Figura 1; Almeida & Dias, 2022). Durante as etapas de desenvolvimento, o embrião se transforma em blastocisto, que consiste no embrioblasto (botão embrionário) e trofoblasto (precursor da placenta). Os conceitos suínos não se desenvolvem de maneira simultânea e podem chegar a ter 80 a 100 cm de comprimento (Senger, 2012). As diferentes camadas de células, geradas na gastrulação, ectoderma, mesoderma e endoderma, irão originar diferentes órgãos e sistemas. A maioria das estruturas do sistema genital masculino, como os testículos, epidídimos, ductos deferentes e glândulas sexuais acessórias, origina-se do mesoderma, enquanto o pênis se desenvolve a partir do endoderma (Plant *et al.*, 2014).

Figura 1. Desenvolvimento embrionário durante o período pré-implantação: 1 - oócito, 2 - fertilização, 3 - oótide, 4 - zigoto, 5 - estágio de duas células, 6 - estágio de quatro células, 7 - estágio de oito células, 8 - mórula, 9 - blastocisto inicial, 10 - blastocisto eclodindo e 11 - blastocisto eclodido.

Fonte: Almeida & Dias, 2022.



Nesta fase inicial do desenvolvimento embrionário, a gônada é bipotencial, com capacidade para se diferenciar em testículo ou em ovário, a depender da expressão de genes específicos durante o desenvolvimento (Greenfield, 2015). A célula de Sertoli é o primeiro elemento somático a se diferenciar no testículo, originando-se de células do epitélio celomático cujas precursoras expressam o gene determinante sexual *SRY*. Essa determinação sexual tem início no momento da fecundação e se dá pela presença ou ausência do cromossomo Y no espermatozoide que fecunda o oócito. Esse processo ocorre em quatro etapas: (1) determinação do sexo cromossômico, (2) diferenciação das gônadas em testículos ou ovários, (3) diferenciação dos órgãos genitais internos e externos e (4) diferenciação secundária dos tecidos em resposta aos hormônios produzidos pelas gônadas, completando o fenótipo sexual (Henry *et al.*, 2013).

O gene *SRY*, ligado ao Y, é responsável por iniciar uma cascata de ativação de genes específicos do testículo e repressão de genes envolvidos no desenvolvimento ovariano. Sua expressão em células pré-Sertoli (ou células de Sertoli imaturas) induz a regulação positiva do gene *SOX9*, essencial para a migração das células germinativas do testículo para a crista genital (Avelar, 2010). Além disso, o *SOX9* regula a transcrição do hormônio antimulleriano e desempenha um papel fundamental nas células de Sertoli, sendo expresso desde o período fetal até a fase adulta (Harley *et al.*, 2003; Kent *et al.*, 1996; Wilhelm *et al.*, 2007).

Outro gene relevante é o *DMRT1* cuja expressão é significativamente maior nos testículos em comparação aos ovários (Ferguson-Smith, 2006; Huang *et al.*, 2017). Stenhouse *et al.* (2022) identificaram a expressão do mRNA de *DMRT1* nos testículos de fetos suínos aos 90 dias de gestação. Sabe-se que esse gene tem um papel importante no desenvolvimento inicial dos testículos, e é indispensável para a manutenção das células de Sertoli, tanto na fase fetal como após o nascimento (Matson *et al.*, 2011).

Aglomerados de células germinativas primordiais (PGCs) são identificados aos 11 e 12 dias após a fertilização na região do epiblasto, junto a base do alantoide formando um grupo de 60 células em suínos (Kobayashi *et al.*, 2017). Essas células proliferam até atingirem cerca de 300 PGCs e, em seguida, migram através do mesentério primitivo até a crista gonadal. Durante esse processo, sua população continua a expandir, alcançando entre 1000 e 2000 PGCs, momento em que colonizam as gônadas e entram em bloqueio mitótico (Kobayashi *et al.*, 2017). Deste modo, a migração das PGCs é essencial para o desenvolvimento gonadal (Figura 2).

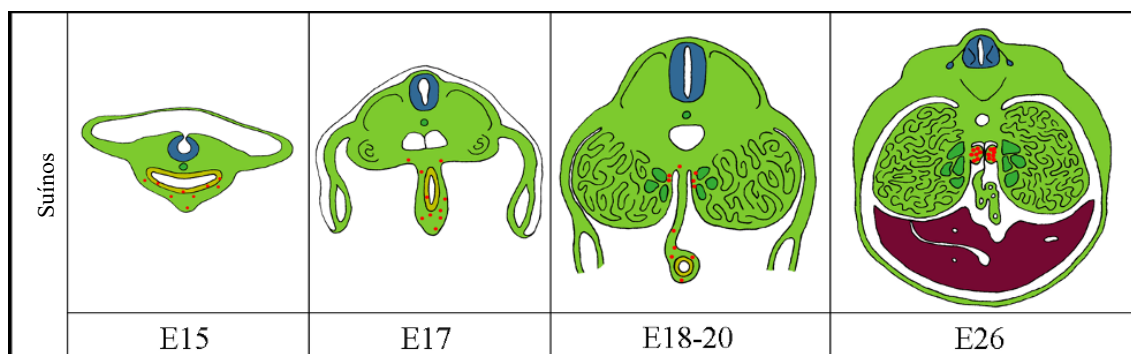


Figura 2. Esquema ilustrativo do desenvolvimento embrionário de suínos, conforme os estágios da diferenciação da linhagem germinativa e da formação dos órgãos genitais. E: idade embrionária em dias. Pontos vermelhos representam PGCs em cortes transversais de embriões suínos. Os desenhos não estão apresentados em escala. Fonte: Hyldig *et al.*, 2011.

Jorge *et al.* (2023) avaliaram embriões suínos aos 24, 25, 30 e 35 dias pós-fecundação (Figura 3). Aos 24 dias observou-se uma região alongada e espessada na parede medial do ducto mesonéfrico, originada de uma pequena protuberância na cavidade corporal. Além disso, foram identificadas algumas células grandes com nucléolos arredondados e proeminentes. Aos 25 dias pós-fecundação, a parede medial do ducto mesonéfrico tornou-se mais espessa, e uma pequena proeminência começou a se projetar em direção à cavidade corporal.

Aos 30 dias, os mesonefros apresentavam-se como túbulos localizados lateralmente ao futuro sistema urogenital e às cristas gonadais. No período inicial (24–29 dpf), as cristas gonadais puderam ser visualizadas junto ao mesonefro. Os túbulos mesonéfricos são formados por células epiteliais organizadas em um epitélio cúbico simples, circundando vasos sanguíneos e uma camada serosa protetora. Na porção caudal do mesonefro, foi possível identificar a presença do metanefro, ou rim primitivo (Figura 3). Aos 35 dias, as gônadas estavam separadas do mesonefro, e a presença de cordões testiculares tornou-se evidente. Esses cordões eram compostos por PGCs localizadas centralmente e células de Sertoli localizadas periféricamente (Jorge *et al.*, 2023).

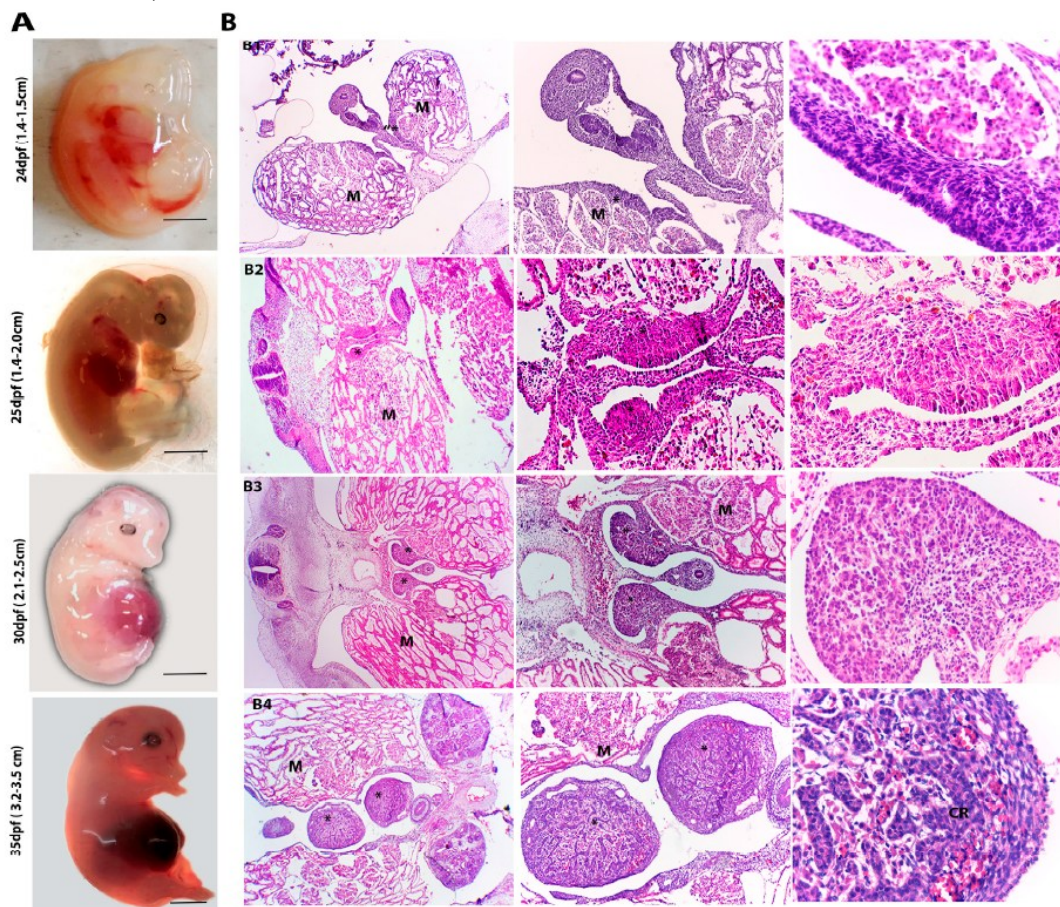


Figura 3. Análise macroscópica e histológica das gônadas de embriões machos de 24 a 35 dpf. A e B1: 24 dpf, região alongada e espessada na parede medial do ducto mesonéfrico (M), com

células grandes, de formato arredondado e nucléolo proeminente. A e B2: 25 dpf, pequena proeminência se origina em direção à cavidade corporal (\*). A e B3: 30 dpf, os mesonefros (M) organizados em túbulos, localizados lateralmente ao futuro sistema urogenital e lateralmente a ele as cristas gonadais (crista genital) (\*). A e B4: 35 dpf, gônadas se desprendem do mesonefro, e já é possível notar a presença de cordões testiculares (CR), compostos por células germinativas primordiais localizadas centralmente e células de Sertoli localizadas perifericamente. Barra: 50–200 µm e 1 cm. Fonte: Jorge *et al.*, 2023.

As células de Leydig se originam das células mesenquimais, que migram para a crista gonadal e se diferenciam em duas populações distintas: fetal e adulta. Essas células desempenham um papel fundamental na secreção de andrógenos, hormônios essenciais para a diferenciação do sistema urogenital masculino durante a gestação (Huhtaniemi & Pelliniemi, 1992; Zimmermann *et al.*, 1999).

Já as células de Sertoli têm origem no epitélio celômico (Hyttel *et al.*, 2012). Nos machos, os cordões medulares continuam a proliferar, formando uma rede interna de cordões sexuais, e uma outra rede mais distal e mais fina, denominada rede testicular (*rete testis*) (Hyttel *et al.*, 2012). Além disso, os ductos deferentes são remanescentes do rim mesonéfrico embrionário e ligam os testículos aos ductos de Wolff (Gilbert *et al.*, 2003; Hyttel *et al.*, 2012).

Pontelo *et al.* (2018) identificaram maior desenvolvimento testicular no terço final da gestação, evidenciado pela maior proliferação de células de Sertoli, semelhante ao observado por McCoard *et al.* (2003). Por outro lado, Van Vorstenbosch *et al.* (1984) observaram maior proliferação de células de Sertoli em suínos entre 35 e 52 dias pós-fecundação, sugerindo que o período de maior proliferação de células de Sertoli ocorre durante a gestação.

Alterações histológicas que ocorrem durante o desenvolvimento testicular fetal normal foram estudadas por Stenhouse *et al.* (2022). Esses autores observaram um aumento na quantidade de células germinativas por cordão seminífero no dia 90 de gestação em comparação ao dia 60. Entretanto, a área dos cordões seminíferos dos fetos e o número de células de Sertoli por cordão não foram significativamente afetados pela idade gestacional.

Jorge *et al.* (2023) também avaliaram histologicamente testículos de leitões recém-nascidos (até três dias de vida), identificando a presença de células grandes e arredondadas no centro dos cordões seminíferos, com características morfológicas compatíveis com gonócitos. Além disso, observaram células de Sertoli posicionadas mais próximas à membrana basal. Esse desenvolvimento estrutural ocorre em paralelo à descida testicular, que tem início no período intrauterino e se completa no nascimento (Schnorr & Kessing, 2006).

No período pré-natal, ocorrem mudanças significativas na estrutura dos testículos para se prepararem para seu papel essencial na fertilidade futura. Fatores como estresse térmico, nutrição materna, tamanho da leitegada podem ter efeitos negativos sobre o desenvolvimento gonadal, resultando em uma baixa produção de sêmen no macho adulto (Flowers, 2022; Stenhouse *et al.*, 2022).

## 3.2. Sistema genital do varrão

### 3.2.1. Anatomia

O sistema genital masculino em suínos consiste em: testículos, dúctulos eferentes, epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias e pênis (Bonet *et al.*, 2013; König & Liebich, 2016; Figura 4). De tal modo que as estruturas atuam conjuntamente para produzir e liberar espermatozoides férteis, assim como testosterona.

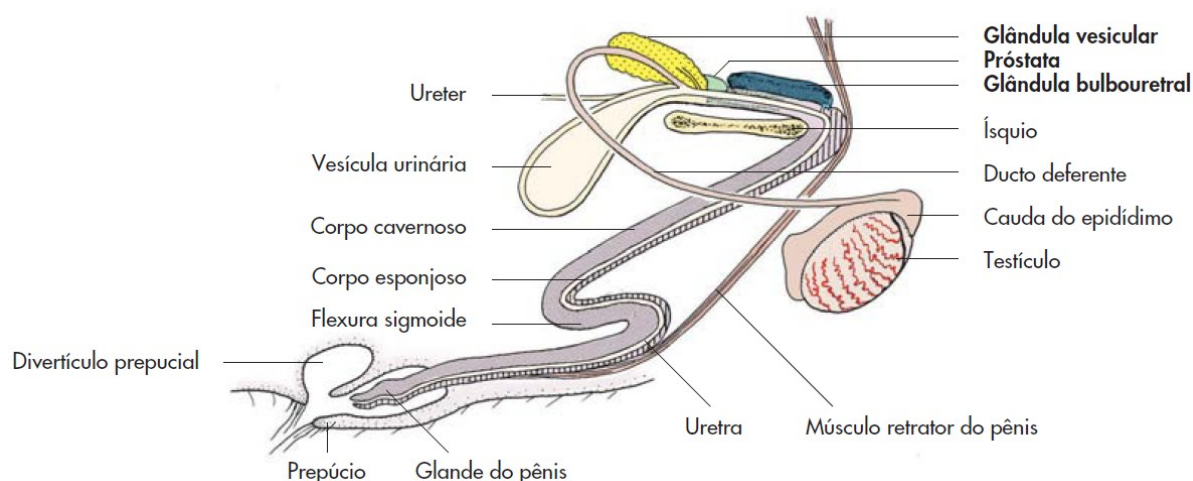


Figura 4. Representação anatômica do sistema genital do varrão. Fonte: König & Liebich, 2016.

O escroto é uma extensão da pele, onde os testículos estão alojados e localizados na região perineal. É composto das seguintes camadas: pele, túnica dartos, fáscia espermática externa, músculo cremáster, fáscia espermática interna e túnica vaginal. Sua função é de suporte, proteção e termorregulação dos testículos (Henry *et al.*, 2013; König & Liebich, 2016; Senger, 2012).

O testículo é considerado o órgão primário da reprodução, responsável pela produção de espermatozoides, fluido testicular, testosterona, inibina e outras proteínas (Li *et al.*, 2024). A cápsula testicular é formada pela túnica vaginal visceral e túnica albugínea. A túnica albugínea emite septos que convergem para a região central do testículo, o mediastino. Os septos da túnica albugínea determinam os lóbulos que são preenchidos por longas e espiraladas estruturas

tubulares denominadas túbulos seminíferos. O espaço preenchido entre os túbulos é preenchido por tecido intersticial, onde estão localizados vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, tecido conjuntivo (Bacha & Bacha, 2012; Senger, 2012). Os túbulos seminíferos convergem para formar os túbulos retos, que se dirigem ao mediastino testicular, onde se conectam à rete testis (rede testicular).

Na porção distal da rede testicular encontram-se os ductulos eferentes que absorvem grande parte do líquido proveniente dos túbulos seminíferos, antes da entrada no epidídimo. O epidídimo proporciona aos espermatozoides capacidade de se locomover (motilidade), de fertilizar (maturação espermática) e serve também como local de armazenamento. É dividido em três regiões distintas: cabeça, corpo e cauda. A cauda do epidídimo é responsável pelo armazenamento dos espermatozoides maduros. No varrão o comprimento do ducto do epidídimo pode chegar a 17-18 metros (König & Liebich, 2016; Senger, 2012).

Os ductos deferentes são estruturas tubulares que partem da cauda do epidídimo e ascendem pela borda medial dos testículos, lateralmente ao corpo do epidídimo. A ligação das estruturas com o restante do corpo se dá pelos cordões espermáticos, que também auxiliam na termorregulação e transporte de espermatozoides até a uretra. O principal componente do cordão espermático é o plexo pampiniforme, composto por veias testiculares, responsável pelo resfriamento da circulação arterial e recirculação de testosterona. Formando também os cordões espermáticos podemos citar o músculo cremáster (Henry *et al.*, 2013; König & Liebich, 2016; Senger, 2012).

As glândulas sexuais acessórias produzem os fluidos que compõem o líquido seminal, são elas: glândulas vesiculares, próstata e glândulas bulbouretrais (König & Liebich, 2016; Figura 4). As glândulas vesiculares são lobuladas e responsáveis pela produção de grande parte do plasma seminal e da produção de frutose (fonte de energia para o espermatozoide). A próstata possui um corpo pequeno, uma parte mais interna e outra mais externa, também produz parte do plasma seminal. As glândulas bulbouretrais são alongadas e cilíndricas, com uma abertura na uretra. Elas produzem uma secreção viscosa, também conhecida como gel (Berger *et al.*, 2024; Henry *et al.*, 2013; Senger, 2012).

O pênis é o órgão copulador, no suíno é fibroelástico e a glândula tem um formato característico em espiral. O prepúcio está localizado externamente ao pênis com a função de proteção. O prepúcio se dobra dorsalmente formando o divertículo prepucial, que tem uma capacidade de cerca de 135 mL e contém um fluido de odor característico composto por debris celulares e urina (König & Liebich, 2016).

### 3.2.2. Histologia

Os testículos são revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso e espesso, conhecida como túnica albugínea (Bacha & Bacha, 2012; Setchell, 1977). A túnica albugínea emite septos de tecido conjuntivo, que se projetam para o parênquima testicular e formam os lóbulos. Os septos se fundem com o tecido conjuntivo frouxo do mediastino testicular. Cada lóbulo testicular é constituído por dois compartimentos: o intersticial e tubular (Bacha & Bacha, 2012; Senger, 2012). França *et al.* (2005) demonstraram que, no testículo de suínos, aproximadamente 85% da estrutura corresponde ao compartimento tubular, enquanto cerca de 10% são ocupados por células de Leydig, que compõem o compartimento intersticial.

O interstício testicular é composto por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, fibroblastos e mastócitos, além de aglomerados de células de Leydig (França *et al.*, 2000; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024; Ross *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 1990).

Por sua vez, o compartimento tubular que abriga os túbulos seminíferos, que são circundados pela lâmina basal, células peritubulares mióides (CPM) e túnica própria, uma camada externa constituída por matriz extracelular. O interior dos túbulos é formado por um epitélio estratificado complexo, composto por duas principais populações celulares: as células de Sertoli e as células germinativas (França *et al.*, 2000; McCoard *et al.*, 2001; 2003; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024).

As células de Leydig são os principais componentes do compartimento intersticial (Russell *et al.*, 1990) e representam uma importante fonte de andrógenos. Sua função é estimulada pelo LH e está diretamente relacionada à esteroidogênese, principalmente à produção de testosterona. Essas células apresentam uma abundante quantidade de retículo endoplasmático liso, gotículas lipídicas e mitocôndrias com cristas tubulares, que contêm enzimas essenciais para a síntese de esteroides (Haider *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 1990; Shima, 2019; Simoni & Huhtaniemi, 2017). Além da testosterona, essas células produzem quantidades menores de estrogênios e fator semelhante à insulina 3 (INSL 3) (Simoni & Huhtaniemi, 2017).

Os fibroblastos mantêm o compartimento intersticial pela secreção de fibras de colágeno, construindo o tecido conjuntivo frouxo para segurar outras células (livres) como macrófagos, mastócitos e glóbulos brancos, mas também vasos sanguíneos, vasos linfáticos e fibras nervosas (Simoni & Huhtaniemi, 2017).

As células de Sertoli são células colunares, com extensos prolongamentos apicais e laterais que circundam as células espermatogênicas adjacentes e que ocupam os espaços entre

elas (O'Donnel *et al.*, 2022; Ross *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 1990). Em mamíferos, os núcleos das células de Sertoli estão próximos à lâmina basal dos túbulos seminíferos e geralmente apresentam formato alongado ou ovoide. O núcleo possui uma textura granular fina e um nucléolo tripartite distinto, que contém as regiões centroméricas condensadas da maioria, senão de todos, os cromossomos das células de Sertoli (Russell & Griswold, 1993; Waites *et al.*, 1985).

A proliferação de células de Sertoli ao longo do desenvolvimento fetal e pré-púbere é um dos principais impulsionadores do tamanho dos testículos. Durante a vida fetal e pós-natal dos suínos existe um maior número de células de Sertoli nos cordões seminíferos (McCoard *et al.*, 2001). Após a puberdade, as células germinativas se proliferam e a proporção de células germinativas para células de Sertoli se inverte (Malmgren *et al.*, 1996; McCoard *et al.*, 2001). Malmgren *et al.*, (1996) observaram que o número médio de células de Sertoli por túbulo diminuiu ao longo do tempo, de 20,8/túbulo aos 100 dias de idade para 8,9/túbulo aos 180 dias de idade. Na fase adulta, as células de Sertoli suportam a espermatogênese e impulsionam o desenvolvimento e a função das células de Leydig. A quantidade e a função das células de Sertoli ao longo da vida são, portanto, essenciais para o funcionamento adequado dos testículos, incluindo a produção de espermatozoides e a produção de andrógenos (O'Donnel *et al.*, 2022).

A célula de Sertoli desempenha um papel fundamental na compartimentação do túbulo seminífero, formando complexos juncionais laterais, como *tight junctions*, desmossomos, junções gap, especializações ectoplasmáticas e complexos túbulo-bulbares. Essas junções estruturam dois compartimentos distintos: o basal, onde estão localizadas as células-tronco espermatogoniais, espermatogônias indiferenciadas comprometidas e os primeiros espermatócitos primários; e o adluminal, que abriga os estágios de diferenciação meiótica e pós-meiótica, incluindo espermatócitos (I e II) e espermátides (desde a forma arredondada até a alongada) (França *et al.*, 2005; Russell & Griswold, 1993). As *tight junctions* são essenciais para isolar as células meióticas imunologicamente estranhas, formando, junto com a rede de capilares endoteliais contínuos, a principal estrutura da barreira hemato-testicular (França *et al.*, 2005; Luaces *et al.*, 2023; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024; Russell & Griswold, 1993). O estudo de Zheng *et al.* (2022) com machos Duroc sugere que essa barreira se estabelece por volta dos 130 dias de idade, com base na detecção de marcadores por imunofluorescência.

As células de Sertoli também são responsáveis pela nutrição e controle hormonal do processo de meiose e subsequente diferenciação, e pela regulação seletiva do transporte de fatores de crescimento relevantes e outras moléculas através dos complexos juncionais laterais (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024). A célula de Sertoli é uma célula-chave que medeia as ações

da produção de testosterona estimulada por FSH e LH no testículo (Sharpe, 1994; França *et al.*, 2005).

As células germinativas ou espermatogênicas se proliferam e se diferenciam regularmente em espermatozoides maduros, processo denominado espermatogênese. Essas células podem ser encontradas em diferentes estágios de desenvolvimento e estão organizadas em camadas pouco definidas entre células de Sertoli (França & Russell, 1998; Senger, 2012; Zeng *et al.*, 2006; Figura 5).

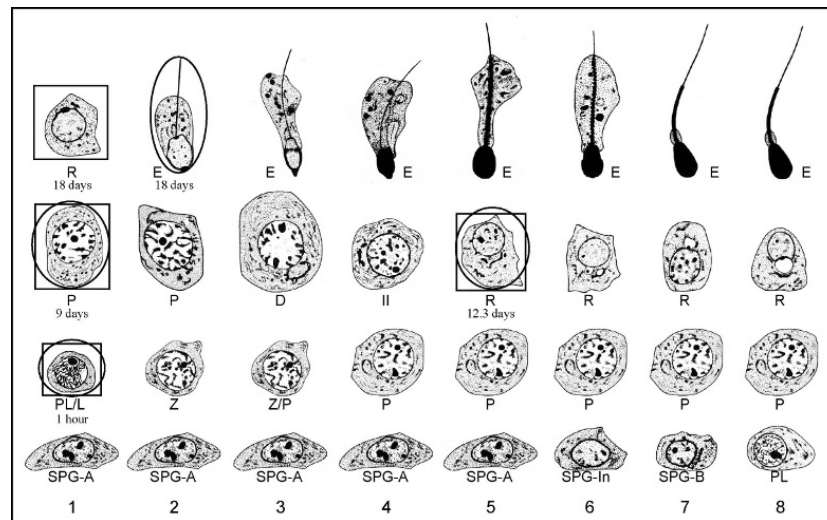


Figura 5. Diagrama ilustrando a morfologia das células germinativas ao longo dos oito estágios do ciclo do epitélio seminífero em suínos. SPG-A: Espermatogônias tipo A; SPG-B: Espermatogônias tipo B; SPG-In: Espermatogônias intermediárias; PL: Espermatócitos pré-leptótenos; L: Leptóteno; Z: Zigóteno; P: Paquíteno; D: Diplóteno; II: Espermatócitos secundários; R: Espermátides redondas; E: Espermátides alongadas. Fonte: Zeng *et al.*, 2006.

As células peritubulares mióides em suínos formam uma única camada e estão em contato direto com a membrana basal, que sustentam as células de Sertoli (O'Shaughnessy, 2015). Essas células possuem capacidade contrátil, contribuindo para a propulsão dos espermatozoides e do fluido tubular ao longo dos túbulos seminíferos (Russell *et al.*, 1990). A contratilidade das CPM é estimulada por andrógenos e alguns neurotransmissores ajudam no transporte dos espermatozoides até o epidídimo (Ross *et al.*, 2016; Senger, 2012).

A região central dos túbulos seminíferos, denominada lúmen, forma-se pelo acúmulo de fluido secretado pelas células de Sertoli sob influência dos andrógenos (De Gendt *et al.*, 2004; Jegou *et al.*, 1984; Sharpe, 1994; Welsh *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 1981). Esse fluido tubular contém substâncias essenciais para a função epididimária e desempenha um papel fundamental no transporte dos espermatozoides, ainda imóveis, através dos ductos eferentes até o epidídimo

(Russell *et al.*, 1990). A formação do lúmen ocorre após a formação da barreira hemato-testicular (França & Russell, 1998), simultaneamente ocorre a produção de fluido pelas células de Sertoli (Giffin, 2014; Griswold, 1998).

O mediastino é formado por tecido conjuntivo denso que evita o colapamento dos túbulos retos permitindo o fluxo contínuo de espermatozoides. Os túbulos retos se transformam na rede testicular (*rete testis*), composta por canais altamente anastomosados revestidos por um epitélio de células cuboides, e na sequência nos ductos eferentes, que gradativamente se juntam para formarem o ducto epididimário (Junqueira & Carneiro, 2013; Senger, 2012).

A cabeça e o corpo do epidídimo apresentam um epitélio simples, contendo dois tipos de células: células principais (colunares e altas) e basais (poligonais e curtas). Além disso, observamos as células apicais (*clear*) e células de defesa como linfócitos e macrófagos. Na cauda, o epitélio é pseudoestratificado, a altura das células principais diminui e a camada de músculo liso que envolve todo o epidídimo se torna mais espessa (Bacha & Bacha, 2012; Ross *et al.*, 2016).

### 3.2.3. Fisiologia e endocrinologia

Nos machos, a regulação do sistema genital ocorre por meio de um mecanismo de feedback negativo envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-testículos. O hipotálamo sintetiza e secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que atua sobre as células gonadotróficas da hipófise anterior, estimulando a síntese e secreção dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (Klein, 2014; Knox, 2016). A liberação ou inibição do GnRH ocorre em resposta a diversos fatores fisiológicos, incluindo maturidade sexual, estado metabólico, condições ambientais, estresse, estímulos sensoriais e o próprio feedback hormonal dos testículos (Knox, 2016). Além disso, o padrão de pulsatilidade da secreção de GnRH regula diretamente a liberação de FSH e LH, influenciando a função reprodutiva masculina (Klein, 2014).

O LH se liga aos receptores de membrana das células de Leydig, estimulando a esteroidogênese e a produção de andrógenos. Já o FSH atua nas células de Sertoli, promovendo a síntese e secreção de receptores de andrógenos, inibina e outras substâncias essenciais para a espermatogênese. Além disso, há uma interação parácrina entre as células de Sertoli e de Leydig, indicando uma comunicação bidirecional que contribui para a regulação do ambiente testicular (Klein, 2014; Knox, 2016).

A inibina, juntamente com a testosterona, está envolvida na regulação por feedback da função hipofisária. A testosterona, a di-hidrotestosterona e o estrógeno modulam a síntese e secreção de LH através de feedback negativo sobre o hipotálamo e a hipófise anterior (Klein, 2014; Knox, 2016; Senger, 2012). Em animais adultos, a liberação de testosterona ocorre aproximadamente a cada 30 minutos, após um episódio de liberação de LH. A descarga pulsátil de LH é importante para estimular uma alta produção de testosterona, aumentando a sua concentração nos túbulos seminíferos e favorecendo a espermatogênese (Hafez & Hafez, 2004; Henry, *et al.*, 2013; Senger, 2012).

A testosterona desempenha um papel essencial no desenvolvimento e funcionamento do sistema genital masculino, regulando o comportamento sexual e produção de espermatozoides. Além disso, os andrógenos e formas de testosterona influenciam a libido, a agressividade e o desenvolvimento muscular, além de promoverem o desenvolvimento do pênis, dos testículos e das glândulas sexuais acessórias. Os andrógenos também atuam como feromônios, para estimular e atrair as fêmeas (Hafez & Hafez, 2004; Knox, 2016).

Após o nascimento, a elevação do FSH é importante para estimular a proliferação das células de Sertoli e estabelecer o número destas no testículo (McCoard *et al.*, 2003; Senger, 2012). Entretanto, a elevação de FSH estimula a produção de inibina, produzida nas células de Sertoli e depende da interação com as células germinativas, que exerce um efeito retrógrado negativo sobre a liberação de FSH na hipófise. Dessa forma, a inibina desempenha um papel fundamental no controle da população de células de Sertoli, conforme ilustrado no esquema para seres humanos apresentado na Figura 6 (Hafez & Hafez, 2004; Li *et al.*, 2024; Senger, 2012).

Diversos hormônios e fatores de crescimento, como  $TGF\alpha$ ,  $TGF\beta$ , PDGF-A, IGF-1, hormônios tireoidianos, andrógenos, estrogênios, AMH e macrófagos, desempenham um papel fundamental na regulação, proliferação e diferenciação das células de Leydig e Sertoli (França *et al.*, 2005; Knox, 2016; Senger, 2012). Após a formação do testículo, o processo de masculinização é coordenado principalmente por três hormônios: o AMH, o fator de insulina do tipo 3 (INSL3) e a testosterona (Sharpe *et al.*, 2003).

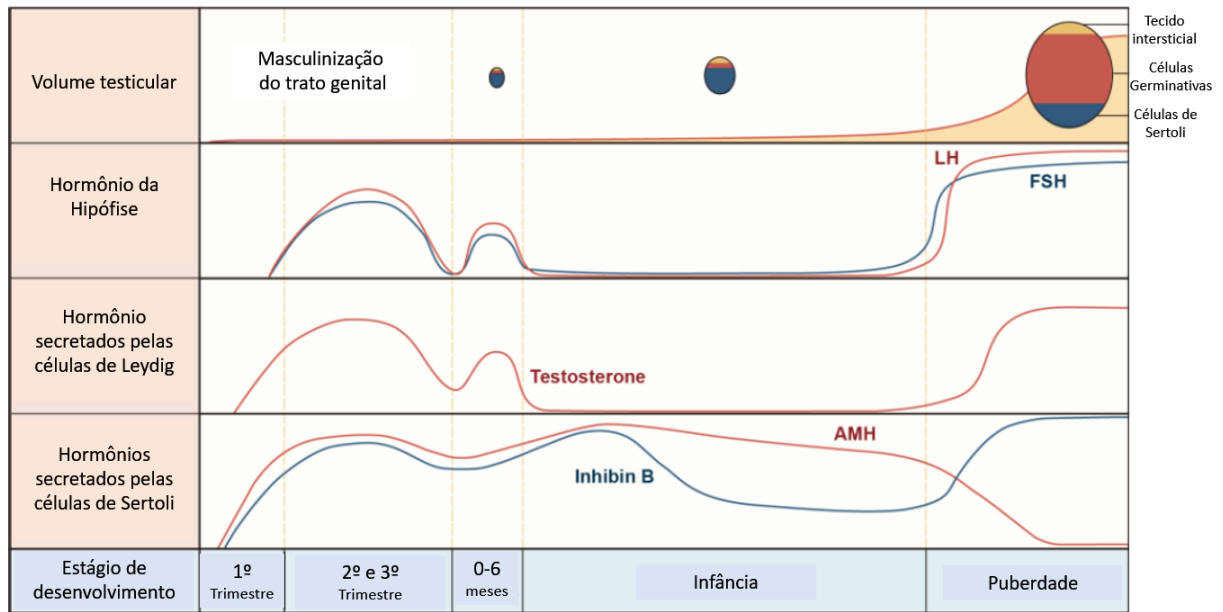


Figura 6. Desenvolvimento testicular e variação hormonal do período fetal à puberdade em humanos. O eixo HHG é ativado em três ondas: (1) No período fetal, a testosterona promove a diferenciação da genitália e o AMH induz a regressão dos ductos müllerianos, atingindo o pico na metade da gestação e declinando ao nascimento. (2) Na minipuberdade, ocorre um aumento transitório de LH e FSH, elevando a testosterona. (3) Na puberdade, a testosterona amadurece as células de Sertoli e inicia a espermatogênese, enquanto a inibina B aumenta e o AMH diminui. Fonte: Li *et al.*, 2024.

### 3.3. Desenvolvimento pós-natal e puberdade do varrão

O desenvolvimento pré-natal foi abordado no item 2.1 desta revisão devido à sua relevância, pois influencia diretamente o crescimento e a fisiologia pós-natal. Aspectos como nutrição materna, capacidade uterina e estresse térmico afetam significativamente o peso ao nascimento, impactando no desenvolvimento somático, na expressão de características sexuais secundárias e na produção espermática futura (Auler *et al.*, 2017; Flowers, 2022; Lugar *et al.*, 2018). Auler *et al.*, (2017) demonstraram que varrões com baixo peso ao nascer apresentam menor ganho de peso corporal e testicular até o oitavo mês de vida quando comparados a irmãos de leitegada com maior peso ao nascimento.

Além disso, a maior proliferação das células de Sertoli ocorre no período pré-natal tardio e no período pós-natal inicial (Lunstra *et al.*, 2003), destacando a importância desses estágios no desenvolvimento reprodutivo. A expansão e o alongamento dos cordões sexuais e da *rete testis*, inicialmente impulsionados pela proliferação das células de Sertoli e,

posteriormente, pelo início da espermatogênese, são os principais processos que promovem o crescimento testicular durante o desenvolvimento fetal e pós-natal (O'Shaughnessy, 2015). Durante o desenvolvimento pós-natal dos testículos em suínos, a maturação dos túbulos seminíferos e a formação do lúmen seguem um padrão assimétrico, sendo mais avançado nas áreas intermediárias distantes da túnica albugínea e mais perto da área central, onde a rete testis e o mediastino testicular estão localizados (Avelar *et al.*, 2010).

No período pós-natal inicial, a ingestão de colostro tem um efeito importante no desenvolvimento e na função testicular subsequente (Flowers, 2022). Rahman *et al.* (2014) observaram que a amamentação desde o nascimento influencia diretamente o desenvolvimento testicular em leitões neonatais. Além disso, leitões que amamentaram naturalmente apresentaram um aumento no número de células de Sertoli por seção transversal do túbulo seminífero até os dois dias de vida, em comparação com aqueles que não foram amamentados ou receberam alimentação artificial. Complementando esses achados, McCoard *et al.* (2001) identificaram que a proliferação de células de Sertoli é mais intensa entre o nascimento e os 14 dias de idade.

A uniformização de leitegada é uma prática comum nas granjas, no estudo de (Griffin *et al.*, 2006) leitões com pesos ao nascimento similar, mamaram em suas mães biológicas por 24 h e então foram colocados em outras fêmeas com diferentes tamanhos de leitegada, seis ou dez leitões e assim ficaram até o desmame com 21 dias. Esse procedimento resultou em uma diferença de 2,4 kg nos pesos de desmame. Após o desmame, os machos tiveram o sêmen coletado semanalmente até os 24 meses de idade. Leitões que estavam em leitegadas menores, tinham testículos maiores e produziam 27% mais espermatozoides em comparação com leitões que mamavam em leitegadas com dez leitões, sem diferenças na motilidade ou morfologia dos espermatozoides Griffin *et al.* (2006).

Zheng *et al.* (2022) conduziram uma análise histológica do testículo de machos Duroc em sete diferentes idades (7, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150 e 210 dias), abrangendo todo o período de desenvolvimento pós-natal até a puberdade (Figura 7). Os autores observaram que o diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos aumentou progressivamente a partir dos 30 dias, embora a taxa de crescimento tenha variado ao longo do desenvolvimento.

No mesmo estudo, a marcação imuno-histoquímica identificou células de Sertoli imaturas (pré-Sertoli) nos testículos entre 7 e 90 dias de idade, estando ausentes a partir dos 110 dias, sugerindo que a maturação dessas células se completa até essa idade (Zheng *et al.*, 2022). Aos 100 dias de idade Malmgren *et al.*, (1996) observaram, em média, 20,8 células de Sertoli por túbulo seminífero. O número de células de Sertoli adultas, por sua vez, determinará o

tamanho do testículo adulto e a produção de espermatozoides, uma vez que cada célula de Sertoli suportará apenas um número limitado de células germinativas (Orth, *et al.* 1988; O'Shaughnessy, 2015). O crescimento dos cordões/túbulos seminíferos foi gradual entre 30 e 110 dias de idade, seguido por um aumento acentuado em seu diâmetro no período entre 110 e 210 dias (Zheng *et al.*, 2022).

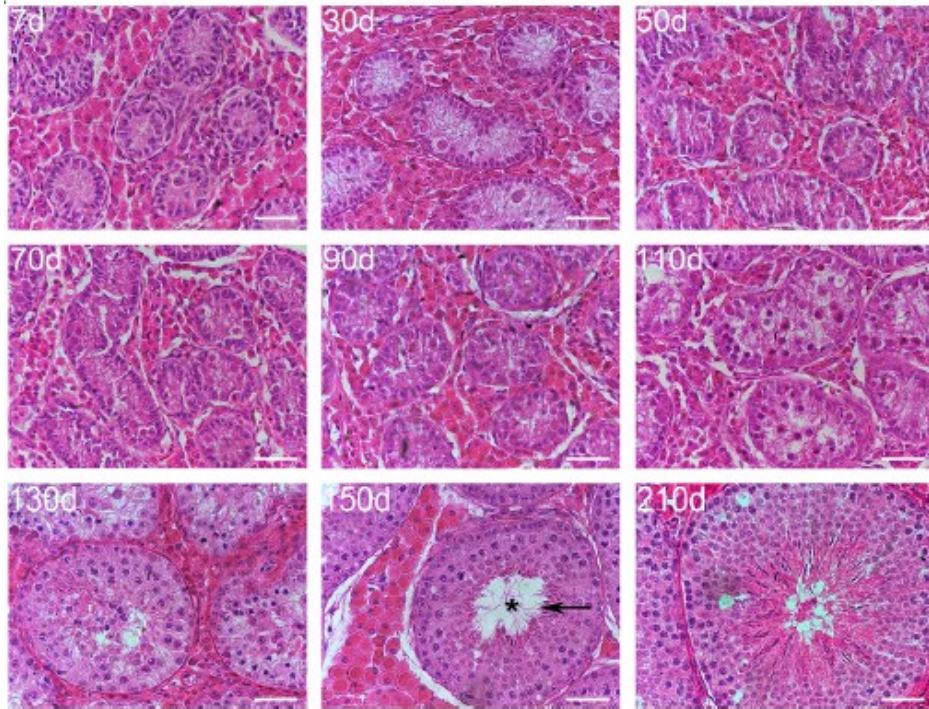


Figura 7. Desenvolvimento dos cordões/túbulos seminíferos nos testículos suínos ao longo das diferentes idades. Coloração HE. Seta aponta para espermatozoides; Asterisco se refere ao lúmen do túbulo seminífero. Barra = 50  $\mu$ m. Fonte: Zheng *et al.* 2022.

Malmgren *et al.* (1996) realizaram a coleta de testículos de machos com idades de 100, 115, 125, 140 e 180 dias e observaram que o peso testicular apresentou um aumento médio de dezoito vezes entre 110 e 180 dias de idade. Esse aumento expressivo foi atribuído ao desenvolvimento dos túbulos seminíferos e ao crescimento gradual no número de células germinativas.

O estudo também estimou que a formação do lúmen dos túbulos seminíferos ocorre por volta dos 115 dias, quando as células tubulares começaram a se separar para formar o lúmen. Corroborando com essas observações, Zheng *et al.* (2022) relataram que aos 150 dias o lúmen tubular já está completamente formado, indicando que sua formação ocorre entre 110 e 150 dias (Figura 7). Durante esse período, Malmgren *et al.* (1996) verificaram um aumento na quantidade de heterocromatina, além da presença frequente de vacúolos intracitoplasmáticos, alguns aparentavam estar vazios, enquanto outros apresentavam algum conteúdo.

A barreira hemato-testicular em suínos é estabelecida por volta dos 120 dias de vida (Ford & Wise, 2009). De acordo com o estudo de Malmgren *et al.* (1996), todos os túbulos seminíferos já apresentavam lúmen nesse período, e a barreira hemato-testicular foi completamente formada aos 125 dias, caracterizada pelas junções célula-célula típicas entre as células de Sertoli. Além disso, os primeiros espermatozoides foram observados na cauda do epidídimo aos 125 dias de idade, embora apresentassem anormalidades morfológicas nesse estágio inicial.

Aos 180 dias de idade, a espermatogênese já estava completa, sendo possível classificar os estágios do ciclo do epitélio seminífero (Malmgren *et al.*, 1996). Nessa idade, os machos apresentaram alta concentração de espermatozoides na cauda do epidídimo e menor frequência de anormalidades morfológicas.

O eixo HHG é um regulador fundamental do crescimento testicular pós-natal (Chen *et al.*, 2022). A liberação de LH ativa células progenitoras de Leydig no testículo do recém-nascido promovendo a produção de testosterona (Park *et al.*, 2024; Trudeau *et al.*, 1992). Em leitões machos não castrados, Park *et al.* (2024) observaram um aumento das concentrações séricas de LH antes do desmame, com um pico de 84 ng/mL aos 14 dias de idade. Esses resultados corroboram os achados de Colenbrander *et al.* (1977, 1978), que relataram um aumento do LH em neonatos entre 2 e 3 semanas, um fenômeno semelhante à "minipuberdade" descrita em outros mamíferos. Este evento desempenha um papel crucial no desenvolvimento e organização funcional do eixo reprodutivo antes da puberdade (Park *et al.*, 2024), sendo que sua interrupção pode comprometer a função do eixo HHG e alterar o comportamento sexual (Becker & Hesse, 2020; Lucaccioni *et al.*, 2020; Rohayem *et al.*, 2024). Após esse pico inicial, as concentrações séricas de LH diminuem progressivamente, alcançando 2,6 ng/mL aos 42 dias de idade, valor que se mantém estável até aproximadamente 140 dias. A partir daí, ocorre um aumento significativo nos níveis de LH, atingindo 28,8 ng/mL aos 168 dias e 35,4 ng/mL aos 182 dias (Park *et al.*, 2024).

A puberdade é um processo que ocorre ao longo do tempo e envolve uma sequência de alterações anatômicas e fisiológicas, resultando na aquisição da capacidade reprodutiva pelo animal. Como estas alterações não ocorrem em simultâneo, existem várias definições para o início da puberdade. Histologicamente, a puberdade tem sido definida quando os espermatozoides podem ser detectados nos túbulos seminíferos e no epidídimo (Venianaki *et al.*, 2024). Do ponto de vista fisiológico, o início da puberdade depende da capacidade de neurônios hipotalâmicos específicos de produzir GnRH em quantidades suficientes para promover e dar suporte à gametogênese (Senger, 2012). O desenvolvimento dos neurônios

hipotalâmicos GnRH é influenciado por fatores genéticos e ambientais e suas interações. O requisito fundamental para a puberdade é a secreção de GnRH na frequência e quantidades adequadas para estimular a liberação de gonadotrofina pela hipófise. As gonadotrofinas promovem a gametogênese, a esteroidogênese e o desenvolvimento de tecidos reprodutivos. O número de neurônios que secretam GnRH, sua morfologia e sua distribuição dentro do hipotálamo são estabelecidos bem antes da puberdade. No entanto, o grau em que eles funcionam aumenta à medida que a puberdade começa. O fator limitante para o início da puberdade parece ser a capacidade dos neurônios pré-sinápticos de transmitir informações aos neurônios GnRH para que a secreção de GnRH aumente. A função desses neurônios pré-sinápticos pode ser influenciada por: 1) plano de nutrição, 2) exposição a certas pistas ambientais ou sociais e 3) genética do indivíduo (Senger, 2012).

Ford & Wise (2009) estabeleceram que o início da puberdade em machos Meishan e Cruzados (BX) estava associado à diminuição de AMH, à expressão de CDKN1B dentro dos núcleos das células de Sertoli e ao aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos. No início da puberdade, a aquisição de receptores de andrógenos dentro das células de Sertoli fornece um elo para suprimir a produção de AMH. A diferenciação terminal das células de Sertoli ocorre simultaneamente à formação da barreira hemato-testicular e ao aumento da secreção de fluidos tubulares. Consideraram então que o início da puberdade pode ser definido entre o 70º e o 112º dia de idade dependendo da raça (Ford & Wise, 2009).

Durante a puberdade, as características sexuais secundárias, a libido e o comportamento sexual específico do varrão tornam-se mais pronunciados devido ao aumento do nível de testosterona (Levis *et al.*, 1997). Após a puberdade, o número de células de Sertoli permanece constante, mas como os túbulos aumentam em comprimento, conseqüentemente o número de células de Sertoli por seção transversal do túbulo diminui (Malmgren *et al.*, 1996).

O tamanho testicular é geralmente baseado na circunferência escrotal, que é um dos principais indicadores de melhoramento genético em animais domésticos reprodutores. O desenvolvimento testicular inclui a proliferação, diferenciação, crescimento e função das células germinativas, o que é um processo complexo e delicado. Estudos têm demonstrado que o tamanho testicular tem efeitos positivos no volume de ejaculação, na densidade e na motilidade dos espermatozoides em diferentes mamíferos machos, enquanto a taxa de malformação dos espermatozoides é inversamente correlacionada (Aguirre *et al.*, 2007). O tamanho testicular é, portanto, um fenótipo importante para medir o desempenho reprodutivo de animais machos (Zhao *et al.*, 2024).

Em suínos, devido a posição perineal dos testículos não é possível fazer a mensuração de circunferência escrotal, mas por outro lado, a biometria testicular é um importante indicador de tamanho do testículo, a medida do comprimento e largura é descrita em vários animais domésticos. O crescimento testicular não ocorre de forma perfeitamente simétrica. De acordo com Clark *et al.* (2003), a partir dos 240 dias de idade, os varrões geralmente apresentam testículos assimétricos, com o testículo esquerdo sendo, na maioria dos casos, maior que o direito. Noguchi *et al.* (2013) descrevem a ocorrência de testículos assimétricos em conexão com fibrose testicular. Os varrões com testículos de tamanhos diferentes também apresentam sinais de inflamação e degeneração do tecido germinativo 30% mais frequentemente do que aqueles com testículos simétricos.

Estudos apontam uma forte correlação positiva entre o crescimento pós-natal, especialmente durante períodos de intensa mitose das células de Sertoli, e a produção de espermatozoides após a maturidade sexual, destacando que a magnitude do crescimento é mais relevante que o fator causador (Flowers, 2022). Pesquisas que focaram na seleção para maior tamanho testicular próximo à puberdade demonstraram uma correlação positiva com o peso corporal (Harder *et al.*, 1995; Huang & Johnson, 1996; Rathje *et al.*, 1995; Schinckel *et al.*, 1983). Além disso, a administração de hormônio de crescimento exógeno após o desmame mostrou aumentar tanto o peso corporal quanto o desenvolvimento testicular (Deaver & Bryan, 1999).

Em bovinos, Aravindakshan *et al.* (2000) investigaram se os parâmetros endócrinos e características ultrassonográficas do sistema reprodutivo poderiam diferenciar bezerros machos de maturação precoce e tardia e, assim, prever a idade da puberdade. Os resultados indicaram que a ultrassonografia, aliada a medições hormonais, tem grande potencial como ferramenta não invasiva para estudar o desenvolvimento reprodutivo e estimar o potencial reprodutivo.

Durante o desenvolvimento testicular dos bovinos, observou-se um aumento inicial nas unidades de pixel entre o nascimento e 14-16 semanas de idade, provavelmente relacionado à proliferação celular. Após esse período, houve uma redução nas unidades de pixel, atribuída ao crescimento dos túbulos seminíferos e ao aumento de fluido no tecido testicular (Curtis *et al.*, 1981). A partir das 24 semanas, verificou-se um novo aumento nas unidades de pixel, associado ao início da divisão das espermatogônias e à formação de células mais maduras durante a espermatogênese. Essa segunda fase coincidiu com o término do aumento inicial na secreção de LH, indicando uma possível relação entre o aumento de LH e o início da espermatogênese (Aravindakshan *et al.*, 2000).

A ultrassonografia mostrou-se promissora para avaliar touros pré-púberes e potencialmente prever sua capacidade reprodutiva quando maduros. As diferenças nas unidades de pixel após 32 semanas de idade entre bezerros de maturação precoce e tardia podem ser úteis para identificar animais de maturação precoce. Além disso, o padrão de intensidade das imagens ultrassonográficas dos testículos em desenvolvimento reflete mudanças estruturais e funcionais importantes nos túbulos seminíferos e na espermatogênese, destacando a relevância dessa técnica para o manejo e seleção de reprodutores (Aravindakshan *et al.*, 2000).

Fatores externos, como nutrição, ambiência, manejo, instalações e densidade, influenciam o crescimento testicular, a idade a puberdade e início da espermatogênese. Esses efeitos são, em grande parte, mediados por alterações nos níveis de gonadotrofinas ou pela ativação de elementos de resposta genética nas células testiculares (Flowers, 2022). O crescimento em instalações individuais de machos reprodutores, frequentemente utilizada para monitorar o ganho de peso e a conversão alimentar, pode atrasar a idade a puberdade, impactar o comportamento sexual e comprometer o sistema locomotor (Levis *et al.*, 1997). Geneticamente, varrões cruzados atingem a puberdade cerca de 40 dias antes dos de raça pura, apresentando testículos mais pesados, maior concentração de espermatozoide, maior volume de ejaculação e melhor qualidade de sêmen em idades jovens (Levis *et al.*, 1997). Diferenças raciais também são marcantes: raças brancas, como Yorkshire e Large White, demonstram maior desejo sexual e sucesso reprodutivo em idades precoces, enquanto raças escuras, como Hampshire e Duroc, têm maturação mais tardia. Machos da raça Meishan, por sua vez, destacam-se por atingir a puberdade precocemente (56–84 dias), embora tenham testículos menores na puberdade (160–240 g) em comparação com outras raças convencionais (Ding *et al.*, 2016; Lunstra *et al.*, 1997).

As estratégias nutricionais pós-desmame desempenham um papel essencial no desenvolvimento reprodutivo e no desempenho físico de varrões, mas ainda são pouco estudadas. Restrições moderadas na ingestão de energia e proteína entre 1 e 8 meses podem levar a uma libido ligeiramente menor, sem prejuízo à espermatogênese (Hacker *et al.*, 1994). Reduções na ingestão alimentar entre 17% e 30% podem atrasar a puberdade em até 47 dias, mas, na prática, a maioria dos machos jovens é alimentada de forma a alcançar seu potencial de crescimento, o que minimiza impactos negativos no desenvolvimento sexual e na capacidade reprodutiva subsequente (Levis *et al.*, 1997). Em bovinos, a nutrição adequada durante o período pré-púbere antecipa a secreção de gonadotrofinas, promove a puberdade precoce e aumenta o tamanho testicular, um princípio que provavelmente se aplica a outras espécies (Barth *et al.*, 2008b; Flowers, 2022).

Estudos recentes destacam a relevância de ajustes nutricionais para melhorar a produtividade e a longevidade dos reprodutores. O aumento na ingestão de fibras durante a pré- puberdade regula a expressão de genes relacionados à síntese hormonal, favorecendo a proliferação de células de Leydig, a secreção de testosterona e a produção de sêmen (Lin *et al.*, 2022). Nas granjas núcleo e multiplicadoras, os machos em crescimento são geralmente alimentados *ad libitum* durante o teste de desempenho, priorizando o ganho médio diário (Kleve-Feld *et al.*, 2024). Lu *et al.* (2022) sugerem que um ganho diário de 400–600 g entre 6 e 8 meses é ideal. Além disso, restrições alimentares entre 140 e 200 dias de idade reduziram a taxa de crescimento, mas aumentaram a longevidade dos machos nas CCPSs, sem comprometer a produção de sêmen. Essas práticas reforçam a importância de estratégias nutricionais equilibradas em todas as fases da vida dos machos reprodutores visando otimizar o desempenho produtivo.

### 3.4. Espermatogênese e esteroidogênese

A espermatogênese pode ser definida como um processo altamente organizado que envolve a proliferação e diferenciação de células germinativas em espermatozoides maduros. Esse processo ocorre no epitélio dos túbulos seminíferos, uma estrutura composta pelas células germinativas e células de Sertoli (Lara *et al.*, 2018; O'Donnell *et al.*, 2022). Esse processo é dividido em três fases: a fase proliferativa, caracterizada pela mitose das espermatogônias; a fase meiótica, na qual os espermatócitos sofrem divisão reducional; e a fase de diferenciação ou espermiogênese, em que as espermátides se transformam em espermatozoides funcionais.

Em uma seção transversal do túbulo seminífero de suínos após a puberdade, é possível identificar até oito estágios distintos de desenvolvimento das células germinativas ao longo do processo de espermatogênese (França *et al.*, 2005; Swierstra, 1968; Zeng *et al.*, 2006). Cada estágio é composto por algumas camadas de células germinativas organizadas de acordo com um padrão específico, representando diferentes gerações celulares derivadas de uma espermatogônia do tipo B (França *et al.*, 2005; Malmgren *et al.*, 1996; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024; Zeng *et al.*, 2006; Figura 5).

Cada espermatogônia comprometida com a espermatogênese origina 64 espermatozoides, células com aproximadamente 50 µm de comprimento, compostas por uma cabeça e uma cauda dotadas de estruturas especializadas (Bonet *et al.*, 2013). Os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos de forma assíncrona, garantindo um fluxo contínuo de espermatozoides ao longo do tempo. Esse padrão de liberação

define a onda espermatogênica, caracterizada pelo transporte passivo dos espermatozoides em um fluxo constante de fluido testicular.

No suíno, os espermatozoides deixam o epitélio seminífero a cada 8,6 dias, levando aproximadamente 44 dias para completar seu desenvolvimento, desde a espermatogônia até sua liberação no lúmen (França *et al.*, 2005; Malmgren *et al.*, 1996; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024; Zeng *et al.*, 2006).

Malmgren *et al.* (1996) investigaram o início da espermatogênese em varrões e observaram que, aos 100 dias de idade, os animais ainda apresentavam cordões sexuais pouco desenvolvidos. A espermatogênese teve início por volta dos 115 dias e foi concluída aos 180 dias, quando a organização celular dos túbulos seminíferos indicava um testículo sexualmente maduro com atividade espermatogênica normal. Aos 125 dias, apenas alguns espermatozoides foram detectados na cauda do epidídimo, acompanhados por uma alta frequência de anormalidades morfológicas. Com o avanço da idade, a concentração espermática na cauda do epidídimo aumentou progressivamente, enquanto a taxa de espermatozoides anormais diminuiu. No entanto, nem todos os varrões apresentavam sêmen com características reprodutivas plenamente maduras aos 180 dias de idade (Malmgren *et al.*, 1996).

A esteroidogênese é um processo de várias etapas que converte o colesterol em hormônios esteroides. Esse processo envolve a mobilização do colesterol de gotículas lipídicas ou da membrana plasmática, seu transporte para as mitocôndrias, a conversão em pregnenolona e, posteriormente, a síntese dos esteroides finais no retículo endoplasmático liso (Senger, 2012).

A produção de andrógenos no testículo está mais associada às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático liso no citoplasma do que ao número e tamanho das células de Leydig (Lara *et al.*, 2018). A concentração intratesticular de testosterona é significativamente maior do que a plasmática, refletindo a alta demanda androgênica para a espermatogênese. A esteroidogênese testicular é essencial para a maturação espermática e a manutenção das características sexuais masculinas. Os andrógenos regulam a espermatogênese por meio das células de Sertoli, já que as células germinativas não possuem receptores para esses hormônios. Além disso, esteroides como estrogênios também desempenham um papel fundamental na espermiogênese e liberação dos espermatozoides (Lara *et al.*, 2018).

A produção de andrógenos e esteroides inicia-se com a diferenciação gonadal e se mantém até a senescência, quando seus níveis declinam. A produção de testosterona pelas células de Leydig varia conforme o desenvolvimento testicular e depende da sua composição enzimática. Durante a fase fetal, essas células sintetizam precursores androgênicos, mas a conversão final em testosterona ocorre nas células de Sertoli (Shima & Morohashi, 2017). Após

o nascimento, as células de Leydig adultas passam a produzir testosterona de forma independente, enquanto as células de Sertoli perdem essa função, tornando as células de Leydig a principal fonte desse hormônio no testículo pós-púbere (Ye *et al.*, 2017).

Em suínos, as células de Leydig passam por duas fases de proliferação antes da puberdade (França *et al.*, 2000). A primeira ocorre logo após o nascimento, até cerca de uma semana, resultando em um aumento temporário da testosterona, seguido por uma queda acentuada. A segunda inicia-se por volta das 12 semanas, promovendo a diferenciação das células de Leydig adultas e um pico pré-púbere de testosterona (Colenbrander *et al.*, 1978; Ford, 1983; Park *et al.*, 2024; Schwarzenberger *et al.*, 1993; van Straaten & Wensing, 1978; Wagner & Claus, 2008;).

No testículo adulto, a produção de testosterona pelas células de Leydig é regulada pela secreção pulsátil de LH pela hipófise. O LH atua de duas formas na esteroidogênese: garantindo a manutenção das enzimas esteroidogênicas e facilitando a mobilização e o transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna. Em suínos neonatos, as células de Leydig representam a maior parte do volume testicular, especialmente entre 2 e 3 semanas de idade (van Straaten & Wensing, 1978).

### **3.5. Seleção do macho reprodutor suíno**

Os programas de seleção de suínos geralmente visam características que impactam tanto o custo de produção quanto a qualidade da carne. Nas últimas décadas, esses programas passaram por uma evolução significativa. Inicialmente, a seleção era baseada em características quantificáveis mais simples, como tamanho da leitegada, ganho de peso diário e percentual de espessura de toucinho. Atualmente, as empresas de genética utilizam o valor genético estimado (EBV), a diferença esperada de progênie (EPD) e o melhor preditor linear não enviesado (BLUP - *Best Linear Unbiased Prediction*) (Hensel *et al.*, 2024; Safranski, 2008). Esses parâmetros são calculados a partir do desempenho fenotípico de características economicamente relevantes, combinado com informações de pedigree e dados genômicos (Robinson & Buhr, 2005; Zak *et al.*, 2017). A vantagem do mérito genético é que ele pode ser quantificado em uma idade relativamente precoce.

As empresas de melhoramento genético conduzem o processo de seleção de reprodutores por meio de um teste de desempenho que geralmente se inicia após o desmame, durante a pré-puberdade, e se estende até a peri ou pós-puberdade, geralmente entre 130 e 180 dias de idade, embora a duração exata possa variar entre as empresas. Durante esse período, são

coletados e analisados dados sobre taxa de crescimento, eficiência alimentar e potencial genético (Rothschild & Ruvinsky, 2011; Whittemore & Kyriazakis, 2008). O início do processo é denominado de "*On-test*," enquanto o término é chamado de "*Off-test*".

O melhoramento genético varia de acordo com a linhagem. Em linhagens maternas, a seleção é direcionada para características relacionadas à prolificidade, como tamanho da leitegada e capacidade uterina. Por outro lado, em linhagens terminadoras ou comerciais, a ênfase recai sobre características como composição da carcaça, qualidade da carne, eficiência alimentar e crescimento acelerado (Biermann *et al.*, 2015; Robinson & Buhr, 2005). Dessa forma, os machos não são selecionados com base em sua capacidade de produção de sêmen, mas sim pelo seu valor econômico.

Os machos selecionados com base no EBV são avaliados para fatores de conformação (sistema locomotor), defeitos como número e malformação de tetas, *status* sanitário, peso corporal, espessura de toucinho, profundidade de lombo, através de inspeção visual. A precisão desse método é altamente dependente do treinamento e da experiência do observador, e os resultados da seleção podem variar não apenas entre diferentes linhagens genéticas, mas também entre os colaboradores (Hensel *et al.*, 2024). Sendo assim a seleção visual, para conformação e defeitos está sendo lentamente substituída por processos automatizados (Bakoev *et al.*, 2020; Hensel *et al.*, 2024; Schutze *et al.*, 2020;).

Independentemente do potencial genético do reprodutor, para produzir descendentes desejáveis, ele não tem valor para uma CCPS se não puder produzir sêmen. A incidência de machos reprodutores substituídos por problemas de qualidade e produção de sêmen é variável, mas constituiu uma proporção significativa da população descartada; esse descarte involuntário interfere no programa de seleção projetado pelos geneticistas para a unidade. A seleção de jovens reprodutores para a entrada em CCPSs é principalmente baseada em seu valor genético superior. Na prática, essa seleção geralmente ocorre durante uma fase transitória, antes que os varrões atinjam a plena maturidade sexual (Schulze *et al.*, 2014). Arsenakis *et al.* (2017) observaram que um aumento na carne magra pode não ter impacto na fertilidade, enquanto a redução na espessura de toucinho pode afetar negativamente os parâmetros espermáticos. A seleção genética para características de sêmen é acessível e lógica, uma vez que essas herdabilidades são moderadas (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativas de herdabilidade para características do sêmen suíno

Características do sêmen	Herdabilidade (h <sup>2</sup> )	Número (n)		Referências
		Ejaculados	Machos	
Volume do ejaculado, mL <sup>a</sup>	0,17 ± 0,04	54 450	746	Leenhouwers <i>et al.</i> , 2008
	0,58 ± 0,030	210 733	2 862	Smital <i>et al.</i> , 2005
	0,29	45 913	896	Ogawa <i>et al.</i> , 2022
Motilidade, % <sup>b</sup>	0,20 ± 0,05	53 503	746	Leenhouwers <i>et al.</i> , 2008
	0,38 ± 0,036	210 733	2 862	Smital <i>et al.</i> , 2005
Número total de espermatozoides no ejaculado (x10 <sup>9</sup> )	0,42 ± 0,031	210 733	2 862	Smital <i>et al.</i> , 2005
	0,10 ± 0,025	37 137	778	Large White; Wolf, 2010
	0,18 ± 0,02	200 620	2 544	Pietrain; Marques <i>et al.</i> , 2017
	0,17 ± 0,02	116 781	1 697	Duroc; Marques <i>et al.</i> , 2017
	0,12 ± 0,03	43 455	866	Large White; Marques <i>et al.</i> , 2017
	0,13 ± 0,04	39 161	900	Landrace; Marques <i>et al.</i> , 2017
	0,23	45 913	896	Ogawa <i>et al.</i> , 2022

Características de herdabilidade apresentadas como média ± erro padrão. <sup>a</sup> Volume da fração rica em espermatozoides. <sup>b</sup> Proporção de células espermáticas em movimento ativo, avaliadas microscopicamente. Adaptado de Marques *et al.*, 2017; Ogawa *et al.*, 2022 e Zak *et al.*, 2017.

Varrões com alto valor genético podem apresentar limitações na qualidade do sêmen devido a problemas locomotores ou penianos, que impedem a monta ou ejaculação, ou ainda por uma baixa produção de espermatozoides causada por falhas genética, doenças ou outros fatores (Robinson & Buhr, 2005). Além disso, a pressão de seleção para uma característica pode inadvertidamente selecionar outra característica geneticamente vinculada, cuja ligação não seja reconhecida. Esses genes selecionados involuntariamente podem beneficiar, prejudicar ou não ter efeito sobre as características de produção seminal (Robinson & Buhr, 2005).

Resende *et al.* (2019) destacaram a importância das medições corporais e realização de biometria testiculares durante o período pré-desmame como preditores da capacidade de produção de espermatozoides e da melhor produtividade ao longo da vida nas CCPSs. O tamanho testicular pode afetar a produção de espermatozoides (Harder *et al.*, 1995). Os reprodutores selecionados pelo tamanho do testículo produzem aproximadamente 10% mais espermatozoides do que aqueles na população de referência não selecionada (Huang & Johnson, 1996). Os autores concluíram que a seleção pelo tamanho do testículo pode melhorar o desempenho reprodutivo dos machos. Sanglard *et al.* (2019) encontraram valores de herdabilidade (h<sup>2</sup>) de 0,69 para área testicular (largura multiplicado pela altura testicular) e 0,66

de largura testicular, concluindo que o tamanho do testículo é altamente hereditário e, portanto, pode ser usado como um critério de seleção.

Apesar do acima mencionado, as dimensões testiculares não são rotineiramente avaliadas na prática. Resende *et al.* (2019) descobriram uma correlação entre a concentração espermática e o peso corporal do varrão com uma e 15 semanas de idade, bem como com o comprimento e a largura do testículo direito com três e 15 semanas de idade, respectivamente.

O melhoramento genético voltado para o aumento da taxa de crescimento resulta em animais que se desenvolvem mais rapidamente, permitindo que indivíduos cada vez mais jovens sejam selecionados para reprodução. O estudo de Schulze *et al.* (2014) teve como objetivo analisar os efeitos da idade, raça e estação do ano nas variáveis espermáticas relevantes para a seleção de reprodutores jovens para CCPS. Foram analisadas 4611 amostras de sêmen. Eles descobriram que varrões com menos de 8 meses tinham qualidade de sêmen significativamente pior do que varrões mais velhos e, portanto, recomendaram uma idade mínima de 8 meses para seleção com base na qualidade do sêmen. Sabe-se também que a idade do varrão no momento da seleção influencia sua taxa de permanência na CCPS. De acordo com o estudo de Henneberg *et al.* (2023), a probabilidade de remoção ou descarte foi maior em animais selecionados em idades mais precoces, sugerindo que a seleção de varrões muito jovens pode impactar negativamente sua adaptação e desempenho reprodutivo na CCPS.

A inclusão de características relacionadas ao sêmen, como volume, concentração, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides anormais, como parte da estratégia de seleção é altamente recomendada. Essa abordagem possibilita avanços genéticos nessas características sem prejudicar o progresso genético das linhagens maternas e com impacto mínimo nas melhorias genéticas de características terminadoras (González-Peña *et al.*, 2015).

A conformação das pernas e a locomoção dos varrões são avaliadas visualmente por colaboradores treinados e classificadas de acordo com sistemas específicos de pontuação, sendo o mais utilizado o de Main *et al.* (2000), que varia de 0 a 5. Nas últimas décadas, diversas pesquisas foram conduzidas para desenvolver métodos automatizados para análise da locomoção e detecção de claudicação, esses novos sistemas oferecem uma abordagem mais objetiva (Hensel *et al.*, 2024). Um avanço promissor na avaliação da conformação das pernas de suínos envolve o uso de inteligência artificial por meio de aprendizado de máquina. Bakoev *et al.* (2020) testaram com sucesso um modelo preditivo baseado em algoritmos, que utiliza medições de espessura muscular, espessura de toucinho e taxa de crescimento para estimar a condição dos membros locomotores. No entanto, a adoção em larga escala de sistemas automatizados dependerá da confiabilidade, praticidade, caráter não invasivo, viabilidade

econômica e da ausência de necessidade de contato direto com os animais (Hensel *et al.*, 2024).

O uso de ferramentas moleculares e genéticas, combinado à análise fenotípica, tem aprimorado o melhoramento genético de suínos, permitindo a identificação precoce de biomarcadores reprodutivos e a seleção eficiente de reprodutores (Hensel *et al.*, 2024). Em um setor baseado na inseminação artificial, a inclusão de parâmetros reprodutivos no processo seletivo pode torná-lo mais preciso e reduzir custos de produção.

No futuro, o EBV para características produtivas não deve ser o único critério de seleção, pois pode negligenciar a fertilidade dos varrões. Assim, a triagem fenotípica, incluindo a qualidade do sêmen e a avaliação precoce do parênquima testicular por ultrassonografia, pode ser incorporada para garantir maior eficiência reprodutiva e sustentabilidade na produção suína.

### **3.6. Influência da genética sobre o desenvolvimento dos machos**

A maior parte dos suínos produzidos comercialmente resulta do cruzamento entre fêmeas de linhagens maternas, como Large White e Landrace, com sêmen de linhagens terminadoras, como Duroc e Pietrain. As empresas de genética são responsáveis pelo melhoramento genético, mantendo as raças e/ou linhagens puras em granjas núcleo ou multiplicadoras. Diferentes raças e linhagens apresentam variações significativas em parâmetros como peso ao nascer, taxa de crescimento, precocidade, facilidade de treinamento, libido, tolerância ao calor, e parâmetros seminais, incluindo volume, concentração, número total de espermatozoides, motilidade e composição do plasma seminal (Banaszewska & Kondracki, 2012; Flowers, 2008; Flowers, 2015; Huang & Johnson, 1996; Schinckel *et al.*, 1983; Schinckel *et al.*, 1984; Schulze *et al.*, 2014; Smital, *et al.*, 2004; Smital, 2009; Sonderman & Luebbe, 2008; Žaja *et al.*, 2016).

A libido e o comportamento sexual têm sido frequentemente analisados em estudos que comparam raças puras e cruzadas, sendo que os animais cruzados demonstram maior libido em comparação com seus equivalentes de raças puras (Flowers, 2008). Embora a variação fenotípica no comportamento reprodutivo de reprodutores modernos seja relativamente pequena, existem diferenças consideráveis na produção de espermatozoides. Evidências robustas indicam que uma parcela significativa dessa variação é de origem genética (Flowers, 2008).

Ding *et al.* (2016) demonstraram, por meio de análises histológicas, que os machos Meishan atingem a puberdade e desenvolvem a função sexual mais precocemente do que os machos Duroc, evidenciando variações genéticas entre raças. Essas diferenças genéticas podem

ser compreendidas por meio das taxas de crescimento somático e testicular (Ford & Wise, 2009). Embora os machos Meishan e Piau apresentem testículos menores em comparação aos reprodutores comerciais, eles diferem em sua maturidade sexual: Meishan alcançam a puberdade precocemente, enquanto os Piau apresentam maturação tardia (Ford & Wise, 2009; França *et al.*, 2000).

Linhagens com diferentes taxas de ganho de peso podem atingir a puberdade em idades distintas e apresentar variações na produção espermática (Smital, 2009). Evidências mostram que animais cruzados, com maior ganho de peso, alcançam a puberdade mais cedo e possuem maior produção espermática em comparação aos animais de raça pura utilizados em linhas terminadoras. Por sua vez, esses últimos apresentam melhor desempenho em relação aos machos puros das linhas maternas (Flowers, 2008; Schinckel *et al.*, 1983; Sonderman & Luebbe, 2008). Dentro das raças puras, o Landrace destaca-se por sua precocidade em relação ao Large White (Schulze *et al.*, 2014). Schinckel *et al.* (1984) identificaram variações no peso corporal e testicular entre diferentes raças.

A precocidade dos varrões cruzados é descrita por vários autores (Schinckel *et al.*, 1983; Smital, 2009; Sonderman & Luebbe, 2008), podendo ser relacionada ao desenvolvimento corporal e testicular, uma vez que machos com testículos maiores apresentaram maior porcentagem de túbulos seminíferos com espermatogênese presente e em maior diâmetro, maiores concentrações e pico de LH plasmático durante a puberdade (Schinckel *et al.*, 1984). Neste sentido, Sonderman e Luebbe (2008) descreveram que machos puros de linhas maternas parecem ser quatro semanas mais tardios que machos terminadores, atingindo maturidade espermática entre 34 e 38 semanas, enquanto para machos cruzados a idade seria de 25 a 29 semanas. O genótipo influencia a obtenção da maturidade reprodutiva e a morfologia dos espermatozoides em varrões pós-púberes (Resende *et al.*, 2019).

A idade de maturidade sexual varia entre raças, como demonstrado por Wilson *et al.* (1977), que identificaram que varrões cruzados possuem maior peso testicular e produção espermática em comparação com animais de raça pura, como Hampshire e Duroc, provavelmente devido a um avanço mais rápido no processo de espermatogênese.

Knecht *et al.* (2017) identificaram que o genótipo dos varrões desempenha um papel determinante em seu potencial reprodutivo e na sua eficiência em centrais de produção de sêmen. Ao avaliar a influência de diferentes fatores sobre a qualidade e a quantidade do sêmen, ficou evidente que nenhuma raça se sobressaiu em todas as características analisadas (Kennedy & Wilkins, 1984; Oh *et al.*, 2003, Smital, 2009). Já Broekhuijse *et al.* (2012c) identificaram que cerca de 6% da variação na fertilidade está relacionada aos parâmetros associados ao efeito

individual do macho e à qualidade do sêmen, destacando a significativa influência da linha genética do reprodutor.

Com relação a morfologia espermática, as gotas citoplasmáticas desempenham um papel importante na determinação da capacidade de fertilização do sêmen. É importante destacar que a sua frequência varia entre raças, sendo mais comum em varrões de algumas delas do que em outras (Banaszewska *et al.*, 2015). Nesse estudo, o sêmen de Large White e Hampshire teve uma alta porcentagem de células espermáticas com estrutura normal, em contrapartida os dados de morfologia das raças Landrace, Pietrain e Duroc tinham maior percentual de anormalidades.

Além disso, os machos Landrace demonstram maior volume de sêmen, maior motilidade espermática (Sonderman & Luebbe, 2008), concentração e produção espermática diária (Banaszewska & Kondracki, 2012; Ferreira *et al.*, 2005), embora apresentem menor libido.

Borg *et al.*, (1993) destacaram que existem diferenças entre raças quanto ao tamanho corporal, tamanho dos testículos, volume de ejaculação, espermatozoides por ejaculação e concentrações séricas de FSH e inibina. Essas variações refletem a influência genética na biologia reprodutiva dos varrões.

Estudos realizados por Schinckel *et al.* (1984), Rathje *et al.* (1995) e Jacyno *et al.* (2015) demonstraram que varrões de linhagens terminadoras apresentaram características superiores em diversos parâmetros reprodutivos, como maior concentração espermática, maior número total de espermatozoides, melhor motilidade, maior produção espermática diária e maior armazenamento de espermatozoides na cauda do epidídimo. No entanto, Resende *et al.* (2019) não observaram diferenças significativas entre linhagens maternas e terminadoras, sugerindo que outros fatores, como manejo e ambiente, podem influenciar os resultados.

Com base em pesquisas realizadas machos cruzados geralmente produzem sêmen de maior qualidade e quantidade, seguidos por linhagens terminadoras de raça pura e, por último, linhagens maternas de raça pura. As diferenças observadas incluem: sensibilidade à infertilidade sazonal, interações entre volume e idade da ejaculação, frequência ótima de coleta, taxa de descarte de ejaculados, idade da puberdade, libido e treinabilidade e vida útil do sêmen (Sonderman & Luebbe 2008).

### 3.7. Ejaculado e qualidade do sêmen

As características do sêmen que impactam a rentabilidade das CCPs incluem volume, concentração, morfologia e motilidade espermática, pois afetam diretamente o número de doses produzidas para inseminação artificial (Maside *et al.*, 2023; Sancho *et al.*, 2004). O sêmen coletado é processado após rigoroso controle de qualidade e as doses inseminantes são enviadas às granjas (Riesenbeck *et al.*, 2015; Schulze *et al.*, 2023).

A inseminação artificial, amplamente utilizada na suinocultura, pode ser realizada na forma convencional ou intrauterina, ambas proporcionando excelentes resultados reprodutivos (Bortolozzo *et al.*, 2024; Mellagi *et al.*, 2023). O ejaculado é composto por espermatozoides e plasma seminal, provenientes do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias, respectivamente. O ejaculado consiste em quatro frações consecutivas diferentes (Lavon & Bournnell, 1975; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009), a saber:

- Fração pré-espermática: composta principalmente por urina e esmegma provenientes da uretra e das glândulas bulbouretrais e apresenta aspecto aquoso, dever ser descartada.

- Fração rica: contém a maior parte dos espermatozoides do ejaculado. As células espermáticas são diluídas em plasma seminal, secretado pelas glândulas vesiculares e próstata, sendo densa e branca (López Rodríguez *et al.*, 2017; Sebastián-Abad *et al.*, 2021).

- Fração rica pós-espermática (pobre): apresenta reduzido número de espermatozoides e alto teor de plasma seminal, com um aspecto aquoso (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009).

- Fração gelatinosa: produzida pelas glândulas bulbouretrais, é sempre descartada durante a coleta (Sebastián-Abad *et al.*, 2021).

No Brasil, os parâmetros aceitáveis para a qualidade do sêmen estão descritos na Tabela 2 (CBRA, 2013). Ejaculados que não atendem aos padrões estabelecidos para motilidade, concentração e morfologia são descartados e não utilizados para inseminação artificial (Flowers, 1997; 2013).

Tabela 2. Características do sêmen suíno

Características	Jovens (8 meses)	Adultos (>12 meses)	Limites
Volume (mL)	190 - 225	200-350	100
Motilidade espermática (%)	75	80	70
Concentração espermática (x10 <sup>6</sup> /mL)	180-200	200-400	-
Nº total de espermatozoides (x10 <sup>9</sup> )	35-45	30-60	10
Espermatozoides morfológicamente alterados (%)	20-25	5-15	30% (máx.)

Adaptado de CBRA 2013.

A produção e a qualidade do sêmen estão diretamente relacionadas à idade dos varrões. A produção diária de espermatozoides aumenta progressivamente ao longo do tempo, atingindo seu pico por volta dos 24 meses de idade (Kennedy & Wilkins, 1984). Um estudo de Bane *et al.* (1977) indicou que, antes dos seis meses de idade, a maioria dos varrões apresentava um perfil de sêmen considerado "imaturo", caracterizado por uma alta frequência de espermatozoides com morfologia anormal e uma baixa contagem total de espermatozoides no ejaculado. Nos meses subsequentes, observou-se uma normalização desses parâmetros, embora alguns varrões ainda apresentassem sêmen "imaturo" aos nove meses de idade (Malmgren *et al.*, 1996).

A motilidade espermática é um indicador de metabolismo espermático, sendo necessária para manutenção dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea e penetração na zona pelúcida no momento da fecundação (Johnson *et al.*, 2000; Menegat, 2016). A motilidade está associada aos parâmetros de fertilidade, sendo capaz de explicar apenas 4% (Broekhuijse *et al.*, 2012a). Entretanto, Broekhuijse *et al.*, (2012b) identificaram uma relação positiva entre o aumento das motilidades total e progressiva no sêmen *in natura* e tamanho da leitegada e taxa de parto. Recentemente, estudos mostraram a relação entre parâmetros de cinética da motilidade com tamanho de leitegada (Barquero *et al.*, 2021) e taxa de prenhez (Winters *et al.*, 2018).

A morfologia espermática é considerada um dos principais fatores que afetam o tamanho da leitegada e número de leitões nascidos (McPherson *et al.*, 2014). Entretanto, se as anormalidades estiverem dentro dos limites aceitáveis (Tabela 2), a morfologia não impactará a fertilidade (Alm *et al.*, 2006; Feitsma 2009). Por outro lado, a correlação entre anormalidades morfológicas e a fertilidade *in vitro* ou *in vivo* já foi demonstrada para defeitos de acrossoma, de cabeça e presença de gotas citoplasmáticas (Kopp *et al.*, 2008; Kummer *et al.*, 2013; McPherson *et al.*, 2014; Schulze *et al.*, 2013). Há evidências de genes ligados às principais alterações morfológicas, como: gota proximal e distal, caudas dobradas e caudas enroladas e reflexo distal da peça intermediária (Zhao *et al.*, 2020). Esses genes podem exercer uma função na espermatogênese, nos testículos e na disposição da membrana plasmática (Zhao *et al.*, 2020).

A avaliação da integridade de acrossoma é utilizada como indicativo da viabilidade espermática e da qualidade do armazenamento das doses (Johnson *et al.*, 2000). Durante o armazenamento da dose inseminante, o acrossoma pode ser comprometido pela capacitação espermática prematura, o que leva a exocitose das enzimas acrossômicas (Fazeli *et al.*, 1997).

A integridade da membrana plasmática é um requisito essencial para a sobrevivência das células espermáticas (Menegat, 2016; Pintado *et al.*, 2000). A avaliação da membrana ocorre através de corantes ou sondas fluorescentes no interior do espermatozoide. Para

considerar um ejaculado de qualidade os parâmetros de 80 a 90% de membranas intactas são requeridos (Johnson *et al.*, 2000).

Vários são os métodos utilizados para avaliação da concentração espermática, como: câmaras de contagem, espectrofotômetro, nucleocounter e sistema CASA. O sistema CASA tem sido comumente utilizado em CCPS suíno comercial, ele fornece uma medição objetiva e detalhada de vários aspectos de uma amostra ou do espermatozoide individualmente, incluindo concentração, motilidade e morfologia (Boe-Hansen & Satake, 2019). A avaliação da concentração é de fundamental importância para a fertilidade, pois ela pode mascarar a subfertilidade (Roca *et al.*, 2016). Ao se reduzir o número de espermatozoides na dose seminal é possível identificar machos sub-férteis com maior eficácia (Dyck *et al.*, 2011; Lucca *et al.*, 2021) devido aos piores resultados de desempenho reprodutivo, como taxa de parto e total de nascidos (Kummer *et al.*, 2013; Ruiz-Sanchez *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2011).

### **3.8. Princípios de ultrassonografia**

A ultrassonografia é uma forma de som que extrapola a faixa de som audível no espectro acústico. O som é transmitido por ondas sonoras, que vibram em frequências específicas, medidas em hertz (Hz), então 26 hertz equivalem a um ciclo por segundo e um mega-hertz (MHz) equivale a um milhão de ciclos por segundo (Muñoz, 2017). Os humanos são capazes de ouvir sons que vibram a uma frequência de 20 a 20.000 Hz (Díez, 1992), assim não são capazes de ouvir as frequências comumente usadas em ultrassom médico, que variam de 2 a 10 MHz (Kiefer & Kiefer, 2003). Nesse contexto, a imagem ultrassonográfica baseia-se na densidade relativa dos tecidos examinados, ou seja, na capacidade intrínseca dos tecidos de refletir ou transmitir ondas de pressão acústica de alta frequência (Evans *et al.*, 1996). A descoberta dos cristais piezoelétricos e seus efeitos de expandir e contrair em resposta à polaridade alternada dos sinais elétricos foi o ponto de início da tecnologia ultrassonográfica. Esses cristais, presentes no transdutor (probe ou sonda), produzem ondas de ultrassom que quando aplicados ao tecido, recebem e convertem os ecos resultantes em sinais elétricos. Os transdutores diferem em forma e tamanho, cujo design determina a área de visibilidade, a frequência de operação, a profundidade de penetração da onda sonora e a resolução dos dados obtidos, isto é, a qualidade de imagem (Zozulia & Pash, 2023). Os transdutores mais utilizados na medicina veterinária são: o setorial, com elemento piezoelétrico giratório, o linear, com matriz retangular e o convexo, com matriz curva (Figura 8; Zozulia & Pash, 2023).

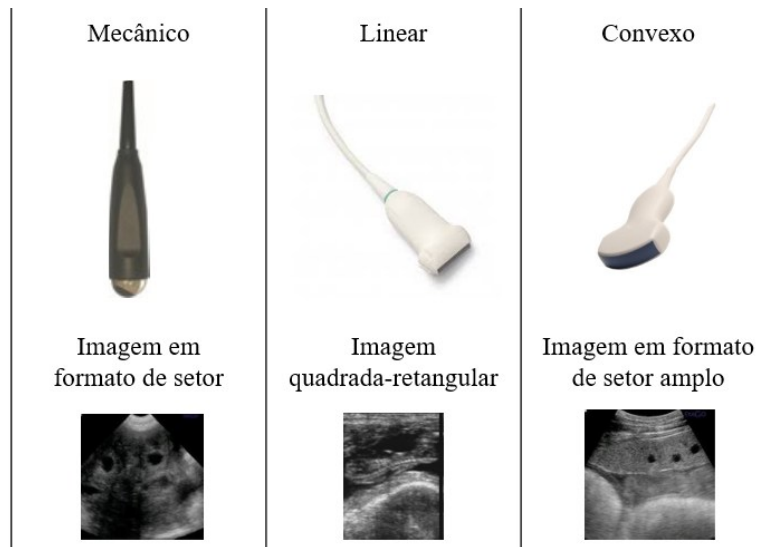


Figura 8. Principais modelos de transdutores utilizados em animais de produção e imagem característica de cada modelo. Adaptado de Zozulia & Pash, 2023.

Ao penetrar no tecido que está sendo escaneado, o feixe de ultrassom pode seguir algumas trajetórias, sendo elas: a reflexão retroativa na mesma direção, a refração em direção diferente, a dispersão em muitas direções e a absorção no tecido por conversão de calor (Figura 9; Azhari, 2010; Gerwing, 1993; Ginther, 2014; Muñoz, 2017).

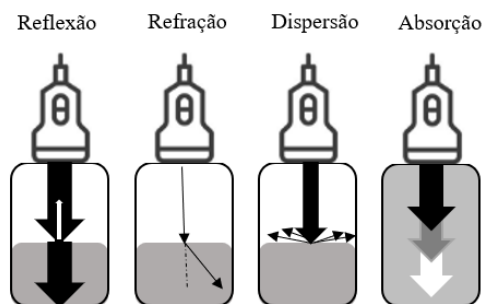


Figura 9. Comportamento dos feixes de ultrassom ao propagar pelos tecidos. Adaptado de Muñoz, 2017.

O enfraquecimento progressivo do feixe de ultrassom, à medida que ele é refletido, refratado, disperso e absorvido é chamado de atenuação. As ondas sonoras que foram refletidas ou espalhadas de volta ao transdutor são convertidas em sinais elétricos pelos elementos de cristais piezoelétricos no transdutor. O sinal elétrico é convertido em sinal de imagem (pixels) no processador do ultrassom, sendo exibido no monitor em diferentes tons de cinza (intensidades de pixel), dando origem à imagem observada no monitor (Ginther, 2014; Zozulia & Pash, 2023). Quanto maior for o reflexo das ondas, maior será a amplitude da onda e o processador do ultrassom a traduz em pontos ou pixels mais brancos. Quanto menor o reflexo, mais pontos pretos aparecem na imagem. Sendo assim, a imagem preta representa uma área onde nenhuma onda sonora é refletida, normalmente é uma estrutura cheia de líquido (exemplo:

urina na bexiga), essas regiões são denominadas como anecóicas. A imagem cinza, representada por tecidos moles reflete algum som (exemplo: gordura, músculo, fígado), essas regiões podem ser descritas como ecogênicas e categorizadas com base no fato de serem mais brilhantes ou brancas (hiperecóicas, exemplo: ossos) ou mais escuras ou próximas ao preto (hipoecóicas) (Nepomuceno *et al.*, 2013; Zozulia & Pash, 2023).

A atual disponibilidade de equipamentos de alta frequência e resolução tem permitido a avaliação precisa da composição celular de um tecido. Além disso, a análise de imagens digitais transforma os achados ultrassonográficos em dados quantificáveis e objetivos. Assim, a ecogenicidade, ou seja, a intensidade do pixel, é descrita em termos de valores numéricos que variam de 0 (preto absoluto) a 255 (branco absoluto) e a heterogeneidade como desvio padrão da ecogenicidade do pixel, que reflete a existência de áreas hiper e hipoecóicas intercaladas em um tecido (D'Francisco *et al.*, 2020; Giffin *et al.*, 2009; Pierson & Adams, 1995; Singh *et al.*, 1998).

A imagem exibida consiste em uma matriz de elementos de imagem (pixels), em que cada pixel representa uma determinada impedância acústica exibida em uma escala de tons de cinza (Arteaga *et al.*, 2005). A impedância acústica, por sua vez, está relacionada à densidade do tecido atravessado pelo feixe acústico, resultando em um maior (deslocamento para o branco no exame ultrassonográfico) ou menor (deslocamento para o preto no exame ultrassonográfico) retorno do eco. Assumindo uma relação entre a intensidade do pixel e a capacidade de um ponto específico refletir o feixe acústico como um indicativo da densidade tecidual, diversos estudos investigaram a relação entre a intensidade do pixel em ultrassonogramas testiculares, quantificada por softwares de análise de imagem, e a qualidade do sêmen em animais domésticos (Ahmadi *et al.*, 2012; Arteaga *et al.*, 2005; Brito *et al.*, 2012, Carvajal-Serna *et al.*, 2022, England *et al.*, 2017, Moxon *et al.*, 2015) e humanos (Garolla *et al.*, 2021, Moon *et al.*, 2006, Sakamoto *et al.*, 2008, Schurich *et al.*, 2009).

A transmissão das ondas ultrassônicas está relacionada ao tipo de tecido onde o transdutor é aplicado, enquanto a velocidade de propagação da onda sonora depende da densidade e composição do meio (Gerwing, 1993; Kleßler, 2010). O produto entre densidade e velocidade de propagação define a impedância acústica, que representa a resistência do meio à vibração de suas moléculas (Gladisch, 1992; Wigger & Kramer, 2008). Cada tecido possui propriedades acústicas específicas (Tabela 3; Poulsen Nautrup, 1996).

Além das propriedades físico-químicas dos principais componentes (proteína, gordura e água), fatores como quantidade relativa, distribuição e interações bioquímicas dos constituintes influenciam os valores numéricos dos pixels, afetando o brilho e a intensidade da

imagem. Dessa forma, devido à sua estrutura macroscópica e características histofisiológicas, cada órgão e tecido apresenta uma ecotextura única e individualizada (Ahmadi *et al.*, 2013).

Tabela 3. Propriedades acústicas dos meios biológicos

Meio	Velocidade de condução sonora (m/s)	Reflexão r (%)	Transmissão d (%)
Ar	330	99,88	0,12
Água	1495	0,00	100,00
Osso	3360	46,00	54,00
Músculo	1550-1650	0,48	99,52
Fígado	1550	0,30	99,70
Gordura	1450-1480	0,12	99,88

Adaptado de Gerwing (1993), Kleßler (2010) e Kramer (2004).

A difusão das ondas ultrassônicas não é linear, dependendo da concentração dos blocos de construção bioquímicos de um tecido (Sehgal, 1993), cujos principais componentes são água, gordura e fibras de colágeno. O ar como uma mistura de gás impede a transmissão (Rantanen & Ewing, 1981). Tecidos duros, como ossos e dentes, refletem e amplificam fortemente as ondas acústicas e, devido a essa propriedade, são acessíveis apenas em uma extensão muito limitada para o exame ultrassonográfico (Azhari, 2010).

A aparência ultrassonográfica ou padrão de imagem de um tecido é denominado ecotextura e é determinado pela estrutura histológica do tecido (Ginther, 1995; Powis & Powis, 1984; Singh *et al.*, 1997, 1998; Singh & Adams, 2000).

Além das propriedades dos tecidos, a frequência do pulso ultrassonográfico é também importante no processo de criação de imagens ultrassonográficas. O número de ondas repetidas por segundo (Hz ou MHz) está relacionado à velocidade de transmissão e ao comprimento de onda (Keßler, 2010). O comprimento de onda define a duração de um ciclo no tecido e é inversamente proporcional a frequência, ou seja, em frequências mais altas o comprimento de onda diminui e a duração do pulso de ultrassom no tecido é mais curta (Figura 10). Assim sendo, a alta frequência oferece boa resolução, mas possui baixa profundidade de penetração (Wigger & Kramer, 2008). Devido a essas propriedades físicas contrastantes das ondas sonoras, deve-se objetivar um equilíbrio entre a profundidade de penetração e a resolução ao utilizar o ultrassom (Hermes, 1998).

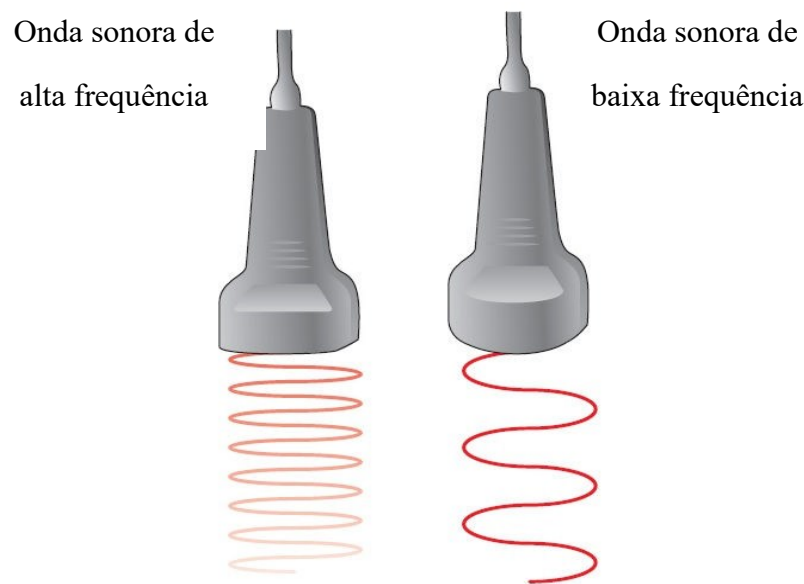


Figura 10. Diferenças entre as ondas sonoras de alta e baixa frequências. A forma de onda de alta frequência fornece melhor resolução em tecidos mais superficiais. Já a forma de onda de baixa frequência penetra profundamente no tecido. Adaptado de Horita, (2021) e Strakowski, (2016).

Outros fatores importantes para a qualidade da imagem ultrassonográfica é a resolução e a atenuação. Entende-se por resolução a capacidade do transdutor de distinguir a distância mínima entre duas estruturas dentro do tecido (Gladisch, 1992; Kuchiling, 1972; Segura-Grau *et al.*, 2014). Assim, se o ultrassom tiver capacidade de resolução de 3 mm, significa que duas estruturas anatômicas diferentes separadas por 3 mm aparecerão como dois ecos diferentes na imagem. No entanto, caso duas estruturas estejam separadas por 2 mm, elas aparecerão na imagem como uma estrutura única, interferindo na qualidade da avaliação (Segura-Grau *et al.*, 2014). Adicionalmente, a resolução pode ser diferenciada em axial, quando dois pontos são medidos na direção do eixo da onda sonora (Wigger & Kramer, 2008) ou lateral, quando dois pontos são situados no plano perpendicular à onda sonora (Nepomuceno *et al.*, 2013; Segura-Grau *et al.*, 2014). Por outro lado, atenuação é a perda de energia sofrida por um feixe de ultrassom durante a sua propagação por um tecido como resultado de sua absorção, reflexão, refração e/ou difusão. Sendo assim, entende-se por atenuação o amortecimento progressivo do som à medida que viaja através de um tecido, sendo, portanto, finita (Segura-Grau *et al.*, 2014).

A consideração dos artefatos ultrassonográficos específicos do tecido tem uma influência decisiva na interpretação macroscópica correta e na análise estrutural fina das imagens de ultrassom (Beyer, 2020). Artefatos de ondas sonoras incluem reflexos angulares (curvatura), reverberação (reeco), atenuação (enfraquecimento), sombreamento (bloqueio) e realce ou transmissão direta (Ginther, 1986). Ecos artificiais complicam o processo de

interpretação e podem ser confundidos com estruturas ou alterações normais ou patológicas. A interpretação de imagens ultrassônicas é muito importante para o diagnóstico adequado, assim sendo o examinador deve ter conhecimento técnico e experiência.

### **3.8.1. Modos de exibição do ultrassom**

No aparelho de ultrassom, formado por processador e monitor, as ondas sonoras (ecos) podem ser demonstradas de várias formas, o que reflete os modos de exibição do ultrassom (Nepomuceno *et al.*, 2013).

O Modo-A (Amplitude) é o mais simples e corresponde à emissão e recepção de um único feixe de ultrassom visibilizado em um osciloscópio, onde é possível fazer mensurações precisas de comprimento e profundidade. É um método unidimensional e de grande aplicabilidade na oftalmologia. Nos animais de produção, principalmente suínos e ovinos, é utilizado para o diagnóstico de gestação e, especificamente em suínos, para medição de gordura subcutânea (Cartee, 1995; Siems, 2000; Carvalho, 2004; Kealy, McAllister, Graham, 2012; Nepomuceno *et al.*, 2013).

No modo bidimensional ou Modo-B, a intensidade de reflexão é dada por um ponto luminoso no monitor (Nepomuceno *et al.*, 2013). As diferentes intensidades de brilho relacionadas às diversas ecogenicidades dos tecidos são apresentadas em escalas de cinza, sendo proporcional à intensidade de reflexão. Esse modo é o mais utilizado para exames ultrassonográficos (Kealy, McAllister, Graham, 2012; Nepomuceno *et al.*, 2013) e o mais indicado para a avaliação do sistema genital dos machos suínos.

O Modo-M ou modo movimento é responsável pela representação de estruturas que estão em constante mobilidade. O feixe sonoro atravessa a estrutura em movimento, e a mudança na distância das interfaces refletoras é registrada em relação ao tempo, por meio de um traçado. Esse modo é indicado para avaliação de estruturas cardíacas (Nepomuceno *et al.*, 2013).

Já o Modo Doppler, está relacionado ao uso do princípio Doppler, no qual se verifica a alteração da frequência das ondas sonoras refletidas quando o objeto refletor se move em relação a uma fonte de onda sonora (Nepomuceno *et al.*, 2013). Nos vasos sanguíneos, a movimentação das hemácias é considerada um objeto refletor.

### 3.8.2. Análise em escala de cinza

O desenvolvimento de equipamentos de ultrassom de alta resolução proporciona uma quantidade cada vez maior de dados por imagem e unidade de tempo. O olho humano, com visão normal, consegue diferenciar até 25 tons de cinza (Gebel, 2000; Pierson & Adams, 1995), porém, os aparelhos de ultrassom exibem 256 variações do preto ao branco no monitor, impossibilitando a avaliação detalhada das imagens pelo olho humano (Pierson & Adams, 1995; Zink, 1996). Sendo assim, fez-se necessário um processamento objetivo e computadorizado dos dados ultrassonográficos (Hermes, 1998). A análise computacional permite identificar diferenças de ecotextura e mensurá-las de forma objetiva, pelo estabelecimento de algoritmos computacionais. Estes algoritmos têm sido desenvolvidos especificamente para análises de imagens de ultrassom com o objetivo de reduzir a subjetividade da avaliação visual, quantificando os valores de cada pixel da imagem (Singh *et al.*, 2003).

A análise em escala de cinza (*Grey Scale Analysis - GSA*) tem como objetivo aumentar o valor informativo do exame ultrassonográfico, através da determinação de parâmetros quantitativos (Gärtner *et al.*, 1998). A GSA permite a conversão de informações da imagem em dados numéricos, permitindo assim, a realização de análises estatísticas (Ginther, 1995; Keßler; 2010).

A imagem ultrassonográfica em modo B é digitalizada no processador do equipamento para a obtenção dos pixels em cada ponto. A cada pixel é atribuído um valor de cinza entre 0 e 255 para a avaliação, sendo necessário a seleção de uma região representativa no tecido a ser examinado. Esta área é chamada de “Região de Interesse” (ROI) e deve ter um tamanho fixo (caixa, quadrado, elipse) ou pode ser circundada livremente (Figura 11, A e B; Bader *et al.*, 1994; Pozor *et al.*, 2017).

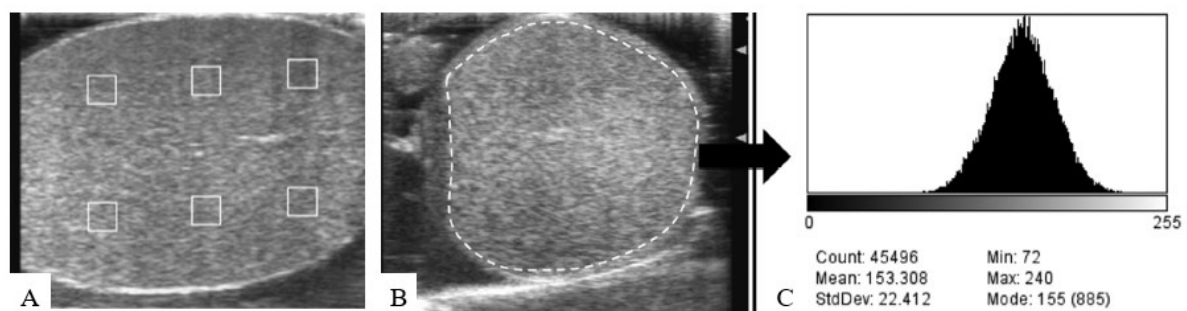


Figura 11. Exemplo de ROI e histograma gerado pela análise GSA. A: Representação de ROI, quadrados. B: Representação de ROI, circundada livremente. A e B: Testículo de garanhão. C: Análises estatísticas de GSA na imagem ultrassonográfica, histograma. Count: contagem;

Mean: média; StdDev: desvio padrão; Min: valor mínimo; Max: valor máximo; Mode: moda. Adaptado de Pozor *et al.*, 2017.

Nas análises de GSA, a distribuição de frequência de determinadas escalas de cinza é representada por meio de uma tabela e/ou um histograma (Figura 10, C) como base para as estatísticas da escala de cinza. O histograma refere-se a um gráfico, em que a abcissa representa os diferentes tons de cinza, e a ordenada, a frequência dos tons de cinza (Keßler, 2010; Pozor *et al.*, 2017).

Segundo o estudo de Schulze *et al.*, (2020), os principais parâmetros da GSA são: MAXGV (valor máximo de cinza), MINGV: (valor mínimo de cinza), MEANGV (valor médio de cinza), DEVOFTHEMEAN (desvio padrão do valor médio de cinza), HET (heterogeneidade), NORMGSH (histograma de escala de cinza normalizado para largura de nível 5%), AUC (área abaixo da curva) e MEANGRAD (valor gradiente médio de cinza). Esses mesmos autores sugerem que os valores MAXGV e MINGV podem refletir o aumento da quantidade de fluido anecoico no parênquima testicular. O fluido pode ser o exsudato de uma inflamação subclínica. Isso pode levar a danos no parênquima testicular (Schulze *et al.*, 2020).

Os métodos de GSA podem ser classificados entre unidimensionais e multidimensionais. Os métodos unidimensionais são obtidos estatisticamente a partir do histograma de escala de cinza, e incluem as variáveis MAXGV, MINGV, DEVOFTHEMEAN, HET, NORMGSH e AUC. Por outro lado, MEANGRAD é um parâmetro associado ao método multidimensional que considera o arranjo espacial dos pixels e permite avaliar a composição tecidual com base em variações texturais da imagem (Keßler, 2010). Esse tipo de abordagem proporciona maior precisão na caracterização da imagem, possibilitando a detecção de padrões específicos em regiões anatômicas definidas (Beyer, 2020). Para assegurar a reprodutibilidade e a acurácia das análises por GSA, é fundamental padronizar os parâmetros do equipamento de ultrassonografia, manter o foco constante e definir a ROI de forma consistente, preferencialmente na mesma posição anatômica (Gärtner *et al.*, 1998; Keßler, 2010).

### **3.9. Ultrassonografia no exame andrológico veterinário**

O exame ultrassonográfico tem sido utilizado em associação ao exame andrológico, principalmente para identificar desordens subclínicas (Carvajal-Serna *et al.*, 2022; Gouletsou *et al.*, 2003; Mellagi *et al.*, 2017). A ultrassonografia é uma técnica prática e não invasiva que permite a avaliação do tamanho, forma e aspecto de estruturas como epidídimos e testículos

(Cartee *et al.*, 1986; Clark *et al.*, 2003; Kauffold *et al.*, 2011). Essa técnica exige uma contenção mínima para a segurança do operador e do animal. Atualmente, os equipamentos desenvolvidos são portáteis e leves, simples de se utilizar no campo (Zozulia & Pash, 2023).

Na andrologia veterinária, o exame de ultrassom e GSA, é empregado em várias espécies visando obter mais informações da representação do testículo e fornecer uma indicação da microestrutura do tecido, espermatogênese e da secreção hormonal reprodutiva (Brito *et al.*, 2012; D'Francisco *et al.*, 2020; Evans *et al.*, 1996). Nas últimas décadas, muitos estudos têm mostrado que a ultrassonografia testicular pode ser útil no diagnóstico do potencial reprodutivo de animais jovens e monitorar esse potencial nos adultos. Esses estudos comparam a relação entre a ecogenicidade e ecotextura ultrassonográfica do parênquima testicular (tons de cinza) e a qualidade seminal dos animais (Brito *et al.*, 2012; Carvajal-Serna *et al.*, 2022; Pinho *et al.*, 2018; Schulze *et al.*, 2020). Cabe destacar ainda que Bracco *et al.*, (2023) observaram que alterações na intensidade do pixel testicular estavam correlacionadas com a porcentagem de espermatozoides vivos e morfologicamente normais no estudo com cães.

Em relação à microestrutura do parênquima testicular, Brito *et al.* (2012) relataram correlações entre a intensidade média de pixels com o diâmetro tubular ( $r = -0,3$ ) e com a área do epitélio seminífero ( $r = -0,2$ ) em bovinos. Além disso, foi possível identificar fibrose testicular no parênquima testicular de bovinos, conforme destacado por Barth *et al.* (2008a) e Pinho *et al.* (2013ab).

O mediastino testicular foi definido por Gouletsou *et al.*, (2003) como uma massa de tecido fibroso contendo numerosos túbulos finos na região central da glândula, podendo ser observado em testículos de humanos, caprinos, bovinos, suínos e caninos. Com a utilização da ultrassonografia, é possível observar o mediastino no plano longitudinal como uma estrutura linear centralizada, e no plano transversal como uma estrutura focal (Urt, 2014).

Sergio *et al.* (2022), avaliaram o potencial da ultrassonografia testicular para prever a qualidade do sêmen produzido por touros pertencentes a CCPS. Demonstraram diferentes níveis de associação entre os parâmetros do ultrassom e a qualidade do sêmen, sendo necessário realizar mais estudos para confirmar o uso da ferramenta na previsão da capacidade reprodutiva em bovinos.

A Tabela 4 resume os principais achados relacionados aos parâmetros de GSA e ecogenicidade, destacando as mudanças fisiológicas no parênquima testicular entre diferentes espécies.

Tabela 4. Panorama da literatura sobre as mudanças fisiológicas entre espécies nos parâmetros ultrassonográficos e escala de cinza do parênquima testicular

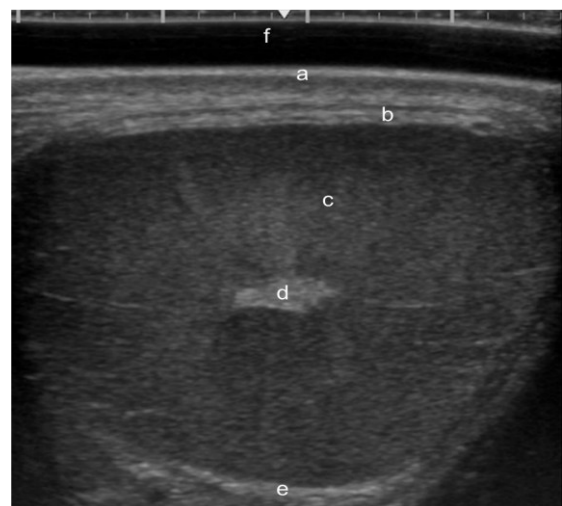
Parâmetro ultrassonográfico ou GSA	Fisiologia	Espécie	Referência
Ecogenicidade	Aumento durante a puberdade	Bovino	Chandolia <i>et al.</i> 1997
Ecogenicidade	Aumento durante a puberdade	Bovino	Brito <i>et al.</i> 2012
Ecogenicidade	Aumento da motilidade espermática progressiva após um ciclo de espermatogênese	Canino	England <i>et al.</i> 2017
MAX GV	Diminui com o aumento da proporção de túbulos seminíferos	Ovino	Omer <i>et al.</i> 2012
MAX GV	Diminui com o aumento do conteúdo de proteína no parênquima testicular	Ovino	Ahmadi <i>et al.</i> 2013
MAX GV	Aumento entre 100 e 170 dias de idade	Suíno	Schulze <i>et al.</i> 2020
MIN GV	Aumento com aumento nos túbulos seminíferos e lúmen	Ovino	Omer <i>et al.</i> 2012
MIN GV	Aumento entre 100 e 170 dias de idade	Suíno	Schulze <i>et al.</i> 2020
MEAN GV	Correlação positiva com a contagem total de espermatozoides atual	Canino	Höhne <i>et al.</i> 2002
MEAN GV	Aumentar com o aumento da proporção de túbulos seminíferos	Ovino	Giffin <i>et al.</i> 2009
MEAN GV	Diminui com o aumento da idade do animal	Bovino	Ligner, 2009
MEAN GV	Aumento com a baixa densidade celular no parênquima testicular	Ovino	Omer <i>et al.</i> 2012
MEAN GV	Aumento com diminuição dos túbulos seminíferos, área epitelial e diâmetro dos túbulos	Bovino	Brito <i>et al.</i> 2012
MEAN GV	Diminui com o aumento do conteúdo de proteína no parênquima testicular	Ovino	Ahmadi <i>et al.</i> 2013
MEAN GV	Correlação positiva com a motilidade espermática após um ciclo de espermatogênese	Canino	England <i>et al.</i> 2017
MEAN GV	Aumento entre 100 e 170 dias de idade	Suíno	Schulze <i>et al.</i> 2020
STD DEV	Aumenta com o aumento da proporção de túbulos seminíferos e lúmen	Ovino	Giffin <i>et al.</i> 2009
STD DEV	Aumenta no início da espermatogênese	Ovino	Ahmadi <i>et al.</i> 2012
STD DEV	Diminui com o aumento do conteúdo de proteína no parênquima testicular	Ovino	Ahmadi <i>et al.</i> 2013
STD DEV	Aumenta com o aumento do conteúdo de lipídios no parênquima testicular	Ovino	Ahmadi <i>et al.</i> 2013
STD DEV	O aumento se correlaciona positivamente com a contagem total de espermatozoides	Canino	Moxon <i>et al.</i> 2015
STD DEV	Aumento durante a puberdade	Equino	Pozor <i>et al.</i> 2017
GRAD	Aumento entre 100 e 170 dias de idade	Suíno	Schulze <i>et al.</i> 2020

Ecogenicidade avaliada macroscopicamente (ecogenicidade), valor máximo de cinza (MAX GV), valor mínimo de cinza (MIN GV), valor médio de cinza (MEAN GV), desvio padrão do valor médio de cinza (STD DEV), valor gradiente médio de cinza (GRAD). Adaptado de Beyer, S. (2020).

### 3.10. Avaliação ultrassonográfica reprodutiva em suínos

Nos varrões, a pele escrotal aparece como uma linha hiperecótica na imagem de ultrassom (Beck, 1990; Gouletsou *et al.*, 2003; Keßler, 2010). A camada subjacente da túnica dartos, tecido conjuntivo e fáscia tem ecogenicidade comparativamente menor. A túnica albugínea é vista como uma linha hiperecótica que circunda o testículo. Se não houver líquido na cápsula testicular, as túnicas vaginal e albugínea não podem ser diferenciadas. A representação do septo escrotal difere dependendo do trajeto do feixe. No corte longitudinal, o septo apresenta níveis moderados a elevados de ecogenicidade, enquanto no corte transversal apresenta-se anecóico (Beck, 1990; Cartee *et al.*, 1986; Keßler, 2010). O parênquima testicular parece ser moderadamente ecodenso, tons de cinza, nem hiperecótico nem hipoecótico, e o padrão como homogêneo a levemente marmorizado (Brass, 1987; Clark *et al.*, 2003; Eilts *et al.*, 1988). O grau de tecido conjuntivo armazenado no parênquima do testículo do suíno apresenta apenas uma pequena quantidade de depósitos fibrosos pontilhados. O mediastino testicular está localizado centralmente e percorre longitudinalmente o testículo como uma ampla faixa hiperecótica (Beck, 1990; Keßler, 2010). No meio do mediastino testicular, a *rete testis* pode ser vista como uma linha fina anecóica. A *rete testis* no trajeto transversal do feixe aparece como uma estrutura escura em forma de ponto cercada por uma zona hiperecótica (Keßler, 2010). O testículo normal apresenta aspecto ultrassonográfico característico, decorrente da composição específica do tecido (Figura 12).

Figura 12. Seção transversal ultrassonográfica do testículo esquerdo de um varrão (sonda linear, frequência 12 MHz, profundidade de penetração 4 cm). Representação das seguintes estruturas anatômicas: pele escrotal (a), túnica albugínea lateral (b), parênquima testicular (c), mediastino testicular (d), túnica albugínea medial (e), seção de introdução (f). Adaptado de Beyer, S. (2020).



Os testículos e epidídimos são avaliados com o transdutor linear, sendo 5–13 MHz ideal para varrões (Clark *et al.*, 2003; Jedraszcyk & Zielinski, 2005; Schulze *et al.*, 2020). Todas as partes do epidídimo têm ecotextura homogênea (Jedraszcyk & Zielinski 2005; Kauffold *et al.*,

2011). No entanto, enquanto a cabeça e o corpo apresentam ecotextura fina, a cauda apresentava ecotextura marmorizada, talvez porque o ducto epididimal esteja dilatado na região da cauda em comparação com as partes mais proximais (França *et al.*, 2005, Kauffold *et al.*, 2011). A ecotextura do epidídimo antes e após a ejaculação foi semelhante no estudo de Kauffold *et al.*, (2011), sugerindo que a ecotextura esteja relacionada à histoarquitetura e não à parte epididimal do ejaculado. Ainda nesse estudo, verificou-se que não existe correlação entre a ecogenicidade do corpo e da cauda do epidídimo com volume, motilidade (total e progressiva), concentração e morfologia espermática. No entanto, a escala de cinza obtida na cabeça do epidídimo antes da coleta de sêmen foi positivamente correlacionada ao volume e total de células no ejaculado. Os autores observaram ainda que a ecogenicidade após a coleta de sêmen também foi correlacionada positivamente com o volume do ejaculado e negativamente com a concentração espermática, mas sem correlação da ecogenicidade com os demais parâmetros (Kauffold *et al.*, 2011).

As glândulas sexuais acessórias são visualizadas por via transretal, usando o modo-B, transdutor linear e frequência de 5 MHz (Clark & Althouse, 2002). O exame de palpação manual através do reto não é realizado em suínos devido à dificuldade anatômica de acesso. Clark & Althouse (2002), avaliaram as glândulas vesiculares, a próstata e as glândulas bulbouretrais, tanto em varrões vivos quanto em peças provenientes de frigorífico.

As glândulas bulbouretrais apresentam formato oval típico, circundadas por uma linha hiperecogênica, com parênquima homogêneo e lúmen central anecoico. Ao examinar os varrões após a ejaculação, os autores observaram que o lúmen central ficou reduzido (Clark & Althouse, 2002). A próstata apresentou uma aparência ecogênica uniforme (Clark & Althouse, 2002). Já as glândulas vesiculares possuem paredes finas, parênquima com áreas ecolucentes (predomínio de cores escuras) e pequenas áreas anecóicas que se convergem para um canal central (Clark & Althouse, 2002).

Assim, a ultrassonografia demonstrou ser um método eficaz e não invasivo para a avaliação funcional dos testículos em suínos (Schulze *et al.*, 2020). Além disso, pode ser aplicada durante o desenvolvimento puberal, pois estudos indicam que os resultados obtidos em animais de 92 dias de idade se correlacionam com aqueles em fases mais avançadas (Ford & Wise, 2011).

Sikarwar *et al.* (2019) avaliaram testículos de suínos Large White Yorkshire com US modo B e identificaram o parênquima testicular homogêneo com um padrão de eco médio grosseiro. O mediastino testicular no plano longitudinal, apareceu como uma linha hiperecoica localizada centralmente, estendendo-se até três quartos do comprimento testicular. Já no plano

transverso, apareceu como uma área ecogênica circular na porção média do parênquima testicular.

### **3.11. Aspectos associados a ecogenicidade testicular**

#### **3.11.1. Evolução da ecogenicidade ao longo da idade**

Tem sido observado um aumento na ecogenicidade testicular com o avançar da idade, desde o nascimento até a puberdade, em humanos (Hamm & Fobbe, 1995), touros (Arteaga *et al.*, 2005; Brito *et al.*, 2012) e cordeiros (Giffin *et al.*, 2014). Após a puberdade, são observadas alterações mínimas na ecogenicidade testicular em humanos e touros (Brito *et al.*, 2012; Hamm & Fobbe, 1995). Especula-se que o aumento da ecogenicidade até a puberdade esteja relacionado à proliferação de células de Sertoli e células germinativas (Evans *et al.*, 1996; Giffin, *et al.*, 2014). Em relação a diminuição da ecogenicidade entre a puberdade e a maturidade sexual, especula-se que ocorre devido ao aumento do tamanho dos túbulos seminíferos (Gabor *et al.*, 1998).

Em varrões, a ultrassonografia testicular já foi utilizada para estimar a puberdade entre três e sete meses de idade. Foi demonstrada uma correlação positiva entre o diâmetro testicular, determinado pela ultrassonografia, com o diâmetro dos túbulos seminíferos, avaliado por meio de análises histomorfométricas, em animais de quatro e cinco meses de idade (Ford & Wise, 2011).

No estudo de Schulze *et al.* (2020), utilizando machos Pietrain, foi demonstrado um aumento de 7,3 vezes no volume testicular entre animais com 100 e 170 dias de idade. Assim como os parâmetros de GSA analisados demonstraram um aumento nos tons de cinza mais elevados (MAX GV) nas mesmas idades (Schulze *et al.*, 2020). Em equinos, os parâmetros de GSA aumentaram no primeiro ano de vida, paralelamente ao desenvolvimento dos túbulos seminíferos (Pozor *et al.*, 2017). O aumento da ecogenicidade durante a puberdade está intimamente relacionado ao início da espermatogênese.

Chandolia *et al.* (1997a) analisaram os testículos de bezerros por meio de ultrassonografia a cada duas semanas de vida e observaram que os valores numéricos de pixel aumentaram do nascimento até as 8 semanas de idade, provavelmente em decorrência da proliferação celular. Entre 8 e 20 semanas, esses valores atingiram um platô. A partir das 20 semanas, houve um novo aumento, atribuído ao início da divisão das espermatogônias e à formação dos tipos celulares mais avançados da espermatogênese.

Por outro lado, em carneiros, os valores numéricos de pixels testiculares mostraram um padrão mais complexo ao longo do desenvolvimento sexual (Chandolia *et al.* 1997b). Observou-se uma redução inicial nos valores numéricos de pixel entre o nascimento e as 8 semanas de idade, seguida por um aumento progressivo entre 8 e 22 semanas, o qual pode estar associado à formação gradual dos tipos celulares mais maduros da espermatogênese (Crim & Geschwin, 1972; Lafortune *et al.*, 1984; Monet-Kuntz *et al.*, 1984). Após 22 semanas, com a espermatogênese já estabelecida, os valores atingiram um platô (Chandolia *et al.* 1997b).

Aravindakshan *et al.* (2000) concluíram que os parâmetros endócrinos e as características ultrassonográficas do sistema reprodutivo podem variar entre bezerros machos de maturação precoce e tardia. Além disso, avaliaram se algum desses parâmetros poderia ser utilizado para prever a idade da puberdade em bezerros.

Pozor *et al.* (2017) observaram um aumento nos valores médios de cinza e em seu desvio padrão no parênquima testicular de garanhões ao longo do primeiro ano de vida, acompanhando o desenvolvimento dos túbulos seminíferos. A partir do segundo ano de vida, ambos os parâmetros permaneceram estáveis. A puberdade em garanhões ocorre entre 12 e 24 meses de idade, com grandes variações individuais e influências relacionadas à raça (Aurich *et al.*, 2008). Esses achados indicam que o período da puberdade é marcado por um aumento na ecogenicidade do tecido testicular, acompanhado de alterações nos parâmetros de nível de cinza.

De modo geral, os trabalhos previamente mencionados desenvolvidos em diferentes espécies, consideraram a análise ultrassonográfica e de parâmetros de GSA como um método eficaz e não invasivo para determinar a maturidade do parênquima testicular durante o desenvolvimento pós-natal.

Em relação à idade, foi descrito que a ecogenicidade aumenta à medida que o animal amadurece sexualmente (Aravindakshan *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2012) e então não muda significativamente além da puberdade (Brito *et al.*, 2012; Hamm & Fobbe, 1995). Uma das razões para a menor ecogenicidade das imagens testiculares em animais pré-púberes é a presença de cortes transversais de túbulos seminíferos sem células germinativas ou com células imaturas (Evans *et al.*, 1996).

Sergio *et al.* (2022) não identificaram diferenças na ecotextura testicular de touros em função da idade em animais avaliados acima de 15 meses. Contudo, observaram diferenças na ecogenicidade entre as raças, embora o número de animais em algumas delas tenha sido limitado. No mesmo estudo, os parâmetros ultrassonográficos apresentaram diferentes níveis de correlação com a estrutura e a funcionalidade do parênquima testicular, especialmente em

relação a alterações na morfologia espermática. A densidade de áreas hipoeoicas identificadas no ultrassom foi o único parâmetro com valor preditivo para a qualidade do sêmen. Apesar de demonstrarem associações variadas entre os parâmetros ultrassonográficos e a qualidade seminal, os autores destacam a necessidade de estudos adicionais para confirmar a utilidade dessa ferramenta na predição da fertilidade potencial de reprodutores.

### **3.11.2. Relação entre ecogenicidade e produção espermática**

Em bovinos, os tons médios de cinza foram associados com a qualidade seminal, especialmente nas semanas seguintes às avaliações ultrassonográficas (Arteaga *et al.*, 2005; Brito *et al.*, 2012). Ahmadi *et al.* (2012) também observaram que a ecotextura testicular se correlaciona com a proporção de espermatozoides com defeitos morfológicos e com a motilidade progressiva 60 dias após a ultrassonografia. Estudos realizados em cães indicam achados semelhantes. England *et al.* (2017) relataram que uma maior ecogenicidade testicular média esteve associada ao aumento da motilidade progressiva média no monitoramento subsequente, um padrão semelhante ao observado em bovinos (Arteaga *et al.*, 2005).

Além disso, Moxon *et al.* (2015) sugeriram que tanto o aumento quanto a diminuição da ecogenicidade testicular podem refletir alterações ultraestruturais nos testículos, estando associadas a mudanças na morfologia espermática. Esses autores também demonstraram que testículos com menor heterogeneidade ecotextural estavam associados a uma redução na produção total de espermatozoides em cães. Adicionalmente, uma relação positiva entre o volume testicular e a contagem total de espermatozoides foi descrita por Huang & Johnson, (1996).

Em suínos, Muñoz (2017) encontrou uma correlação positiva e altamente significativa entre o nível médio de cinza e a percentagem de anomalias espermáticas em machos jovens. Além disso, Schulze *et al.*, (2020) compararam imagens ultrassonográficas de varrões, aos 100 e 170 dias de idade, com a qualidade do sêmen dos mesmos animais, aos 230 dias de idade e identificaram que os machos com maiores valores nos parâmetros de GSA (DEVOFTHEMEAN e MEANGRAD no *on-test*; MEANGV e MINGV no *off-test* tiveram maior chance de serem não produtivos, ou seja, menor qualidade de sêmen.

Os avanços tecnológicos nos equipamentos de ultrassom e nas técnicas de análise objetiva das imagens possibilitaram uma avaliação mais eficiente do sistema reprodutivo masculino. A combinação da ultrassonografia testicular com a GSA tem se mostrado um método seguro para a detecção precoce da maturidade sexual, de patologias testiculares e da funcionalidade testicular e epididimária. O conhecimento desses parâmetros reprodutivos

permite um manejo mais preciso dos varrões em granjas e CCPS, resultando em maior eficiência produtiva e retorno econômico.

### 3.12. Referências

**ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL.** Relatório anual 2025. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-relatorio-anual/>. Acesso em: 29 abril 2025.

**AGRINESS.** Relatório anual do desempenho da produção de suínos. 2024. Disponível em: <https://melhores.agriness.com/relatorio/>. Acesso em: 31 mar. 2025.

**AGUIRRE, V.; ORIHUELA, A.; VÁZQUEZ, R.** Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Tropical Animal Health and Production*, v. 39, p. 271–277, 2007.

**AHMADI, B.; LAU, C. P. S.; GIFFIN, J.; SANTOS, N.; HAHNEL, A.; RAESIDE, J.; BARTLEWSKI, P.** 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, n. 2, p. 186–193, 2012.

**AHMADI, B.; MIRSHAHI, A.; GIFFIN, J.; OLIVEIRA, M. E. F.; GAO, L.; HAHNEL, A.; BARTLEWSKI, P. M.** Preliminary assessment of the quantitative relationships between testicular tissue composition and ultrasonographic image attributes in the ram. *The Veterinary Journal*, v. 198, n. 1, p. 282–285, 2013.

**ALM, K.; PELTONIEMI, O. A.; KOSKINEN, E.; ANDERSSON, M.** Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 210–213, 2006.

**ALMEIDA, F. R. C. L.; DIAS, A. L. N. ALVARENGA.** Pregnancy in pigs: the journey of early life. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 78, 106656, 2022.

**ARAVINDAKSHAN, J. P.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; PIERSON, R. A.; RAWLINGS, N. C.** Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology*, v. 54, n. 3, p. 339–354, 2000.

**ARSENAKIS, I.; APPELTANT, R.; SARRAZIN, S.; RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.** Relationship between semen quality and meat quality traits in Belgian Piétrain boars. *Livestock Science*, v. 205, p. 36–42, 2017.

**ARTEAGA, A. A.; BARTH, A. D.; BRITO, L. F.** Relationship between semen quality and pixel intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology*, v. 64, n. 2, p. 408–415, 2005.

**AULER, P. A.; MOREIRA, G. H. F. A.; HOGG, C. O.; ASHWORTH, C. J.; BORTOLOZZO, F. P.; CHIARINI-GARCIA, H.; ALMEIDA, F. R. C. L.** Testicular parameters and spermatogenesis in different birthweight boars. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 29, n. 9, p. 1720–1728, 2017.

**AURICH, H.; BOLLWEIN, S.; BRÜCKNER, D.; BURGER, F.** Reproduktionsmedizin beim Pferd: Gynäkologie–Andrologie–Geburtshilfe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2008.

**AVELAR, G. F.** Análises morfológica e funcional das células somáticas do testículo de suínos durante o desenvolvimento pós-natal. 2010. 122 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

- AVELAR, G. F.; OLIVEIRA, C. F.; SOARES, J. M.; SILVA, I. J.; DOBRINSKI, I.; HESS, R. A.; FRANÇA, L. R.** Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: a non-random event. *Theriogenology*, v. 74, n. 1, p. 11–23, 2010.
- AZHARI, H.** *Basics of biomedical ultrasound for engineers*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.
- BACHA JR, W. J.; BACHA, L. M.** *Color atlas of veterinary histology*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012.
- BADER, W.; BÖHMER, S.; OTTO, W. R.; DEGENHARDT, F.; SCHNEIDER, J.** Texturanalyse: Ein neues Verfahren zur Beurteilung sonographisch darstellbarer Herdbefunde der Mamma. *Bildgebung*, v. 61, p. 284–290, 1994.
- BAKOEV, S.; GETMANTSEVA, L.; KOLOSOVA, M.; KOSTYUNINA, O.; CHARTIER, D. R.; TATARINOVA, T. V.** PigLeg: prediction of swine phenotype using machine learning. *PeerJ*, v. 8, e8764, 2020.
- BANASZEWSKA, D.; KONDRACKI, S.** An assessment of the breeding maturity of insemination boars based on ejaculate quality changes. *Folia Biologica (Kraków)*, v. 60, n. 3–4, p. 151–162, 2012.
- BANASZEWSKA, D.; BIESIADA-DRZAZGA, B.; ANDRASZEK, K.** Frequency of cytoplasmic droplets depends on the breed and age of insemination boars. *Folia Biologica (Kraków)*, v. 63, n. 1, p. 9–18, 2015.
- BANE, A.; EINARSSON, S.; LARSSON, K.** Variationer i galtars spermabild och fruktsamhet (Variations in the semen picture and fertility in boars). *Proc. Ann. Vet. Meet*, Stockholm, p. 147–159, 1977.
- BARQUERO, V.; ROLDAN, E. R.; SOLER, C.; VARGAS-LEITÓN, B.; SEVILLA, F.; CAMACHO, M.; VALVERDE, A.** Relationship between fertility traits and kinematics in clusters of boar ejaculates. *Biology*, v. 10, n. 7, 595, 2021.
- BARTH, A. D.; ALISIO, L.; AVILÉS, M.; ARTEAGA, A. A.; CAMPBELL, J. R.; HENDRICK, S. H.** Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. *Animal Reproduction Science*, v. 106, n. 3–4, p. 274–288, 2008a.
- BARTH, A. D.; BRITO, L. F. C.; KASTELIC, J. P.** The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology*, v. 70, p. 485–494, 2008b.
- BECK, G.** Sonographische Untersuchungen an Skrotum und akzessorischen Geschlechtsdrüsen von Wiederkäuern, Ebern, Hengsten und Rüden. 1990. Dissertação (Doutorado) – Ludwig-Maximilians-Universität, Tierärztliche Fakultät, München.
- BECKER, M.; HESSE, V.** Minipuberty: why does it happen? *Hormone Research in Paediatrics*, v. 93, p. 76–84, 2020.
- BERGER, T.; GUERRERO, V.; BOELDT, R.; LEGACKI, E.; ROBERTS, M.; CONLEY, A. J.** Development of porcine accessory sex glands. *Animals*, v. 14, n. 3, p. 462, 2024.
- BEYER, S.** Prognose der Zuchttauglichkeit von Piétrain-Ebern nach Anwendung einer testikulären Sonographie und nachfolgender Graustufenanalyse zwischen dem 100. und 170. Lebenstag. Berlin: Mensch und Buch Verlag, 2020.
- BIERMANN, A. D. M.; YIN, T.; VON BORSTEL, U. K.; RÜBESAM, K.; KUHN, B.; KÖNIG, S.** From phenotyping towards breeding strategies: using in vivo indicator traits and genetic markers to improve meat quality in an endangered pig breed. *Animal*, v. 9, n. 6, p. 919–927, 2015.
- BOE-HANSEN, G. B.; SATAKE, N.** An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology*, v. 137, p. 93–103, 2019.

- BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.; YESTE, M.** *Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends*. Berlin: Springer, 2013. 632 p.
- BORG, K. E.; LUNSTRA, D. D.; CHRISTENSON, R. K.** Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature Duroc, Meishan, Fengjing, and Minzhu boars. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 3, p. 515–521, 1993.
- BORTOLOZZO, F. P.; ZANIN, G. P.; CHRIST, T. S.; RECH, R. D.; DA ROSA ULGUIM, R.; MELLAGI, A. P. G.** Artificial insemination and optimization of the use of seminal doses in swine. *Animal Reproduction Science*, v. 107501, 2024.
- BRACCO, C.; GLORIA, A.; CONTRI, A.** Ultrasound-based technologies for the evaluation of testicles in the dog: keystones and breakthroughs. *Veterinary Sciences*, v. 10, n. 12, p. 683, 2023.
- BRASS, K. E.** Die Sonographie in der andrologischen Untersuchung bei verschiedenen Haussäugetierarten. 1987. Dissertação (Doutorado) – Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; WILDE, R. E.; KASTELIC, J. P.** 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. 69–76, 2012.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M.** Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. *Veterinary Quarterly*, v. 32, n. 3–4, p. 151–157, 2012c.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M.** Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of Animal Science*, v. 90, p. 779–789, 2012b.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M.** The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center: a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. *Theriogenology*, v. 77, p. 1466–1479, 2012a.
- CARTEE, R. E.** The physics of ultrasound. In: **CARTEE, R. E.; SELCER, B. A.; HUDSON, J. A.; FINN-BODNER, S.; PAMELA, J.; KEN, M.** *Practical veterinary ultrasound*. New York: Lea and Febiger Books, 1995. cap. 1, p. 1–9.
- CARTEE, R. E.; POWE, T. A.; GRAY, B. W.; HUDSON, R. S.; KUHLLERS, D. L.** Ultrasonographic evaluation of normal boar testicles. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, p. 2543–2548, 1986.
- CARVAJAL-SERNA, M.; MIGUEL-JIMÉNEZ, S.; PÉREZ-PE, R.; CASAO, A.** Testicular ultrasound analysis as a predictive tool of ram sperm quality. *Biology*, v. 11, n. 2, p. 261, 2022.
- CARVALHO, C. F.** Técnicas de varredura da cavidade abdominal. In: *Ultrassonografia em pequenos animais*. São Paulo: Roca, 2004. cap. 2, p. 16–22.
- CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL.** *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- CHANDOLIA, R. K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE, B. C.; PIERSON, R.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C.** Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*, v. 48, n. 1, p. 119–132, 1997a.
- CHANDOLIA, R. K.; BARTLEWSKI, P. M.; OMEKE, B. C.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C.; PIERSON, R. A.** Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. *Theriogenology*, v. 48, n. 1, p. 99–117, 1997b.

- CHEN, J.; MINABE, S.; MUNETOMO, A.; MAGATA, F.; SATO, M.; NAKAMURA, S.; HIRABAYASHI, M.; ISHIHARA, Y.; YAMAZAKI, T.; UENOYAMA, Y.; TSUKAMURA, H.; MATSUDA, F.** Kiss1-dependent and independent release of luteinizing hormone and testosterone in perinatal male rats. *Endocrine Journal*, v. 69, p. 797–807, 2022.
- 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.
- CLARK, S. G.; ALTHOUSE, G. C.** B-mode ultrasonographic examination of the accessory sex glands of boars. *Theriogenology*, v. 57, n. 8, p. 2003–2013, 2002.
- COLENBRANDER, B.; DE JONG, F. H.; WENSING, C. J.** Changes in serum testosterone concentrations in the male pig during development. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 53, p. 377–380, 1978.
- COLENBRANDER, B.; KRUIP, T. A.; DIELEMAN, S. J.; WENSING, C. J.** Changes in serum LH concentrations during normal and abnormal sexual development in the pig. *Biology of Reproduction*, v. 17, p. 506–513, 1977.
- CRIM, L. W.; GESCHWIND, I. I.** Testosterone concentration in spermatic vein plasma of the developing ram. *Biology of Reproduction*, v. 7, p. 42–46, 1972.
- CURTIS, S. K.; AMANN, R. P.** Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Animal Science*, v. 53, p. 1645–1657, 1981.
- DE GENDT, K.; SWINNEN, J. V.; SAUNDERS, P. T.; SCHOONJANS, L.; DEWERCHIN, M.; DEVOS, A.; VERHOEVEN, G.** A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 1327–1332, 2004.
- DEAVER, D. R.; BRYAN, K. A.** Effects of exogenous somatotropin (ST) on gonadal function in ruminants and swine. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 17, p. 287–297, 1999.
- D'FRANCISCO, F.; LAPUENTE, C.; MERLO, M. L.; BARBEITO, C.; GOBELLO, C.** Feline testicular ultrasonogram differentiates pre vs. postpubertal and normal vs. disrupted spermatogenesis. *Theriogenology*, v. 157, p. 503–507, 2020.
- DÍEZ, B. N.** Principios básicos de la ecografía. *Clinica Veterinaria de Pequeños Animales*, v. 12, n. 3, 1992.
- DING, H.; LUO, Y.; LIU, M.; HUANG, J.; XU, D.** Histological and transcriptome analyses of testes from Duroc and Meishan boars. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 20758, 2016.
- DYCK, M. K.; FOXCROFT, G. R.; NOVAK, S.; RUIZ-SANCHEZ, A.; PATTERSON, J.; DIXON, W. T.** Biological markers of boar fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, p. 55–58, 2011.
- EILTS, B. E.; PECHMANN, R. D.** B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology*, v. 30, p. 1169–1175, 1988.
- ENGLAND, G. C.; BRIGHT, L.; PRITCHARD, B.; BOWEN, I. M.; DE SOUZA, M. B.; SILVA, L. D. M.; MOXON, R.** Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, p. 202–207, 2017.
- EVANS, A. C. O.; PIERSON, R. A.; GARCIA, A.; MCDUGALL, L. M.; HRUDKA, F.; RAWLINGS, N. C.** Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology*, v. 46, n. 2, p. 345–357, 1996.

- FAZELI, A.; HAGE, W. J.; CHENG, F. P.; VOORHOUT, W. F.; MARKS, A.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B.** Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 430–438, 1997.
- FEITSMA, H.** Artificial insemination in pigs: research and developments in The Netherlands, a review. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, p. 61–71, 2009.
- FERGUSON-SMITH, M.** The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of *DMRT1*. *Sexual Development*, v. 1, n. 1, p. 2–11, 2006.
- FERREIRA, F. M.; WENTZ, I.; SCHEID, I. R.; AFONSO, S. B.; GUIDONI, A. L.; BORTOLOZZO, F. P.** Comportamento de monta e características seminais de suínos jovens Landrace e Large White. *Ciência Rural*, v. 35, p. 131–137, 2005.
- FLOWERS, W. L.** Factors affecting the efficient production of boar sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, p. 25–30, 2015.
- FLOWERS, W. L.** Factors affecting the production of quality ejaculates from boars. *Animal Reproduction Science*, v. 246, 106840, 2022.
- FLOWERS, W. L.** Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, n. 52, p. 67–78, 1997.
- FLOWERS, W. L.** Triennial Reproduction Symposium: sperm characteristics that limit success of fertilization. *Journal of Animal Science*, v. 91, n. 7, p. 3022–3029, 2013.
- FLOWERS, W. L.** Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. *Theriogenology*, v. 70, n. 8, p. 1297–1303, 2008.
- FORD, J. J.** Serum estrogen concentrations during postnatal development in male pigs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 174, p. 160–164, 1983.
- FORD, J. J.; WISE, T. H.** Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *Journal of Animal Science*, v. 87, n. 8, p. 2536–2543, 2009.
- FORD, J. J.; WISE, T. H.** Assessment of pubertal development of boars derived from ultrasonographic determination of testicular diameter. *Theriogenology*, v. 75, n. 2, p. 241–247, 2011.
- FRANÇA, L. R.; SILVA, V. A. Jr.; CHIARINI-GARCIA, H.; et al.** Cell proliferation and hormonal changes during post development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 1629–1636, 2000.
- FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. R. C. L.** Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v. 63, p. 300–318, 2005.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D.** The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Europe España: Churchill Communications, 1998. p. 197–219.
- GABOR, G.; SASSER, R. G.; KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H.** Morphologic, endocrine and thermographic measurements of testicles in comparison with semen characteristics in mature Holstein–Friesian breeding bulls. *Animal Reproduction*, 1998.
- GAROLLA, A.; GRANDE, G.; PALEGO, P.; CANOSSA, A.; CARETTA, N.; DI NISIO, A.; CORONA, G.; FORESTA, C.** Central role of ultrasound in the evaluation of testicular function and genital tract obstruction in infertile males. *Andrology*, v. 9, p. 1490–1498, 2021.

- GÄRTNER, T.; ZACHARIAS, M.; JENDERKA, K. V.; HEYNEMANN, H.; COBET, U.** Geräteunabhängige Ultraschall-Gewebecharakterisierung von Hoden und Prostata. *Der Radiologe*, v. 38, p. 424–433, 1998.
- GEBEL, M. J.** Neue Modifikationen und Verfahren der Sonographie und ihre praktische Bedeutung. *Der Internist*, v. 41, p. 3–9, 2000.
- GERWING, M.** Princípios físicos e técnicos da ultrassonografia. In: **FRITSCH, R.; GERWING, M.** (Ed.). *Ultrassonografia para cães e gatos*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1993. p. 2–27.
- GIFFIN, J. L.; FRANKS, S. E.; RODRIGUEZ-SOSA, J. R.; HAHNEL, A.; BARTLEWSKI, P. M.** A study of morphological and haemodynamic determinants of testicular echotexture characteristics in the ram. *Experimental Biology and Medicine*, v. 234, n. 7, p. 794–801, 2009.
- GIFFIN, J. L.; BARTLEWSKI, P. M.; HAHNEL, A. C.** Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes. *Experimental Biology and Medicine*, v. 239, 2014.
- GIFFIN, JENNIFER L.** *Determinants of testicular echotexture in the sexually immature ram lamb*. 2014. Tese (Doutorado) – University of Guelph, Guelph.
- GILBERT, S. F.** *Biologia do desenvolvimento*. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003. 994 p.
- GINTHER, O. J.** How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology*, v. 81, n. 1, p. 112–125, 2014.
- GINTHER, O. J.** *Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare*. Madison: Equiservices Publishing, 1986. 378 p.
- GINTHER, O. J.** *Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals*. Book 1. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices Publishing, 1995.
- GLADISCH, R.** Einführung in die sonographische Diagnostik. In: **GLADISCH, R.** (Hrsg.). *Praxis der abdominellen Ultraschalldiagnostik*. 2. Aufl. New York und Stuttgart: Schattauer Verlag, 1992. p. 2–21.
- GONZÁLEZ-PEÑA, D.; KNOX, R. V.; MACNEIL, M. D.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.** Genetic gain and economic values of selection strategies including semen traits in three-and four-way crossbreeding systems for swine production. *Journal of Animal Science*, v. 93, n. 3, p. 879–891, 2015.
- GOULETSOU, P. G.; AMIRIDIS, G. S.; CRIPPS, P. J.; LAINAS, T.; DELIGIANNIS, K.; SARATSIS, P.; FTHENAKIS, G. C.** Ultrasonographic appearance of clinically healthy testicles and epididymides of rams. *Theriogenology*, v. 59, p. 1959–1972, 2003.
- GREENFIELD, A.** Understanding sex determination in the mouse: genetics, epigenetics and the story of mutual antagonisms. *Journal of Genetics*, v. 94, p. 585–590, 2015.
- GRIFFIN, J. K.; SEAL, M. C.; FLOWERS, W. L.** Effect of neonatal environment on adult reproductive function in boars. *Journal of Animal Science*, v. 84 (Suppl. 1), p. 205–207, 2006.
- GRISWOLD, M. D.** The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 9, n. 4, p. 411–416, 1998.
- HACKER, R. R.; DU, Z.; D'ARCY, C. J.** Influence of penning type and feeding levels on sexual behavior and feet and leg soundness in boars. *Journal of Animal Science*, v. 55, p. 1483–1489, 1994.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B.** *Reprodução animal*. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.
- HAIDER, S. G.** Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology*, v. 233, p. 181–241, 2004.

- HAMM, B.; FOBBE, F.** Maturation of the testis: Ultrasound evaluation. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v. 21, p. 143–147, 1995.
- HARDER, R. R.; LUNSTRA, D. D.; JOHNSON, R. K.** Growth of testes and testicular morphology after eight generations of selection for increased predicted weight of testes at 150 days of age in boars. *Journal of Animal Science*, v. 73, n. 8, p. 2186–2192, 1995.
- HARLEY, V. R.; LAVERY, R.; CLAIRE, B.** SOX9 and the testis: insights into the pathophysiology of testicular dysgenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 211, p. 55–62, 2003.
- HENNEBERG, S.; KLEVE-FELD, M.; SCHRÖTER, F.; JUNG, M.; SCHULZE, M.** Lifetime and removal reasons for Pietrain boars in European AI centers: a retrospective analysis. *Journal of Animal Science*, v. 101, skac408, 2023.
- HENRY, M.; ECHEVERRI, A. M. L.** *Andrologia veterinária básica: curso de andrologia veterinária básica*. Belo Horizonte: CAED-UFGM, 2013. 194 p.
- HENSEL, B.; HENNEBERG, S.; KLEVE-FELD, M.; JUNG, M.; SCHULZE, M.** Selection and direct biomarkers of reproductive capacity of breeding boars. *Animal Reproduction Science*, 107490, 2024.
- HERMES, R.** *Sonographie der Trächtigkeit beim Europäischen Reh (Capreolus capreolus) und Quantifizierung endometrialer Veränderungen während der Diapause mittels computergestützter Graustufenanalyse*. 1998. Dissertação (Doutorado) – Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin.
- HÖHNE, K.** *Ultrasonographische Untersuchung von Hoden und Prostata des Hundes unter besonderer Berücksichtigung der Graustufenanalyse*. 2002. Dissertação (Doutorado) – Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- HORITA, S. A.** Aprendendo sobre a ultrassonografia no sistema locomotor - a física do ultrassom. *Médico Fisiatra*, 2021. Disponível em: <https://www.medicofisiatra.com.br/post/aprendendo-sobre-a-ultrassonografia-no-sistema-locomotor-a-f%C3%ADsica-do-ultrassom>. Acesso em: 2 mar. 2025.
- HUANG, S.; YE, L.; CHEN, H.** Sex determination and maintenance: the role of *DMRT1* and *FOXL2*. *Asian Journal of Andrology*, v. 19, n. 6, p. 619–624, 2017.
- HUANG, Y.; JOHNSON, R. K.** Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 750–760, 1996.
- HUHTANIEMI, I.; PELLINIEMI, L. J.** Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 201, p. 125–140, 1992.
- HYLDIG, S. M.; OSTRUP, O.; VEJLSTED, M.; THOMSEN, P. D.** Changes of DNA methylation level and spatial arrangement of primordial germ cells in embryonic day 15 to embryonic day 28 pig embryos. *Biology of Reproduction*, v. 84, n. 6, p. 1087–1093, 2011.
- HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M.** *Embriologia veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012. 472 p.
- JACYNO, E.; KAWECKA, M.; PIETRUSZKA, A.; SOSNOWSKA, A.** Phenotypic correlations of testes size with semen traits and the productive traits of young boars. *Reproduction in Domestic Animals*, 2015.
- JEDRASZCZYK, J.; ZIELINSKI, A.** Ultrasonography in boar's reproductive organ examination. *Medycyna Weterynaryjna*, v. 61, p. 818–821, 2005.

- JEGOU, B.; LAWS, A. O.; DE KRETSEER, D. M.** Changes in testicular function in the rat testis to heat, further evidence for interaction of germ cells, Sertoli cells and Leydig cells. *International Journal of Andrology*, v. 7, p. 244–257, 1984.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C.** Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 143–172, 2000.
- JORGE, A. S.; RECCHIA, K.; GLÓRIA, M. H.; DE SOUZA, A. F.; PESSÔA, L. V. D. F.; FANTINATO NETO, R.; MARTINS, D. D.; ANDRADE, A. F. C.; MARTINS, S. M. M. K.; BRESSAN, F. F.; PIERI, N. C. G.** Porcine germ cells phenotype during embryonic and adult development. *Animals*, v. 13, n. 15, p. 2520, 2023.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.** *Histologia básica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KAUFFOLD, J.; KESSLER, M.; RICHTER, A.; BEYNON, N.; WEHREND, A.** B-mode ultrasound and grey-scale analysis of the epididymis in boars, and the relationship to semen parameters. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 1, p. 108–113, 2011.
- KEALY, J. K.; MCALLISTER, H.; GRAHAM, P. J.** *Radiografia e ultrassonografia do cão e gato*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 17.
- KENNEDY, B. W.; WILKINS, J. N.** Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 64, p. 833–843, 1984.
- KENT, J.; WHEATLEY, S. C.; ANDREWS, J. E.; SINCLAIR, A. H.; KOOPMAN, P.** A male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination. *Development*, v. 122, p. 2813–2822, 1996.
- KEBLER, M. R. H.** *Sonographische Untersuchungen des Epididymis beim Eber*. 2010. Tese (Doutorado) – Universitätsbibliothek Giessen, Giessen.
- KIEFER, J.; KIEFER, I.** *Radiologia Geral*. Berlim e Viena: Blackwell Wissenschaftsverlag, 2003. p. 11–13.
- KLEIN, B. G.** *Cunningham tratado de fisiologia veterinária*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- KLEVE-FELD, M.; ORLANDO, W.; SCHULZE, M.** Modern feeding strategies for breeding boars. *Animal Reproduction Science*, 107497, 2024.
- KNECHT, D.; JANKOWSKA-MAKOSA, A.; DUZIŃSKI, K.** Boar genotype as a factor shaping age-related changes in semen parameters and reproduction longevity simulations. *Theriogenology*, v. 98, p. 50–56, 2017.
- KNOX, R.** The physiology of sperm production and the reproductive management of boars for fertility. *Proceedings of Boar Stud Managers Conference*. St. Louis, USA, 2016.
- KOBAYASHI, T.; ZHANG, H.; TANG, W. W. C. C.; IRIE, N.; WITHEY, S.; KLISCH, D.; SYBIRNA, A.; DIETMANN, S.; CONTRERAS, D. A.; WEBB, R.; et al.** Principles of early human development and germ cell program from conserved model systems. *Nature*, v. 546, p. 416–420, 2017.
- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G.** *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- KOPP, C.; SIRONEN, A.; IJÄS, R.; TAPONEN, J.; VILKKI, J.; SUKURA, A.; ANDERSSON, M.** Infertile boars with knobbed and immotile short-tail sperm defects in the Finnish Yorkshire breed. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, n. 6, p. 690–695, 2008.
- KRAMER, M.** Ultrassom. In: **KRAMER, M.** (Org.). *Compêndio de Cirurgia Veterinária Geral*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft GmbH & Co. KG, 2004. p. 100–109.
- KUCHLING, H.** Wellenoptik. In: **KUCHLING, H.** (Hrsg.). *Physik*. Leipzig: VEB Buchverlag Leipzig, 1972. 9. Aufl., p. 231–238.

- KUMMER, A. B. H. P.; GAGGINI, T. S.; BERNARDI, M. L.; MCMANUS, C.; GONÇALES, E. M.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P.** Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analysed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, p. 747–754, 2013.
- LAFORTUNE, E.; BLANC, M. R.; PELLETIER, J.; PERREAU, C.; TERQUI, M.; HOCHEREAU-DE RIEVIERS, M. T.** Variation in the plasma levels of gonadotrophin and testosterone and in Leydig and Sertoli cell populations between birth and adulthood in Romanov lambs born in spring or autumn. *Reproduction Nutrition Development*, v. 24, p. 937–946, 1984.
- LARA, N. L.; COSTA, G. M.; AVELAR, G. F.; LACERDA, S. M. S. N. N.; HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. D.** Testis physiology – overview and histology. p. 105–116, 2018.
- LAVON, U.; BOURSNEILL, J. C.** The split ejaculate of the boar: contributions of the epididymides and seminal vesicles. *Reproduction*, v. 42, p. 541–552, 1975.
- LEENHOUWERS, J.; BERGSMA, R.; KNOL, E.; FEITSMA, H.** Genetic parameters for fertility of boars and impact of selection against boar taint. In: *Proceedings*. Oxon, England: Blackwell Publishing, 2008. p. 100.
- LEVIS, D. G.; LEIBBRANDT, V. D.; ROZEBOOM, D. W.** Development of gilts and boars for efficient reproduction. *Pork Industry Handbook*, 1997. Disponível em: <http://digitalcommons.unl.edu/animalscifacpub/619>. Acesso em: 2 de março 2025.
- LI, L.; LIN, W.; WANG, Z.; HUANG, R.; XIA, H.; LI, Z.; YANG, Y.** Hormone regulation in testicular development and function. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 11, p. 5805, 2024.
- LIGNER, A.** Charakterisierung von Besamungsbullen anhand der mehrdimensionalen Graustufenanalyse sonografischer Bilder des Genitales sowie einem erweiterten spermatologischen Untersuchungsspektrum. 2009. Dissertação (Doutorado) – Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- LIN, Y.; WU, D.; CHE, L.; FANG, Z.; XU, S.; FENG, B.; ...; LI, L.** Dietary fibre supplementation improves semen production by increasing Leydig cells and testosterone synthesis in a growing boar model. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, 850685, 2022.
- LÓPEZ RODRÍGUEZ, A.; VAN SOOM, A.; ARSENAKIS, I.; MAES, D.** Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management*, v. 3, p. 15, 2017.
- LU, N.; DRITZ, S.; VIER, C. M.; NAVALES, R. A.; CAST, W. R.; KLEVE-FELD, M.; ORLANDO, U. A.** Effects of ad libitum or restricted feeding from 140 to 200 days of age on removal rate and semen production of PIC 800 boars. *Journal of Animal Science*, v. 100 (Suppl. 2), p. 73, 2022.
- LUACES, J. P.; TORO-URREGO, N.; OTERO-LOSADA, M.; CAPANI, F.** What do we know about blood-testis barrier? Current understanding of its structure and physiology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 11, 1114769, 2023.
- LUCACCIONI, L.; TREVISANI, V.; BONCOMPAGNI, A.; MARROZZINI, L.; BERARDI, A.; IUGHETTI, L.** Minipuberty: looking back to understand moving forward. *Frontiers in Pediatrics*, v. 8, 612235, 2020.
- LUCCA, M. S.; DOS SANTOS, L.; TAMANINI, M. D. S. C.; PAULA, A.; MELLAGI, G.; BORTOLOZZO, F. P.; DA ROSA ULGUIM, R.** Desafios e estratégias para identificação de machos subférteis em rebanhos suínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 45, n. 4, p. 173–178, 2021.

- LUGAR, D. W.; LUCY, M. C.; PROCTOR, J. A.; SAFRANSKI, T. J.; STEWART, K. R.** In utero heat stress causes reduced testicular area at puberty, reduced total sperm production and increased sperm abnormalities in boars. *Animal Reproduction Science*, v. 192, p. 126–135, 2018.
- LUNSTRA, D. D.; FORD, J. J.; KLINDT, J.; WISE, T. H.** Physiology of the Meishan boar. In: **FOXCROFT, G. R.; GEISERT, R. D.; DOBERSKA, C.** (Eds.). *Control of Pig Reproduction V. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, n. 52, p. 181–193, 1997.
- LUNSTRA, D. D.; WISE, T. H.; FORD, J. J.** Sertoli cells in boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 140–150, 2003.
- MAIN, D. C.; CLEGG, J.; SPATZ, A.; GREEN, L. E.** Repeatability of a lameness scoring system for finishing pigs. *Veterinary Record*, v. 147, p. 574–576, 2000.
- MALMGREN, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EINARSSON, S.** Attainment of spermatogenesis in Swedish cross-bred boars. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v. 43, n. 1-10, p. 169–179, 1996.
- MARQUES, D. B. D.; LOPES, M. S.; BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; GUIMARÃES, S. E. F.; KNOL, E. F.; BASTIAANSEN, J. W. M.; LOPES, P. S.** Genetic parameters for semen quality and quantity traits in five pig lines. *Journal of Animal Science*, v. 95, n. 10, p. 4251–4259, 2017.
- MASIDE, C.; RECUERO, S.; SALAS-HUETOS, A.; RIBAS-MAYNOU, J.; YESTE, M.** Animal board invited review: An update on the methods for semen quality evaluation in swine – from farm to the lab. *Animal*, v. 17, n. 3, 100720, 2023.
- MATSON, C. K.; MURPHY, M. W.; SARVER, A. L.; GRISWOLD, M. D.; BARDWELL, V. J.; ZARKOWER, D.** DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, v. 476, n. 7358, p. 101–104, 2011.
- MCCOARD, S. A.; LUNSTRA, D. D.; WISE, T. H.; FORD, J. J.** Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 689–695, 2001.
- MCCOARD, S. A.; WISE, T. H.; LUNSTRA, D. D.; FORD, J. J.** Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *Journal of Endocrinology*, v. 178, p. 395–403, 2003.
- MCPHERSON, F. J.; NIELSEN, S. G.; CHENOWETH, P. J.** Semen effects on insemination outcomes in sows. *Animal Reproduction Science*, v. 151, p. 28–33, 2014.
- MELLAGI, A. P. G.; PASCHOAL, A. F. L.; LOURDES, M.; BERNARDI, I. W.; BORTOLOZZO, F. P.** A avaliação andrológica em suínos foi esquecida na rotina de produção? 2017.
- MELLAGI, A. P. G.; WILL, K. J.; QUIRINO, M.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; ULGUIM, R. D. R.; BORTOLOZZO, F. P.** Update on artificial insemination: Semen, techniques, and sow fertility. *Molecular Reproduction and Development*, v. 90, p. 601–611, 2023.
- MENEGAT, M. B.** Avaliação de parâmetros espermáticos e de estresse oxidativo frente à homogeneização de doses de sêmen suíno armazenadas em diferentes diluentes. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- MONET-KUNTZ, C.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T.; TERQUI, M.** Variation in testicular androgen receptors and histology of the lamb testis from birth to puberty. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 70, p. 203–210, 1984.
- MOON, M. H.; KIM, S. H.; CHO, J. Y.; SEO, J. T.; CHUN, Y. K.** Scrotal US for evaluation of infertile men with azoospermia. *Radiology*, v. 239, p. 168–173, 2006.
- MOXON, R.; BRIGHT, L.; PRITCHARD, B.; BOWEN, I. M.; DE SOUZA, M. B.; DA SILVA, L. D. M.; ENGLAND, G. C.** Digital image analysis of testicular and prostatic ultrasonographic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. *Animal Reproduction Science*, v. 160, p. 112–119, 2015.
- MUÑOZ, I.** Determinación de la validez de la biomicroscopía ultrasónica como método de análisis de la función testicular en verraco. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Engenharia Agrônômica, Universidad de Zaragoza, Utebo.
- NEPOMUCENO, A. C.; CANOLA, I. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; AVANTE, M. L.** Princípios físicos da ultrassonografia e aplicações na reprodução animal. In: *Ultrassonografia na Reprodução Animal*. São Paulo: MedVet, 2013. p. 1–16.
- NOGUCHI, J.; NAKAI, M.; KIKUCHI, K.; KANEKO, H.; IMAEDA, N.** Early regression of spermatogenesis in boars of an inbred Duroc strain caused by incident orchitis/epididymo-orchitis. *Journal of Reproduction and Development*, v. 59, p. 273–281, 2013.
- O'DONNELL, L.; SMITH, L. B.; REBOURCET, D.** Sertoli cells as key drivers of testis function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 121, p. 24–32, 2022.
- OGAWA, S.; KIMATA, M.; TOMIYAMA, M.; SATOH, M.** Heritability and genetic correlation estimates of semen production traits with litter traits and pork production traits in purebred Duroc pigs. *Journal of Animal Science*, v. 100, n. 3, skac055, 2022.
- OH, S. H.; SEE, M. T.; LONG, T. E.; GALVIN, J. M.** Genetic correlations between boar semen traits. *Journal of Animal Science*, v. 81, p. 317, 2003.
- OMER, R.; GIFFIN, J.; HAHNEL, A.; BARTLEWSKI, P.** Relationships of ultrasonographic and magnetic resonance image attributes to the histomorphology of ram testes. *Reproductive Biology*, v. 12, p. 355–361, 2012.
- ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A.** Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v. 122, p. 787–794, 1988.
- O'SHAUGHNESSY, P. J.** Testicular development. In: **PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J.** (Eds.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4. ed. v. 1. San Diego: Academic Press, 2015. p. 567–594.
- PARK, C.; SOTO-HERAS, S.; REINACHER, L.; CHAI, K.; ZHOU, S.; LIN, P. C.; KO, C.** Inhibition of testicular development by suppressing neonatal LH rise in male domestic pigs. *Animal Reproduction Science*, v. 107606, 2024.
- PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.** Computer-assisted imaging analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. *Theriogenology*, v. 43, p. 105–112, 1995.
- PINHO, R. O.; CAMILO, B. S.; LIMA, D.; VILLADIEGO, F.; VERGARA, J.; SHIOMI, H. H.; CARDOSO, R. E.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S.; GUIMARÃES, J. D.** The use of ultrasonography in the reproductive evaluation of boars. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, p. 393–400, 2018.

- 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, 2013a.
- PINHO, R. O.; COSTA, D. S.; SIQUEIRA, J. B.; MARTINS, L. F.; MIRANDA NETO, T.; PEREIRA, J. V. T. do N.; GUIMARÃES, S. E. F.; GUIMARÃES, J. D.** Lesões fibróticas testiculares e qualidade seminal em touros adultos da raça Composto Montana Tropical. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 35, n. 2, p. 105–110, 2013b.
- PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E. R.** Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, p. 145–152, 2000.
- PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J.** (Eds.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 2014.
- PONTELO, T. P.; MIRANDA, J. R.; FELIX, M. A. R.; PEREIRA, B. A.; DA SILVA, W. E.; AVELAR, G. F.; MARIANO, F. C. M. Q.; GUIMARÃES, G. C.; ZANGERONIMO, M. G.** Histological characteristics of the gonads of pig fetuses and their relationship with fetal anatomical measurements. *Research in Veterinary Science*, v. 117, p. 28–36, 2018.
- POULSEN NAUTRUP, C.** Allgemeiner Teil. In: **POULSEN NAUTRUP, C.; TOBIAS, R.** (Hrsg.). *Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft GmbH & Co. KG, 1996. p. 273–282.
- POWIS, R.; POWIS, W.** *A Thinker's Guide to Ultrasonic Imaging*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg Inc., 1984.
- POZOR, M.; MORRISSEY, H.; ALBANESE, V.; KHOUZAM, N.; DERIBERPREY, A.; MACPHERSON, M. L.; ELLEMAN, A. A.** Relationship between echotextural and histomorphometric characteristics of stallion testes. *Theriogenology*, v. 99, p. 134–145, 2017.
- RAHMAN, K. M.; LOVICH, J. E.; LAM, C.; CAMP, M. E.; WILEY, A. A.; BARTOL, F. F.; BAGNELL, C. A.** Nursing supports neonatal testicular development. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 48, p. 84–92, 2014.
- RANTANEN, N.; EWING, R.** Principles of ultrasound application in animals. *Veterinary Radiology*, v. 22, p. 196–203, 1981.
- RATHJE, T. A.; JOHNSON, R. K.; LUNSTRA, D. D.** Sperm production in boars after nine generations of selection for increased weight of testis. *Journal of Animal Science*, v. 73, p. 2177–2185, 1995.
- RESENDE, P. C.; SIQUEIRA, A. P.; RODRIGUES, L. C.; LAGARES, M. A.; CHIARINI-GARCIA, H.; ALMEIDA, F. R.** Relationship between pre-pubertal biometrical measures and sperm parameters for the selection of high genetic merit pure and crossbred boars. *Theriogenology*, v. 127, p. 1–6, 2019.
- RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; HENNING, H.; WABERSKI, D.** Quality control of boar sperm processing: implications from European AI centres and two spermatology reference laboratories. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, suppl. 2, p. 1–4, 2015.
- ROBINSON, J. A. B.; BUHR, M. M.** Impact of genetic selection on management of boar replacement. *Theriogenology*, v. 63, p. 668–678, 2005.
- ROCA, J.; PARRILLA, I.; BOLARIN, A.; MARTINEZ, E. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** Will AI in pigs become more efficient? *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 187–193, 2016.

- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ-SERRANO, C. A.; ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.** Reproductive physiology of the boar: what defines the potential fertility of an ejaculate? *Animal Reproduction Science*, 107476, 2024.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; KVIST, U.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; SANZ, L.; PEÑA, F. J.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; et al.** The physiological roles of the boar ejaculate. *Bioscientífica Proceedings*, v. 66, p. 1–21, 2009.
- ROHAYEM, J.; ALEXANDER, E. C.; HEGER, S.; NORDENSTROM, A.; HOWARD, S. R.** Mini-puberty, physiological and disordered: consequences, and potential for therapeutic replacement. *Endocrine Reviews*, v. 45, p. 460–492, 2024.
- ROSS, M. H.** Sistema reproductor masculino. In: *Histologia: texto e atlas*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. p. 1211–1272.
- ROTHSCHILD, F. M.; RUVINSKY, A.** *The genetics of the pig*. 2. ed. Wallingford: CAB International, 2011. 507 p.
- RUIZ-SÁNCHEZ, A.; O'DONOGHUE, R.; NOVAK, S.; DYCK, M.; COSGROVE, J.; DIXON, W.; FOXCROFT, G.** The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology*, v. 66, n. 4, p. 736–748, 2006.
- RUSSELL, L. D.; REN, H. P.; HIKIM, I. S.; SCHULZE, W.; HIKIM, A. P. S.** A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *American Journal of Anatomy*, v. 188, n. 1, p. 21–30, 1990.
- RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D.** (Eds.). *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press, 1993.
- SAFRANSKI, T. J.** Genetic selection of boars. *Theriogenology*, v. 70, n. 8, p. 1310–1316, 2008.
- SAKAMOTO, H.; OGAWA, Y.; YOSHIDA, H.** Relationship between testicular volume and testicular function: comparison of the Prader orchidometric and ultrasonographic measurements in patients with infertility. *Asian Journal of Andrology*, v. 10, p. 319–324, 2008.
- SANCHO, S.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; KÁDÁR, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; COLL, M. G.; BONET, S.** Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. *Theriogenology*, v. 62, n. 7, p. 1271–1282, 2004.
- SANGLARD, L. P.; LEACH, R. J.; GOMEZ-LÉON, V. E.; SERÃO, N. V. L.** Relationship between the testis size in male pigs and reproductive traits in their progeny. *Livestock Science*, v. 228, p. 72–75, 2019.
- SCHINCKEL, A.; JOHNSON, R. K.; PUMFREY, R. A.; ZIMMERMAN, D. R.** Testicular growth in boars of different genetic lines and its relationship to reproductive performance. *Journal of Animal Science*, v. 56, n. 5, p. 1065–1076, 1983.
- SCHINCKEL, A. P.; JOHNSON, R. K.; KITTOCK, R. J.** Testicular development and endocrine characteristics of boars selected for either high or low testis size. *Journal of Animal Science*, v. 58, n. 3, 1984.
- SCHNORR, B.; KRESSIN, M.** *Embriologia de animais domésticos*. 5. ed. Stuttgart: Enke, 2006.
- SCHULZE, M.; BEYER, S.; BEYER, F.; BORTFELDT, R.; RIESENBECK, A.; LEIDING, C.; JUNG, M.; KLEVE-FELD, M.** Relationship between pubertal testicular ultrasonographic evaluation and future reproductive performance potential in Piétrain boars. *Theriogenology*, v. 158, p. 58–65, 2020.
- SCHULZE, M.; BUDER, S.; RÜDIGER, K.; BEYERBACH, M.; WABERSKI, D.** Influences on semen traits used for selection of young AI boars. *Animal Reproduction Science*, v. 148, p. 164–170, 2014.

- SCHULZE, M.; JUNG, M.; HENSEL, B.** Science-based quality control in boar semen production. *Molecular Reproduction and Development*, v. 90, p. 612–620, 2023.
- SCHULZE, M.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; SCHMOLL, F.; GROSSFELD, R.; GRIESSLER, A.** Effects on boar semen quality after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 55, p. 16–24, 2013.
- SCHURICH, M.; AIGNER, F.; FRAUSCHER, F.; PALLWEIN, L.** The role of ultrasound in assessment of male fertility. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, v. 144, supl. 1, p. S192–S198, 2009.
- SCHWARZENBERGER, F.; TOOLE, G. S.; CHRISTIE, H. L.; RAESIDE, J. I.** Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs. *Acta Endocrinologica*, v. 128, p. 173–177, 1993.
- SEBASTIÁN-ABAD, B.; LLAMAS-LÓPEZ, P. J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.** Relevance of the ejaculate fraction and dilution method on boar sperm quality during processing and conservation of seminal doses. *Veterinary Sciences*, v. 8, n. 12, p. 292, 2021.
- SEGURA-GRAU, A.; SÁEZ-FERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ-LORENZO, A.; DÍAZ-RODRÍGUEZ, N.** Curso de ecografía abdominal: introducción a la técnica ecográfica. principios físicos. lenguaje ecográfico. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, v. 40, n. 1, p. 42–46, 2014.
- SEHGAL, C.** Quantitative relationship between tissue composition and scattering of ultrasound. *Journal of the Acoustical Society of America*, v. 94, p. 1944–1952, 1993.
- SENGER, P. L.** *Pathways to pregnancy and parturition*. 3. ed. Redmond, OR: Current Conceptions, 2012.
- SERGIO, M.; TRENHOLM, L.; BO, G. A.; SCHAFFHAUSER JUNIOR, J.; LUCCA, M. S.; SCHNEIDER, A.; SCHNEIDER, F.; ALMEIDA, F. R. C. L.** Echotexture of testicular parenchyma as a predictor of the seminal quality in AI beef bulls. *Large Animal Review*, v. 28, n. 4, p. 165–171, 2022.
- SETCHELL, B. P.** Male reproductive organs and semen. In: **COLE, H. H.; CUPPS, P. T.** (Eds.). *Reproduction in domestic animals*. Nova York: Academic Press, 1977. p. 229–256.
- SIKARWAR, S.; MATHUR, R.; DANGI, A.** Ultrasonographical and angiographical study on the testes of Large White Yorkshire pig (*Sus scrofa*). *Indian Journal of Veterinary Anatomy*, v. 31, n. 1, p. 71–72, 2019.
- SHARPE, R. M.** Regulation of spermatogenesis. In: **KNOBIL, E.; NEILL, J. D.** (Eds.). *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 1363–1434.
- SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J. S.** Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, v. 125, n. 6, p. 769–784, 2003.
- SHIMA, Y.** Development of fetal and adult Leydig cells. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 18, n. 4, p. 323–330, 2019.
- SHIMA, Y.; MOROHASHI, K.** Leydig progenitor cells in fetal testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 445, p. 55–64, 2017.
- SIEMS, J.** Diagnostic ultrasound. In: **HAN, C. M.; HURD, C. D.** *Practical diagnostic imaging*. New York: Mosby, 2000. chap. 9, p. 228–270.
- SIMONI, M.; HUHTANIEMI, I. T.** (Eds.). *Endocrinology of the testis and male reproduction*. Cham: Springer International Publishing, 2017.

- SINGH, G. P.; ADAMS, G. P.** Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. *Anatomical Record*, v. 258, p. 58–70, 2000.
- SINGH, G. P.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.** Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 371–399, 2003.
- SINGH, J.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.** Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, p. 35–44, 1997.
- SINGH, R.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.** Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 112, p. 19–29, 1998.
- SMITAL, J.** Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*, v. 110, n. 3–4, p. 335–346, 2009.
- SMITAL, J.; WOLF, J.; DE SOUSA, L.** Estimation of genetic parameters of semen characteristics and reproductive traits in AI boars. *Animal Reproduction Science*, v. 86, n. 1, p. 119–130, 2005.
- SMITAL, J.; DE SOUSA, L. L.; MOHSEN, A.** Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boar sperm output. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 121–130, 2004.
- SONDERMAN, J. P.; LUEBBE, J. J.** Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. *Theriogenology*, v. 70, n. 8, p. 1380–1383, 2008.
- STENHOUSE, C.; CORTES-ARAYA, Y.; DONADEU, F. X.; ASHWORTH, C. J.** Associations between testicular development and fetal size in the pig. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2022.
- STRAKOWSKI, J. A.** *Introduction to musculoskeletal ultrasound – getting started*. New York: Demos Medical, 2016.
- SWIERSTRA, E. E.** Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *The Anatomical Record*, v. 161, n. 2, p. 171–185, 1968.
- TRUDEAU, V. L.; MEIJER, J. C.; ERKENS, J. H.; VAN DE WIEL, D. F.; WENSING, C. J.** Pubertal development in the male pig: effects of treatment with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist on plasma luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 56, p. 102–109, 1992.
- URT, M. A. G.** Ecotextura testicular e qualidade seminal em ovinos da raça Texel. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.
- VAN STRAATEN, H. W.; WENSING, C. J. G.** Leydig cell development in the testis of the pig. *Biology of Reproduction*, v. 18, p. 86–93, 1978.
- VAN VORSTENBOSCH, C. J. A. H. V.; SPEK, E.; COLENBRANDER, B.; WENSING, C. J. G.** Sertoli cell development of pig testis in the fetal and neonatal period. *Biology of Reproduction*, v. 31, p. 565–577, 1984.
- VENIANAKI, A. P.; BARBAGIANNI, M. S.; FTHENAKIS, G. C.; GALATOS, A. D.; GOULETSOU, P. G.** Ultrasonography of testicular maturation and correlation with body growth and semen evaluation in Beagle dog model. *Veterinary Sciences*, v. 11, n. 6, p. 270, 2024.
- WABERSKI, D.; RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; WEITZE, K. F.; JOHNSON, L.** Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges. *Theriogenology*, v. 137, p. 2–7, 2019.

- WAGNER, A.; CLAUS, R.** Aromatase and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 localisation in the testes of pigs from birth to puberty linked to changes of hormone pattern and testicular morphology. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, p. 505–512, 2008.
- WAITES, G. M.; SPEIGHT, A. C.; JENKINS, N.** The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 75, p. 317–326, 1985.
- WELSH, M.; SAUNDERS, P. T. K.; ATANASSOVA, N.; SHARPE, R. M.; SMITH, L. B.** Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB Journal*, v. 23, p. 4218–4230, 2009.
- WHITTEMORE, C. T.; KYRIAZAKIS, I.** *Whittemore's science and practice of pig production*. Chichester: John Wiley & Sons, 2008.
- WIGGER, A.; KRAMER, M.** Physikalische Grundlagen des Ultraschalls – eine Einführung in die Sonografie. *Praktische Tierarzt*, v. 89, n. 12, p. 1006, 2008.
- WILHELM, D.; PALMER, S.; KOOPMAN, P.** Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, v. 87, n. 1, p. 1–28, 2007.
- WILLIAMS, A.; JOHNSON, A.; MILLER, D.; HOLDEN, N.; PATTERSON, J.; DYCK, M.; FOXCROFT, G.** Commercial application of reducing semen concentration per dose and single sire evaluation. In: *Allen D. Leman Swine Conference*, Twin Cities, US. Twin Cities: University of Minnesota, 2011. p. 131–134.
- WILSON, E. R.; JOHNSON, R. K.; WETTEMANN, R. P.** Reproductive and testicular characteristics of purebred and crossbred boars. *Journal of Animal Science*, v. 44, p. 939, 1977.
- WINTERS, R. A.; HAMILTON, D. N.; BHATNAGAR, A. S.; FITZGERALD, R.; BOVIN, N.; MILLER, D. J.** Porcine sperm binding to oviduct cells and glycans as supplements to traditional laboratory semen analysis. *Journal of Animal Science*, v. 96, n. 12, p. 5265–5275, 2018.
- WOLF, J.** Heritabilities and genetic correlations for litter size and semen traits in Czech Large White and Landrace pigs. *Journal of Animal Science*, v. 88, p. 2893–2903, 2010.
- WRIGHT, W. W.; MUSTO, N. A.; MATHER, J. P.; BARDIN, C. W.** Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 78, n. 12, p. 7565–7569, 1981.
- YE, L.; LI, X.; LI, L.; CHEN, H.; GE, R. S.** Insights into the development of the adult Leydig cell lineage from stem Leydig cells. *Frontiers in Physiology*, v. 8, p. 430, 2017.
- ŽAJA, I. Ž.; SAMARDŽIJA, M.; VINCE, S.; MAJIĆ-BALIĆ, I.; VILIĆ, M.; ĐURIČIĆ, D.; MILINKOVIĆ-TUR, S.** Influence of boar breeds or hybrid genetic composition on semen quality and seminal plasma biochemical variables. *Animal Reproduction Science*, v. 164, p. 169–176, 2016.
- ZAK, L. J.; GAUSTAD, A. H.; BOLARIN, A.; BROEKHUIJSE, M. L.; WALLING, G. A.; KNOL, E. F.** Genetic control of complex traits, with a focus on reproduction in pigs. *Molecular Reproduction and Development*, v. 84, n. 9, p. 1004–1011, 2017.
- ZENG, W.; AVELAR, G. F.; RATHI, R.; FRANÇA, L. R.; DOBRINSKI, I.** The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. *Journal of Andrology*, v. 27, n. 4, p. 527–533, 2006.
- ZHAO, Y.; GAO, N.; LI, X.; EL-ASHRAM, S.; WANG, Z.; ZHU, L.; LI, Z.** Identifying candidate genes associated with sperm morphology abnormalities using weighted single-step GWAS in a Duroc boar population. *Theriogenology*, v. 141, p. 9–15, 2020.

- ZHAO, Y.; ZHANG, L.; WANG, L.; ZHANG, J.; SHEN, W.; MA, Y.; DING, C.; WU, G.** Identification and analysis of genes related to testicular size in 14-day-old piglets. *Animals*, v. 14, n. 1, p. 172, 2024.
- ZHENG, Y.; GAO, Q.; LI, T.; LIU, R.; CHENG, Z.; GUO, M.; ZENG, W.** Sertoli cell and spermatogonial development in pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 45, 2022.
- ZIMMERMANN, S.; STEDING, G.; EMMEN, J. M.; BRINKMANN, A. O.; NAYERIA, K.; HOLSTEIN, A. F.; ENGEL, W.; ADHAM, I. M.** Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Molecular Endocrinology*, v. 13, p. 681–691, 1999.
- ZINK, C.** *Ultraschalllexikon*. Berlin und Wien: Blackwell Wissenschaftsverlag, 1996. p. 42.
- ZOZULIA, K.; PASH, T.** *IMV imaging technical guide for boar ultrasonography*. In: **PLICHART, G. V.; ECHEGARAY, A.; CHATEAU, E.** (Eds.). 2023. Disponível em: <https://www.imv-imaging.co.uk>. Acesso em: 05 fev. 2025.

#### **4. Artigo 1**

Manuscrito a ser submetido.

##### **4.1 Selecting Elite Boars: A Comparative Approach to Reproductive Development and Ultrasonography Across Genetic Lines**

## Selecting Elite Boars: A Comparative Approach to Reproductive Development and Ultrasonography Across Genetic Lines

L. P. Moreira<sup>a</sup>, M. Kleve-Feld<sup>b</sup>, A.L.N. Alvarenga Dias<sup>c</sup>, M. Jobin<sup>b</sup>, E. Psota<sup>b</sup>, R.R. Wenceslau<sup>d</sup>, A. L. Caldeira-Brant<sup>a</sup>, F.R.C.L. Almeida<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil*

<sup>b</sup> *Pig Improvement Company, Hendersonville, TN 37075, United States*

<sup>c</sup> *Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, 38410-337, Brazil*

<sup>d</sup> *Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil*

### Abstract

Genetic improvement programs in pigs aim to select boars with the best productive characteristics, adjusted to the particularities of each line, dam or sire line. This study aimed to compare genetic lines regarding postnatal growth and reproductive development, focusing on body weight, average daily gain, testicular biometry, and grayscale ultrasonographic parameters (GSA) at key developmental stages. Boars from dam lines (Landrace and Large White) and sire lines (Duroc and Synthetic Terminal) were weighed, and their testicle length and width were measured at birth, post-weaning, on-test, and off-test. Testicular ultrasonography was performed post-weaning, on-test, and off-test. At off-test, backfat thickness and muscle depth were also measured. Results indicated that dam lines had lower birth weights than sire lines ( $P < 0.05$ ). At the on-test and off-test stages, Synthetic Terminal boars were the heaviest, while Large White boars were the lightest ( $P < 0.05$ ). Dam lines showed the highest ADWG during the preweaning phase, whereas Synthetic Terminal and sire lines outperformed others in the nursery and growth phases, respectively ( $P < 0.05$ ). Testicular biometry was also genotype-dependent: Large White and Duroc boars had the smallest dimensions at birth ( $P < 0.05$ ), and Durocs maintained the lowest values throughout development. Testicular volume correlated significantly with all body weight measures ( $P < 0.05$ ). Gray-scale ultrasound parameters (MAXGV, MINGV, MEANGV) differed between genetic lines, especially during the post-weaning and on-test stages, with sire lines exhibiting higher values. Selection criteria for breeding boars must account for the specific traits of different genetic lines. Body weight and average daily weight gain (ADWG) are key indicators of growth

performance and should be considered in selection programs. Ultrasound monitoring of testicular development provides valuable insights into the onset and progression of puberty.

**Keywords:** Boar reproduction, Birth weight, Genotype, Testicular biometry

**Highlights:**

- Boar selection strategies should consider genetic line differences
- Postnatal growth represents a critical window for reproductive development in boars
- Postnatal testicular development can be effectively assessed by ultrasonography

**Introduction**

As artificial insemination became more widespread, the quality of boar semen became increasingly important. Since a single boar can produce thousands of AI doses and therefore has the potential to sire hundreds of litters per year, special attention was paid to the selection of breeding boars (Hensel *et al.* 2024). The increased efficiency of pork production should involve enhanced use of boars with strong reproductive efficiency and the highest genetic merit for important production traits (Dyck *et al.* 2011).

The relevance of birth weight as a predictor of sperm production capacity has been demonstrated in several studies (Sacramento *et al.*, 2022; Auler *et al.*, 2017). These results support the hypothesis that prenatal programming of testicular development contributes to the association between adult testis size and lifetime semen output (Auler *et al.*, 2017).

Resende *et al.* (2019) highlighted the relevance of early-life body and testicular measurements, particularly during the preweaning period, as indicators of future sperm production capacity and overall lifetime performance in boar studs. The authors recommend incorporating these parameters into the genetic selection process to improve genotype-specific efficiency and ultimately reduce production costs.

Yang *et al.* (2024) mapped and characterized genomic variations in pigs, providing a valuable resource for understanding genetic diversity, species evolution, and advances in genetic improvement. Western breeds have been subjected to intense selection for major economic traits, including higher growth rates, muscle mass, and feed efficiency (Yang *et al.* 2024).

Genetic improvement companies typically initiate boar selection through a performance test that begins after the nursery phase, during the prepubertal period, and continues through peri- or post-puberty, generally between 75 and 180 days of age, although this may vary.

During this phase, data on growth rate, feed efficiency, and genetic potential are collected and analyzed (Whittemore and Kyriazakis, 2008; Rothschild and Ruvinsky, 2011). The start of the test is referred to as 'on-test,' and its conclusion as 'off-test'.

The B-mode ultrasound has been used in different domestic animals species as a valid tool to estimate the testicular volume, to assess of pubertal development, estimate the parenchyma echotexture, and identify early stages of macroscopic pathological processes or monitoring changes in lesions (Clark *et al.* 2003; Giffin *et al.* 2009; Ford and Wise, 2011; Zelli 2013; Pozor *et al.* 2014; Schulze *et al.* 2020; Montes-Garrido *et al.* 2022). As reported in the literature, B-mode sonography is considered a non-invasive and practical technique for detailed examination of boar testes (Clark *et al.* 2003, Ford and Wise, 2011; Cartee *et al.* 1986; Pinho *et al.* 2018, Paschoal *et al.* 2019; Schulze *et al.* 2020).

Schulze *et al.* (2020) provide information suggesting a prognosis on the future reproductive performance potential in Pietrain boars at the time of puberty by means of GSA (Gray Scale Analyses) of sonographic testicular sectional images during on and off-test. A direct comparison between different developmental phases requires repeated evaluations of testicular tissue in the same individuals over time, highlighting the importance of studying and understanding the dynamics of postnatal reproductive development to improve the accuracy and efficiency of boar selection processes.

The objective of this study was to evaluate postnatal growth differences among distinct genetic lines, with emphasis on the kinetics of reproductive development. Body weight, testicular biometrics, and ultrasonographic traits were assessed at key developmental stages to identify early phenotypic markers of reproductive potential, aiming to improve the accuracy of boar selection programs.

## **Material and methods**

### *Study design and animals*

The study was conducted on a nucleus farm of PIC (Pig Improvement Company) located in the Midwest of USA. All procedures involving the animals in this experiment were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation from the Federal University of Minas Gerais (CEUA/UFMG, Protocol no. 43/2023). Boars from four pure breeds (Landrace - LD, Large White - LW, Synthetic Terminal - ST and Duroc - DU; Pig Improvement Company, Hendersonville, USA) were selected and followed from birth until the selection process.

### *Housing and management*

Over a 4-week period, all male piglets born at the nucleus farm were weighed, had their testicular biometry measured, and identified with ear tags. After three weeks, the male piglets were transferred to the nursery room and allocated by genetic line in suspended pens (0.25 m<sup>2</sup>/animal), with plastic floor, where they remained until on-test day. At an average age of 30.12 (SD ±2.28) days, the piglets were weighed, their testis length and testicular biometry were measured, and scanned by ultrasound. The on-test phase began when the boars were transferred to the grower/finisher room, where they were allocated in pens (0.75 m<sup>2</sup>/animal). At this moment, an average age of 75.52 (SD ±2.55) days, they were weighed, had testicular biometry measured, and were submitted to a genetic and clinical evaluation. Boars with low genetic index or morphological issues (e.g., locomotor problems, hernia) were culled. Afterwards, at the end of the performance test period (off-test) with an average age of 134.65 (SD±2.03), the boars were weighed, their backfat thickness and muscle depth were measured, and they were submitted to a genetic and a clinical evaluation. Boars that failed the selection process, due to a low genetic index or morphological problems, were also culled. All animals were housed in a temperature-controlled facility, with *ad libitum* access to water and fed a standard corn–soybean diet formulated for breeding age, containing 16.5% crude protein, 3.6% crude fat, and 4.5% crude fiber.

### *Body weight and testicular biometry*

Individual body weight was recorded from all male pigs at four time points: at birth (LD, n = 424; LW, n = 278; ST, n = 385; DU, n = 431), post-weaning (LD, n = 370; LW, n = 255; ST, n = 349; DU, n = 377), at on-test (LD, n = 257; LW, n = 135; ST, n = 336; DU, n = 309) and at off-test (LD, n = 233; LW, n = 127; ST, n = 324; DU, n = 296). Testicular biometry was performed using an electronic digital caliper (NEIKO 01407A, Neiko Tools, China) to measure the length and width of both the right and left testes. Testicular width was measured along the largest portion of the gonad in the lateral-medial direction, perpendicular to its length. Testicular length was measured as the maximum distance between the upper (cranial) and lower (caudal) extremities of the testis.

### *Average Daily Weight Gain (ADWG)*

The average daily weight gain (ADWG) was calculated for each phase (pre-weaning, nursery, grower) and for the total period. It was determined by subtracting the initial weight from the

final weight at each phase and dividing the result by the number of days in the respective phase.

#### *Testicular volume and ultrasound parameters*

The testicular volume was measured post-weaning, at on-test and off-test using an Exapad Mini ultrasound (IMV Imaging, Angoulême, France) and calculated as described by Schulze *et al.* (2020). All ultrasonographic evaluations were performed using a linear-array transducer operating at a frequency of 10 MHz. Grayscale analysis (GSA) was performed using MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, USA) and Python (Python Software Foundation, Delaware, USA) software. Images with motion artifacts or errors due to scrotal impurities were excluded from the analysis. For each testis, two images (transversal and longitudinal section) were randomly selected based on a machine learning process. Consequently, the grayscale pixel distribution and coloration were analyzed in four images per boar per age group. The region of interest (ROI;  $18,000 \pm 100$  pixels) was continually positioned adjacent to the mediastinum testis, near the transducer (Figure 1). Care was taken to maintain an optimal distance from the hypoechoic strip in the testicular area near the probe while avoiding overlaps with the tunica albuginea and mediastinum testis. Care was taken to maintain an optimal distance from the hypoechoic strip in the testicular area near the probe while avoiding overlaps with the tunica albuginea and mediastinum testis. The following one- and two-dimensional GSA parameters were assessed: maximum gray value (MAXGV), minimum gray value (MINGV), mean gray value (MEANGV), standard deviation of MEANGV (DEVOFTHEMEAN), heterogeneity (HET), normalized grayscale histogram width at 5% level (NORMGSH), area under the curve (AUC) and mean gradient value (MEANGRAD).



Figure 1. Longitudinal B-mode ultrasonographic image of a boar at the off-test stage. Anatomical landmarks: M – mediastinum; P – testicular parenchyma; TA – tunica albuginea. The black square indicates the region of interest (ROI) selected for grayscale analysis.

### *Statistical analysis*

The study was designed as an observational, longitudinal cohort study. Descriptive statistics were calculated to summarize the data, including means and standard deviations (SD) for continuous variables. All values exceeding three standard deviations above or below the mean were considered outliers and excluded from the analyses. Continuous variables were tested for normality and homogeneity. The covariate structure that best fitted each end point was used. Comparisons between genetic lines were performed using one-way ANOVA, with genetic line as the main fixed factor and age or weight included as covariates when applicable. Significance level was set as 0.05, and results were expressed as mean  $\pm$  standard error (SE) unless stated otherwise. Post hoc tests were conducted using Tukey's HSD test when appropriate.

To evaluate the effects of genetic line, testis side, image position, and evaluation time on the GSA parameters, a linear mixed-effects model was fitted. Interactions up to four factors were included to capture potential combined effects among the fixed variables. The model was fitted using the Restricted Maximum Likelihood (REML) method, with degrees of freedom estimated using Satterthwaite's method. Tukey's method was applied to adjust *P*-values for multiple comparisons. Statistical analyses were performed using R version 4.4.2 (2024) (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## **Results**

### *Body weight*

Dam lines exhibited lower birth weights compared to sire lines (Table 1;  $P < 0.05$ ). Post-weaning, Duroc boars showed significantly lower weights compared to the other genetic lines (Table 1;  $P < 0.05$ ). At the on-test phase, Synthetic Terminal boars had the highest body weight (Table 1;  $P < 0.05$ ). At the off-test phase, all genetic lines displayed significant differences in body weight, with Synthetic Terminal being the heaviest and Large White the lightest (Table 1;  $P < 0.05$ ).

Table 1. Results of weight among different genetic lines and moments

Weight	Dam Lines				Sire Lines			
	Landrace		Large White		Synthetic Terminal		Duroc	
	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n
Birth weight, kg	1.48 ( $\pm$ 0.01) c	424	1.47 ( $\pm$ 0.02) c	278	1.68 ( $\pm$ 0.01) a	385	1.56 ( $\pm$ 0.01) b	431
Post-weaning, kg	7.49 ( $\pm$ 0.06) a	370	7.61 ( $\pm$ 0.07) a	255	7.43 ( $\pm$ 0.06) a	349	7.04 ( $\pm$ 0.06) b	377
On-test, kg	36.18 ( $\pm$ 0.29) b	257	34.77 ( $\pm$ 0.40) c	135	37.74 ( $\pm$ 0.25) a	336	34.65 ( $\pm$ 0.26) c	309
Off-test, kg	97.53 ( $\pm$ 0.52) c	233	92.39 ( $\pm$ 0.71) d	127	107.81 ( $\pm$ 0.44) a	324	100.46 ( $\pm$ 0.46) b	296

Different letters within a row indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test.

#### *Average Daily Weight Gain (ADWG)*

During the pre-weaning phase, LW exhibited the highest ADWG. In the nursery phase, Synthetic Terminal showed the highest ADWG. Meanwhile, in the growth phase, ST line demonstrated a higher ADWG compared to other lines, as well as a greater total ADWG (Table 2;  $P < 0.05$ ). Muscle depth and backfat thickness differed between genetic lines (Table 2;  $P < 0.05$ ) and are traits directly associated with genetic improvement.

Table 2. Results for performance parameters among different genetic lines and moments

Parameters	Dam Lines				Sire Lines			
	Landrace		Large White		Synthetic Terminal		Duroc	
	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n
ADWG Pre-weaning, kg	0.197 ( $\pm$ 0.002)ab	370	0.202 ( $\pm$ 0.002) a	255	0.193 ( $\pm$ 0.002) b	348	0.182 ( $\pm$ 0.002) c	374
ADWG Nursery, kg	0.620 ( $\pm$ 0.006) b	254	0.597 ( $\pm$ 0.008) b	134	0.667 ( $\pm$ 0.005) a	320	0.613 ( $\pm$ 0.006) b	305
ADWG Total, kg	0.721 ( $\pm$ 0.005) c	207	0.686 ( $\pm$ 0.006) d	113	0.799 ( $\pm$ 0.004) a	273	0.749 ( $\pm$ 0.004) b	250
Muscle depth, mm	64.87 ( $\pm$ 0.30) c	234	62.58 ( $\pm$ 0.40) d	127	85.26 ( $\pm$ 0.25) a	324	68.74 ( $\pm$ 0.26) b	296
Backfat thickness, mm	7.89 ( $\pm$ 0.09) b	229	8.30 ( $\pm$ 0.12) a	120	7.17( $\pm$ 0.08) c	323	7.73 ( $\pm$ 0.08) b	296

ADWG: Average Daily Weight Gain. Different letters indicate significant differences between groups in a row ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test.

#### *Testicular biometry*

Testicular length and width of both testicles were also affected by genetic line (Table 3). At birth Large White and Duroc had the smallest measurements ( $P < 0.05$ ). Post-weaning, Duroc

showed the lowest values ( $P < 0.05$ ), whereas at on-test, Large White had the smallest testicular dimensions ( $P < 0.05$ ).

Table 3. Results of testicular biometry among different genetic lines and overtime.

Testicular Biometry	Dam Lines				Sire Lines			
	Landrace		Large White		Synthetic Terminal		Duroc	
	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n
At Birth								
LL, mm	13.52 ( $\pm$ 0.09) a	420	12.83 ( $\pm$ 0.12) b	270	12.90 ( $\pm$ 0.10) b	382	13.64 ( $\pm$ 0.09) a	417
LW, mm	12.68 ( $\pm$ 0.08) a	411	12.26 ( $\pm$ 0.09) b	275	12.55 ( $\pm$ 0.08) ab	373	12.45 ( $\pm$ 0.07) ab	416
RL, mm	13.93 ( $\pm$ 0.10) a	417	13.20 ( $\pm$ 0.13) b	273	13.10 ( $\pm$ 0.11) b	385	13.65 ( $\pm$ 0.10) a	419
RW, mm	12.56 ( $\pm$ 0.07) a	410	12.42 ( $\pm$ 0.09) a	277	12.41 ( $\pm$ 0.08) a	378	12.11 ( $\pm$ 0.07) b	419
Post-Weaning								
LL, mm	19.94 ( $\pm$ 0.09) a	368	20.09 ( $\pm$ 0.11) a	253	20.14 ( $\pm$ 0.09) a	349	19.60 ( $\pm$ 0.09) b	374
LW, mm	19.25 ( $\pm$ 0.08) a	368	19.09 ( $\pm$ 0.10) a	249	19.32 ( $\pm$ 0.08) a	350	18.74 ( $\pm$ 0.08) b	376
RL, mm	20.48 ( $\pm$ 0.08) a	368	20.66 ( $\pm$ 0.10) a	252	20.64 ( $\pm$ 0.08) a	348	19.66 ( $\pm$ 0.08) b	374
RW, mm	19.12 ( $\pm$ 0.08) a	368	19.02 ( $\pm$ 0.10) ab	252	19.11 ( $\pm$ 0.08) a	349	18.70 ( $\pm$ 0.08) b	376
On-test								
LL, mm*	37.81 ( $\pm$ 0.32)	102	36.91 ( $\pm$ 0.37)	78	38.09 ( $\pm$ 0.32)	104	37.71 ( $\pm$ 0.32)	103
LW, mm	26.30 ( $\pm$ 0.24) a	103	24.70 ( $\pm$ 0.28) b	78	26.55 ( $\pm$ 0.24) a	104	26.34 ( $\pm$ 0.25) a	102
RL, mm	38.56 ( $\pm$ 0.32) a	102	36.61 ( $\pm$ 0.37) b	78	38.36 ( $\pm$ 0.32) a	105	38.10 ( $\pm$ 0.32) a	103
RW, mm	26.22 ( $\pm$ 0.25) a	102	24.81 ( $\pm$ 0.28) b	78	26.90 ( $\pm$ 0.25) a	105	27.08 ( $\pm$ 0.25) a	102

LL: Left length; LW: Left width; RL: Right length; RW: Right width. Different letters indicate significant differences between groups in a row ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test; \* denotes no significant difference ( $P > 0.05$ ).

### *Testicular Volume*

In the post-weaning phase, Large White boars exhibited the greatest testicular volume ( $P < 0.05$ ). At the on-test, the highest testicular volume was observed in Synthetic Terminal boars ( $P < 0.05$ ). By the off-test stage, Duroc boars presented the lowest testicular volume among the evaluated genetic lines (Table 4). Throughout postnatal development, testicular volume increased 16-fold in Duroc boars and 12.2-fold in Large White boars (Table 5).

Table 4. Results of testicular volume measured by ultrasound among different genetic lines and moments.

Parameters	Dam Lines				Sire Lines			
	Landrace		Large White		Synthetic Terminal		Duroc	
	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n
Post-Weaning								
Left Volume, cm <sup>3</sup>	1.80 ( $\pm$ 0.04) c	361	2.68 ( $\pm$ 0.05) a	233	2.37 ( $\pm$ 0.04) b	339	1.70 ( $\pm$ 0.04) c	347
Right Volume, cm <sup>3</sup>	1.95 ( $\pm$ 0.04) c	360	2.64 ( $\pm$ 0.05) a	234	2.26 ( $\pm$ 0.04) b	339	1.80 ( $\pm$ 0.04) d	351
Paired volume, cm <sup>3</sup>	3.75 ( $\pm$ 0.07) c	361	5.38 ( $\pm$ 0.09) a	234	4.62 ( $\pm$ 0.07) b	339	3.50 ( $\pm$ 0.07) d	349
On-test								
Left Volume, cm <sup>3</sup>	6.32 ( $\pm$ 0.19) b	252	6.69 ( $\pm$ 0.26) b	130	8.45 ( $\pm$ 0.16) a	328	5.64 ( $\pm$ 0.17) c	306
Right Volume, cm <sup>3</sup>	7.37 ( $\pm$ 0.19) b	255	7.57 ( $\pm$ 0.26) b	132	8.43 ( $\pm$ 0.17) a	329	7.41 ( $\pm$ 0.17) b	303
Paired volume, cm <sup>3</sup>	13.70 ( $\pm$ 0.33) b	253	14.05 ( $\pm$ 0.48) b	119	16.60 ( $\pm$ 0.29) a	323	13.12 ( $\pm$ 0.30) b	305
Off-test								
Left Volume at, cm <sup>3</sup>	30.97 ( $\pm$ 1.26) ab	123	31.54 ( $\pm$ 1.37) ab	104	32.27 ( $\pm$ 0.96) a	211	27.28 ( $\pm$ 1.03) b	184
Right Volume, cm <sup>3</sup>	28.19 ( $\pm$ 1.09) a	124	29.90 ( $\pm$ 1.20) a	103	28.56 ( $\pm$ 0.84) a	211	23.32 ( $\pm$ 0.90) b	184
Paired volume, cm <sup>3</sup>	58.90 ( $\pm$ 2.22) a	123	62.74 ( $\pm$ 2.40) a	105	60.90 ( $\pm$ 1.69) a	211	51.24 ( $\pm$ 1.81) b	185

Different letters indicate significant differences between groups in a row ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test.

Table 5. Growth rate of testicular volume across time points.

Moment	Landrace	Large White	Synthetic Terminal	Duroc
Post-weaning to On-test	3.73	2.81	3.81	4.18
On-test to Off-test	4.28	4.48	3.89	3.98
Post-weaning to Off-test	15.7	12.2	14.4	16.0

Figure 2 illustrates the correlations between body weight parameters and testicular volume measured by ultrasound. All correlations were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The weakest correlation was observed between birth weight and the volume of paired testes at 134.65 days of age.

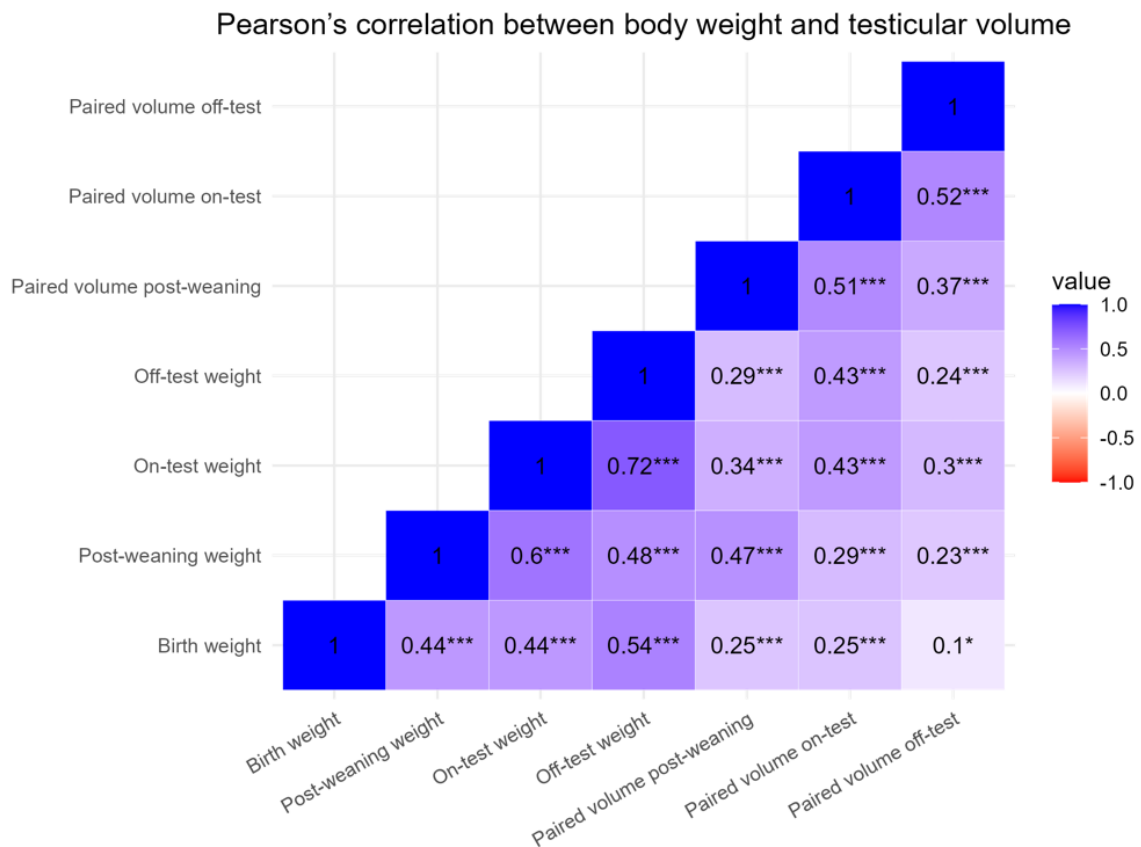


Figure 2. Pearson's correlation between body weight and testicular volume. Positive correlations are represented in blue and negative in red. Significance levels:  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*, and  $P < 0.001$  \*\*\*.

### *GSA parameters*

Gray-scale parameters behaved differently among the various genetic lines. During the post-weaning period, the highest values were generally observed in Large White and Synthetic Terminal boars. In the ultrasonographic evaluation conducted at approximately 75.52 days of age, boars from the sire line exhibited higher values, particularly for the parameters MAXGV, MINGV, and MEANGV. At the off-test stage, the numerical differences between genetic lines were less pronounced (Table 6). Figure 3 illustrates the variation in grayscale distribution of the testicular parenchyma at different ages. Lighter shades, indicative of increased echogenicity and higher grayscale values, were more evident at the off-test stage.

Figure 3. Representative longitudinal and transversal B-mode ultrasonographic images of the testis from the same boar at post-weaning, on-test, and off-test stages, illustrating changes in testicular parenchyma throughout development.

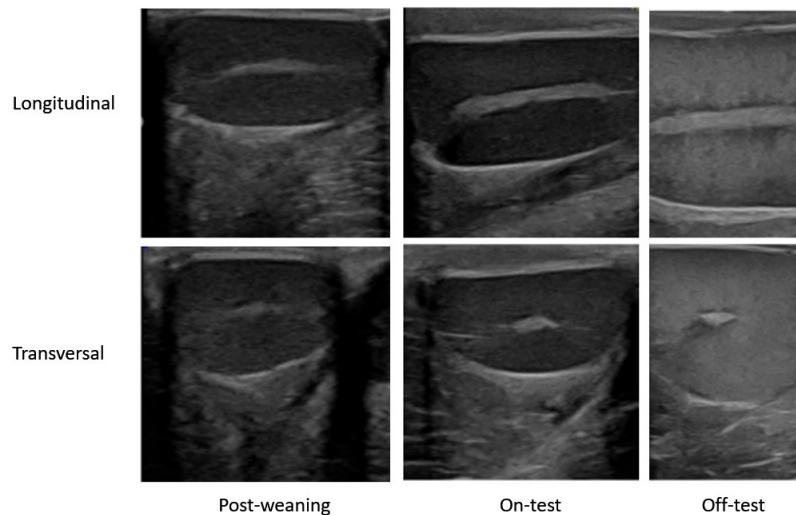


Table 6. Results of the grayscale analysis among different genetic lines over time.

Parameters	Landrace	Large White	Synthetic Terminal	Duroc
Post-weaning				
MAXGV	50.5 ( $\pm 0.2$ ) c	55.1 ( $\pm 0.3$ ) a	53.5 ( $\pm 0.2$ ) b	49.9 ( $\pm 0.2$ ) c
MINGV	4.9 ( $\pm 0.2$ ) b	6.5 ( $\pm 0.3$ ) a	6.6 ( $\pm 0.2$ ) a	4.8 ( $\pm 0.2$ ) b
MEANGV	26.8 ( $\pm 0.2$ ) b	29.0 ( $\pm 0.3$ ) a	29.3 ( $\pm 0.2$ ) a	26.2 ( $\pm 0.2$ ) b
DEVOFTHEMEAN	6.28 ( $\pm 0.04$ ) c	6.61 ( $\pm 0.05$ ) a	6.45 ( $\pm 0.04$ ) b	6.40 ( $\pm 0.04$ ) bc
HET	0.639 ( $\pm 0.003$ ) b	0.626 ( $\pm 0.004$ ) b	0.619 ( $\pm 0.004$ ) bc	0.662 ( $\pm 0.004$ ) a
NORMGSH	29.6 ( $\pm 0.2$ ) c	31.1 ( $\pm 0.2$ ) a	30.3 ( $\pm 0.2$ ) b	30.1 ( $\pm 0.2$ ) bc
AUC	0.98 ( $\pm 0.0002$ ) bc	0.98 ( $\pm 0.0002$ ) c	0.98 ( $\pm 0.0002$ ) b	0.98 ( $\pm 0.0002$ ) a
MEANGRAD	7.20 ( $\pm 0.02$ ) b	7.28 ( $\pm 0.02$ ) a	7.30 ( $\pm 0.02$ ) a	7.28 ( $\pm 0.02$ ) a
On-test				
MAXGV	58.8 ( $\pm 0.3$ ) c	59.1 ( $\pm 0.4$ ) c	70.2 ( $\pm 0.2$ ) a	66.9 ( $\pm 0.2$ ) b
MINGV	16.1 ( $\pm 0.3$ ) c	16.5 ( $\pm 0.4$ ) c	25.2 ( $\pm 0.2$ ) a	23.6 ( $\pm 0.2$ ) b
MEANGV	38.2 ( $\pm 0.2$ ) c	38.6 ( $\pm 0.3$ ) c	50.1 ( $\pm 0.2$ ) a	47.3 ( $\pm 0.2$ ) b
DEVOFTHEMEAN	6.48 ( $\pm 0.05$ ) b	6.50 ( $\pm 0.06$ ) b	6.79 ( $\pm 0.04$ ) a	6.44 ( $\pm 0.04$ ) b
HET	0.546 ( $\pm 0.004$ ) a	0.545 ( $\pm 0.005$ ) a	0.450 ( $\pm 0.004$ ) b	0.453 ( $\pm 0.004$ ) b
NORMGSH	30.1 ( $\pm 0.2$ ) b	30.3 ( $\pm 0.3$ ) b	31.5 ( $\pm 0.2$ ) a	29.9 ( $\pm 0.2$ ) b
AUC	0.99 ( $\pm 0.0002$ ) ab	0.99 ( $\pm 0.0003$ ) a	0.99 ( $\pm 0.0002$ ) ab	0.99 ( $\pm 0.0002$ ) b
MEANGRAD	6.74 ( $\pm 0.02$ ) b	6.76 ( $\pm 0.03$ ) b	6.91 ( $\pm 0.02$ ) a	6.78 ( $\pm 0.02$ ) b
Off-test				
MAXGV	101.8 ( $\pm 0.3$ ) c	105.0 ( $\pm 0.4$ ) a	103.4 ( $\pm 0.3$ ) b	104.6 ( $\pm 0.3$ ) a
MINGV	52.3 ( $\pm 0.3$ ) a	53.6 ( $\pm 0.4$ ) a	52.8 ( $\pm 0.3$ ) a	52.4 ( $\pm 0.3$ ) a
MEANGV	79.4 ( $\pm 0.3$ ) c	82.1 ( $\pm 0.4$ ) a	80.8 ( $\pm 0.3$ ) b	81.5 ( $\pm 0.3$ ) ab
DEVOFTHEMEAN	7.01 ( $\pm 0.06$ ) b	7.21 ( $\pm 0.07$ ) ab	7.14 ( $\pm 0.05$ ) ab	7.28 ( $\pm 0.05$ ) a
HET	0.254 ( $\pm 0.005$ ) a	0.245 ( $\pm 0.006$ ) a	0.252 ( $\pm 0.004$ ) a	0.252 ( $\pm 0.004$ ) a
NORMGSH	32.3 ( $\pm 0.3$ ) b	33.3 ( $\pm 0.3$ ) ab	32.9 ( $\pm 0.2$ ) ab	33.4 ( $\pm 0.2$ ) a
AUC	0.98 ( $\pm 0.0003$ ) a	0.98 ( $\pm 0.0003$ ) a	0.98 ( $\pm 0.0002$ ) a	0.98 ( $\pm 0.0002$ ) a
MEANGRAD	6.76 ( $\pm 0.03$ ) b	7.09 ( $\pm 0.04$ ) a	6.95 ( $\pm 0.02$ ) c	7.17 ( $\pm 0.03$ ) a

MAXGV: maximum gray value; MINGV: minimum gray value; MEANGV: mean gray value; DEVOFTHEMEAN: standard deviation of MEANGV; HET: heterogeneity; NORMGSH: normalized grayscale histogram width at 5% level; AUC: area under the curve; MEANGRAD: mean gradient value. Different letters indicate significant differences between groups in a row ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test.

## Discussion

Understanding the kinetics of reproductive development is a key factor in the selection of elite boars. Evaluating postnatal growth differences among distinct genetic lines, particularly body weight, testicular biometrics, and ultrasonographic traits, proved valuable for refining recommendations in boar selection programs.

In this study, dam lines exhibited lower birth weights compared to sire lines, consistent with the findings of Resende et al. (2019), who measured piglets at seven days of age. Therefore, recording birth weights may offer valuable insights into future performance. Studies have shown that boars with higher birth weights tend to have superior semen parameters (Pietruszka et al. 2017; Sacramento et al. 2022). Auler et al. (2017) reported that boars weighing between 1.80 and 2.15 kg at birth had higher spermatid counts and daily sperm production. Similarly, Pietruszka et al. (2017) found that boars with birth weights between 1.35 and 1.92 kg exhibited greater semen volume, sperm concentration, and total sperm count, supporting the use of birth weight as a potential selection criterion for reproductive performance.

Resende et al. (2019) also evaluated boars at 21 and 105 days of age and reported that sire lines already exhibited superior postnatal growth even before weaning. However, in the present study, Duroc piglets had lower weaning weights, possibly due to the reduced maternal ability commonly observed in Duroc females. According to Ogawa et al. (2020), more accurate inferences regarding the impact of maternal genetic effects and the direct–maternal genetic correlation can be achieved with larger datasets, emphasizing the importance of extensive phenotypic records in such evaluations. Pietruszka et al. (2017) reported a weight range of 6.96 to 8.73 kg at 28 days of age, while in the present study, piglets weighed between 7.04 and 7.61 kg at approximately 30 days. Schulze et al. (2020) reported that the average weight of Pietrain boars at 100 and 170 days of age was 59.8 kg and 122.9 kg, respectively. In the present study, Synthetic Terminal boars were found to have the highest weights at approximately 75 and 135 days of age, averaging 37.7 kg and 107.8 kg, respectively. In comparison, Jacyno et al. (2015), studying crossbred boars, reported a body weight of 110.5 kg at 180 days of age, which is consistent with the findings of Pietruszka et al. (2017).

At the end of the performance test, Schulze et al. (2020) reported a backfat thickness of 5.8 mm (170 days) and a muscle depth of 91.6 mm, while Jacyno et al. (2015) reported a backfat thickness of 9.59 mm (180 days). In the present study, at approximately 135 days of age, boars

exhibited variations in backfat thickness and muscle depth that were consistent with their genetic background. Backfat thickness ranged from 7.17 to 8.30 mm, with sire lines presenting lower values and dam lines higher values. In contrast, muscle depth was greater in sire lines and lower in dam lines, reflecting the divergent selection pressures for leanness and maternal traits applied to these genetic groups.

In a Polish Synthetic Line, Pietruszka et al. (2017) reported an average daily gain (ADG) ranging from 216.4 to 266.5 g between 1 and 28 days of age. In contrast, the present study observed lower ADG values, ranging from 182 to 202 g between 1 and 30 days of age in the purebred lines. Large White and Landrace piglets exhibited the highest ADWG during the farrowing phase. This performance is thought to be influenced by the milk production of the maternal lines during this period. In the nursery phase, Synthetic Terminal boars showed the highest ADWG. During the growth phase, sire lines outperformed dam lines in terms of ADWG, as well as total ADWG. The ADWG of Pietrain boars during the test period was 1.008 kg/day, as reported by Schulze et al. (2020), which is higher than the ADWG observed in this study, ranging from 0.686 to 0.799 kg/day. However, the boars in this study were younger than those in the Pietrain trial. Similarly, Jacyno et al. (2015) reported an ADG of 0.763 kg/day for boars between 70 and 180 days of age.

Bertani et al. 2002 concluded that the number of sperm cells in the testicular tissue of young boars is influenced by their breed and age, but not by the level of their average growth rate. In terms of testicular biometry, Schulze et al. (2020) evaluated the age-related ratio ( $r$ ) between testicular length and width, reporting values of 1.79 for on-test boars and 1.73 for off-test boars. In the present study, these ratios were closer to 1 during the post-weaning and on-test periods and increased to approximately 1.4–1.5 at off-test. Conversely, Resende et al. (2019) found that length and width were higher in the sire lines compared to dam lines at seven, 14 and 105 days-old.

The testicular volume at the on-test stage was 22.2 cm<sup>3</sup> for the left testis and 23.1 cm<sup>3</sup> for the right testis. Left and right testes at the on-test stage were similar in volume Schulze et al. (2020) same as in this study in each genetic line. An increase in paired testicular volume was observed from the post-weaning phase to the off-test stage. Over a shorter interval, Schulze et al. (2020) reported a 7.3-fold increase in testicular volume in boars by the off-test period. This underscores the importance of the postnatal and peripubertal periods for testicular development and reinforces the need to study reproductive kinetics.

Resende et al. (2019) demonstrated that body weight and testicular measurements during the pre-weaning period significantly impact sperm production and sexual precocity, with body weight and testis size being positively correlated with sperm concentration and negatively correlated with age at approval. In the present study, we also observed a consistent and significant positive correlation between body weight and testicular volume. According to Rathje et al. (1995) and, Huang and Johnson (1996) selecting for greater predicted paired testis weight and larger testis size can enhance the reproductive capacity of boars used in artificial insemination programs by increasing daily sperm production across all ages and improving sperm reserves in the cauda epididymis of young boars. Given that testicular size is a highly heritable trait (Sanglard et al., 2019), phenotypic assessment of testicular dimensions in sires can serve as a valuable tool for selecting breeding animals and potentially improving female reproductive performance. Furthermore, these findings suggest the possibility of indirect early selection for female traits through boar evaluation (Sanglard et al., 2019). In this context, ultrasound emerges as a key technology for accurately assessing testicular volume in boars.

Regarding GSA parameters in ultrasound evaluation, Schulze et al. (2020) observed increases in MINGV, MAXGV, MEANGV, AUC, and MEANGRAD during the test period. In the present study, MINGV, MAXGV, and MEANGV also increased; however, no differences were found in AUC or MEANGRAD. This rise in GSA values indicates that the testicular tissue exhibited lighter gray levels. An increase in macroscopically assessed echogenicity during puberty in a greater proportion of pixels with higher gray values (Chandolia et al. 1997; Brito et al. 2012; Pozor et al. 2017).

Quantitative echotextural analysis in prepubescent male animals—including bull calves, ram lambs, and foals—has consistently shown an overall increase in testicular echogenicity with age (Evans et al., 1996; Chandolia et al., 1997; Aravindakshan et al., 2000; Brito et al., 2012; Pozor et al., 2017). Specifically, Pozor et al. (2017) reported that MEANGV and DEVOFTHEMEAN increased during the first year of life in stallions, in parallel with the development of seminiferous tubules. Similarly, Brito et al. (2012) observed increased echogenicity in bulls between 4 and 18 months of age, associated with sexual development. This pattern was also evident in the present study with boars, supporting the idea that testicular echogenicity progressively increases during the prepubertal and pubertal periods,

likely reflecting histological and functional maturation. Therefore, ultrasonography serves as a useful tool for the early detection of puberty, allowing for earlier selection of boars.

According to Brito et al. (2012), the increase in testicular echogenicity is likely associated with Sertoli cell differentiation, the formation of the blood-testis barrier, enlargement of seminiferous tubule diameter and lumen, a higher proportion of testicular parenchyma occupied by seminiferous tubules, and the rapid expansion of all germ cell populations leading to the onset of spermatogenesis. In this study, the sire lines exhibited higher echogenicity at the on-test stage, which may indicate earlier sexual development and precocity. Ford and Wise (2011) established that, within groups of boars of similar chronological age from 90 to 150 days of age, stage of pubertal development as defined by mean diameter of seminiferous tubules, was highly correlated with testicular weight and testicular diameter determined by ultrasonography. These findings highlight the need for further studies exploring the relationship between testicular histology and ultrasonographic features. Close monitoring of the peri-pubertal and pubertal periods is essential for predicting future fertility and detecting reproductive problems early.

Postnatal growth differs among genetic lines, underscoring the need for line-specific selection strategies. Body weight, ADWG, testicular volume, and biometry are key traits for identifying precocious and efficient boars. Ultrasonographic parameters are promising selection tools, but further studies are needed to validate their predictive value. Although a limitation of this study was the lack of ultrasound evaluations at all stages, our findings reveal novel changes in GSA parameters during testicular development, offering valuable insights for boar selection.

### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to Pig Improvement Company, particularly the Apex staff, for providing the facilities necessary to conduct this study and for their financial support of the project. We also acknowledge the support of the Brazilian funding agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), whose financial contributions were essential to the development of this research.

### **References**

ARAVINDAKSHAN, J. P. *et al.* Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology*, v. 54, n. 3, p. 339-354, 2000.

- AULER, P. A. *et al.* Testicular parameters and spermatogenesis in different birthweight boars. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 29, n. 9, p. 1720-1728, 2017.
- BERTANI, G. R. *et al.* Gonadal sperm reserve in purebred Landrace and Large White boars of high average daily gain. *Theriogenology*, v. 57, n. 2, p. 859–867, 2002. DOI: 10.1016/s0093-691x(01)00705-1.
- BRITO, L. F. *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. 69–76, 2012.
- CARTEE, R. E. *et al.* Ultrasonographic evaluation of normal boar testicles. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, p. 2543–2548, 1986.
- CHANDOLIA, R. K. *et al.* 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.
- 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, n. 6, p. 1011-1023, 2003.
- DYCK, M. K. *et al.* Biological markers of boar fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, suppl. 2, p. 55–58, 2011. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01837.x.
- EVANS, A. C. O. *et al.* Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology*, v. 46, n. 2, p. 345-357, 1996.
- 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, 2011.
- GIFFIN, J. L. *et al.* A study of morphological and haemodynamic determinants of testicular echotexture characteristics in the ram. *Experimental Biology and Medicine*, v. 234, p. 794–801, 2009. DOI: 10.3181/0812-RM-364.
- HENSEL, B. *et al.* Selection and direct biomarkers of reproductive capacity of breeding boars. *Animal Reproduction Science*, v. 269, p. 107490, 2024. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2024.107490.
- HUANG, Y. T.; JOHNSON, R. K. Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 750–760, 1996.
- JACYNO, E. *et al.* Phenotypic correlations of testes size with semen traits and the productive traits of young boars. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, n. 6, p. 926-930, 2015.
- MONTES-GARRIDO, R. *et al.* Application of ultrasound technique to evaluate the testicular function and its correlation to the sperm quality after different collection frequency in rams. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 1035036, 2022.

- OGAWA, S. *et al.* Maternal effect on body measurement and meat production traits in purebred Duroc pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 138, n. 2, p. 237-245, 2021.
- PASCHOAL, A. F. L. *et al.* Use of testicular tone and echogenicity in identifying boars with low sperm quality. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71, n. 4, p. 1277-1285, 2019.
- PIETRUSZKA, A. *et al.* Effects of birth weight and standardized litter size on growth performance of boars and subsequent reproductive performance. *South African Journal of Animal Science*, v. 47, n. 4, p. 471-477, 2017.
- PINHO, R. O. *et al.* The use of ultrasonography in the reproductive evaluation of boars. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, p. 393–400, 2018.
- POZOR, M. *et al.* Relationship between echotextural and histomorphometric characteristics of stallion testes. *Theriogenology*, v. 99, p. 134–145, 2017.
- POZOR, M. A. *et al.* Doppler indices of vascular impedance as indicators of testicular dysfunction in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 34, p. 38–39, 2014. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.10.021.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.
- RATHJE, T. A.; JOHNSON, R. K.; LUNSTRA, D. D. Sperm production in boars after nine generations of selection for increased weight of testis. *Journal of Animal Science*, v. 73, n. 8, p. 2177-2185, 1995.
- RESENDE, P. C. *et al.* Relationship between pre-pubertal biometrical measures and sperm parameters for the selection of high genetic merit pure and crossbred boars. *Theriogenology*, v. 127, p. 1-6, 2019.
- ROTHSCHILD, F. M.; RUVINSKY, A. *The genetics of the pig*. 2. ed. Wallingford: CAB International, 2011. 507 p.
- SACRAMENTO, R. C. R. *et al.* Birthweight leads to seminal and testicular morphofunctional commitment in sexually mature boars. *Theriogenology*, v. 189, p. 237-245, 2022.
- SANGLARD, L. P. *et al.* Relationship between the testis size in male pigs and reproductive traits in their progeny. *Livestock Science*, v. 228, p. 72-75, 2019.
- SCHULZE, M. *et al.* Relationship between pubertal testicular ultrasonographic evaluation and future reproductive performance potential in Piétrain boars. *Theriogenology*, v. 158, p. 58-65, 2020.
- WHITTEMORE, C. T.; KYRIAZAKIS, I. *Whittemore's science and practice of pig production*. Oxford: John Wiley & Sons, 2008.
- YANG, L. *et al.* Mapping and functional characterization of structural variation in 1060 pig genomes. *Genome Biology*, v. 25, n. 1, p. 116, 2024.
- ZELLI, R. *et al.* Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Research in Veterinary Science*, v. 95, p. 632–637, 2013. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.04.023.

## **5. Artigo 2**

Manuscrito a ser submetido.

### **5.1. Ultrasonographic and histological assessment of testicular development for predicting reproductive performance in high-genetic-merit boars**

## Ultrasonographic and histological assessment of testicular development for predicting reproductive performance in high-genetic-merit boars

L. P. Moreira<sup>a</sup>, M. Kleve-Feld<sup>b</sup>, A.L.N. Alvarenga Dias<sup>c</sup>, M. Jobin<sup>b</sup>, E. Psota<sup>b</sup>, R.R. Wenceslau<sup>d</sup>,  
A. L. Caldeira-Brant<sup>a</sup>, F.R.C.L. Almeida<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Department of Morphology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Brazil*

<sup>b</sup> *Technical Services, Pig Improvement Company, United States*

<sup>c</sup> *Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlandia, Brazil*

<sup>d</sup> *Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Brazil*

### Abstract

Boars play a pivotal role in genetic improvement, as their ability to produce high-quality semen is essential for gene dissemination. Sperm production is directly influenced by the number of Sertoli and germ cells within the seminiferous tubules. Establishing associations between ultrasound parameters and histomorphometrical data enhances selection criteria and improves reproductive efficiency in boar studs. This study aimed to evaluate the association between grayscale analysis (GSA) parameters and histological characteristics of the testicular parenchyma across distinct genetic lines. Testicular composition and semen quality were compared, and statistical models were developed to predict reproductive performance based on GSA. Boars from dam (Landrace - LD and Large White - LW) and sire lines (Duroc - DU and Synthetic Terminal - ST) were weighed at birth. Body weight, testicular ultrasonography, and GSA were performed post-weaning, at on-test, and off-test. Boars were allocated to two subgroups: histology (n = 39) and semen evaluation (n = 182). In the histology subgroup, boars were slaughtered for testis collection and histological analysis (seminiferous tubule diameter, area, and volumetric proportions). In the semen data subgroup, boars were transferred to a commercial boar stud, where semen analyses were conducted until they reached 370 days of age. Data were analyzed using descriptive statistics, and linear regression for associations between histological and ultrasonographic parameters. Binomial logistic regression was used to assess the predictive value of GSA variables for classifying boars as productive or non-productive. In the histology subgroup, ST boars had the highest body weight, while LD boars showed the greatest testicular weight at slaughter ( $P < 0.05$ ). In the semen data subgroup,

birth weight and body weight at on-test and off-test were significantly higher in ST ( $P < 0.05$ ). LD boars had a greater proportion of tubular compartment and seminiferous epithelium, while DU boars presented more interstitial tissue ( $P < 0.05$ ). Although no consistent associations were found across the entire population between histological and ultrasonographic parameters, several line-specific correlations emerged. LD boars showed a positive association between tubular compartment and MAXGV and MEANGV ( $R^2 > 0.66$ ), while ST exhibited negative associations with MEANGRAD ( $R^2 = 0.54$ ). The seminiferous tubule area was moderately to strongly associated with GSA variables, particularly in LD and ST. Testicular volume (right testis) showed positive correlations with seminiferous tubule area across and within lines ( $P < 0.05$ ). Logistic regression models revealed that GSA parameters such as HET, MEANGV, MINGV, and DEVOFTHEMEAN were predictive of boar productivity at various developmental stages. Notably, higher HET and lower MEANGV were associated with productive animals, while increased DEVOFTHEMEAN and MEANGV were linked to non-productivity ( $P < 0.05$ ). Semen quality also differed among lines: DU had higher ejaculate volume and motility, whereas ST showed the lowest total sperm count ( $P < 0.05$ ). In summary, associations between grayscale ultrasound parameters and testicular histology varied among genetic lines, with 135 days old emerging as the most informative stage for predicting semen productivity. These findings highlight the potential of GSA as a non-invasive tool for early selection, although further studies with larger sample sizes are needed to validate its application across different genetic backgrounds.

**Keywords:** Boar reproduction, Seminiferous tubule, Semen production, Puberty, Gray Scale Analysis (GSA)

### Highlights

- Genetic line influences the histological characteristics of testicular parenchyma
- Ultrasound findings correlate with testicular histological features in Landrace, Duroc and Synthetic Terminal boars
- Reproductive competence can be predicted through testicular ultrasonography at 135 days-old
- Ultrasound imaging can be associated with semen productivity

## Introduction

Boars play a critical role in genetic improvement programs, particularly in swine production systems that rely on artificial insemination. Performance testing, divided into on-test and off-test phases, is routinely used by breeding companies to evaluate growth, carcass, and reproductive traits, depending on the genetic goals of each line (Whittemore and Kyriazakis, 2008; Rothschild and Ruvinsky, 2011; Schulze *et al.*, 2020; Hensel *et al.*, 2024; Moreira *et al.*, 2025 – Artigo 1). The efficiency of this selection process depends on its ability to capture genotype-specific characteristics. As highlighted by Resende *et al.* (2019), tailoring selection criteria to each genetic profile can enhance reproductive performance and reduce production costs.

In parallel, assessments of structural soundness, particularly of the locomotor system, are carried out with increasing precision using modern technologies (Bakoev *et al.* 2020; Hensel *et al.* 2024). However, evaluation of the reproductive system remains largely limited to external genital inspection and detection of testicular asymmetry. While traditional methods like scrotal circumference measurement and genital palpation are commonly used in rams (Montes-Garrido *et al.* 2022), they are not applicable to boars because of the anatomical positioning of their testes. Given the importance of testicular function for reproductive performance, there is potential to enhance selection accuracy by incorporating ultrasonographic assessment of the testicular parenchyma into routine evaluations.

To better understand postnatal testicular development and its histological dynamics, Zheng *et al.* (2022) conducted a detailed evaluation of Duroc testes at nine developmental stages, from birth to puberty. The authors observed a progressive increase in seminiferous cord and tubule diameter starting at day 30, although the rate of growth varied across ages. Immunohistochemical analysis further revealed the presence of immature Sertoli cells between 7 and 90 days of age, which were no longer detectable after 110 days — indicating that Sertoli cell maturation was complete by this time. Previous studies in pre- and peripubertal bulls and rams have shown that changes in testicular ultrasonographic patterns are closely associated with histomorphological features of the seminiferous tubules, particularly the initiation and progression of spermatogenesis (Evans *et al.*, 1996; Chandolia *et al.*, 1997a,b; Arteaga *et al.*, 2005; Aravindakshan, 2000; Giffin *et al.*, 2009). During this stage, testicular development is marked by a significant increase in cellular number and diversity

within the seminiferous epithelium (Malmgren *et al.*, 1996; Giffin *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2022), reinforcing the need for histological characterization and the use of non-invasive tools—such as ultrasonography—for assessing parenchymal dynamics.

Schulze *et al.* (2020) provides information suggesting a prognosis on the future reproductive performance potential in Pietrain boars at the time of puberty by means of GSA of sonographic testicular sectional images. B-mode ultrasonography has been validated in several domestic species as a reliable tool for estimating testicular volume and assessing parenchymal echotexture (Clark *et al.*, 2003; Giffin *et al.*, 2009, 2014; Ford and Wise, 2011; Brito *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 2020; Pozor *et al.*, 2017; Montes-Garrido *et al.*, 2022). Echotextural variations have been linked to underlying histomorphological differences in the testicular tissue of rams and stallions, supporting the use of computer-assisted pixel analysis of ultrasonograms as a non-invasive method to evaluate testicular structure and function.

Paschoal *et al.* (2019) demonstrated that testicular echogenicity, when combined with tone evaluation, enhances the detection of testicular alterations related to sperm quality in adults' boars. These findings underscore the relevance of testicular ultrasonography as a practical tool for improving the early prediction of reproductive potential.

The objective of this study is to investigate the associations between GSA parameters, the histological composition of the testicular parenchyma, and histomorphometrical measurements across different genetic lines. Additionally, to compare the testicular composition and semen quality, and to develop statistical models to predict male reproductive productivity based on GSA parameters.

## **Material and methods**

### *Study design and animals*

The study was conducted at a PIC nucleus farm located in the Midwest region of USA. All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Minas Gerais (CEUA/UFMG, Protocol No. 43/2023). Boars from four purebred lines (Landrace - LD, Large White - LW, Synthetic Terminal - ST and Duroc - DU; Pig Improvement Company, Hendersonville, USA) were selected and monitored from birth until the selection process. Afterward, the boars were assigned to one of two subgroups: histology and semen production. For the histology group, ten boars from each genetic line were selected and sent to a slaughterhouse, where their testis were

collected, weighted and sampled. A tissue sample from the right testis of each boar was preserved for histological analysis. For the semen production data, 182 boars were transferred to a commercial boar stud, where semen production was monitored until they reached 370 days of age.

#### *Housing and management*

All male piglets born on the nucleus farm over a 4-week period were weighed and ear-tagged. At three weeks of age, the piglets were moved to the nursery and housed by genetic line in suspended pens (0.25 m<sup>2</sup>/animal) with plastic flooring, where they remained until the on-test phase. Subsequently, piglets were weighed, and testicular ultrasonography was performed. At On-test, boars were moved to the grower/finisher room, housed in pens (0.75 m<sup>2</sup>/animal), weighed, scanned by ultrasound, and evaluated genetically and clinically. Boars with low genetic index or morphological issues (e.g., locomotor problems, hernia) were culled. At Off-test, boars were weighed, testicles scanned via ultrasound and subjected to genetic and clinical evaluations. All animals were housed in a temperature-controlled facility, with *ad libitum* access to water and fed a standard corn–soybean diet formulated for breeding age, containing 16.5% crude protein, 3.6% crude fat, and 4.5% crude fiber.

#### *Histology subgroup*

Ten boars each genetic line that failed in the selection process due to minor locomotor defects (e.g., buck-kneed, sickle-hocked or claws uneven) or teat abnormalities (e.g., inadequate number, blind or inverted teats) were selected for histological analysis. Only boars with similar birth weight were included in this group (Table 2). As a result, one Large White was excluded from the analysis. The average ages at different growth stages were as follows (Mean ± SD): post-weaning, 30.5 ± 1.6 days; on-test, 76.1 ± 2.5 days; off-test, 134.7 ± 1.8 days; and euthanasia, 144.92 ± 2.09 days.

#### *Semen Production subgroup*

From the selected boars, 182 were transferred to different commercial boar studs (LD, n = 32; LW, n = 40; ST, n = 69; DU, n = 41). The average ages at different growth stages were as follows (Mean ± SD): post-weaning, 29.9 ± 2.3 days; on-test, 75.3 ± 2.5 days; and off-test, 134.6 ± 2.2 days. After the off-test phase, boars were allocated in individual crates (1.75m<sup>2</sup>) equipped with partially slatted floors, automatic feeders and nipple drinkers. At boar studs, boars were fed 3 kg/day, with adjustments based on body condition score and age.

#### *Body weight*

Body weights of individual boars were recorded at birth, post-weaning, on-test, and off-test.

#### *B-mode ultrasound*

Boars underwent testicular ultrasonography at post-weaning, on-test, and off-test stages. were conducted following the protocol described by Moreira *et al.* (2025 - Artigo 1). In brief, four images of the testicular parenchyma – two transversal and two longitudinal – from the left and right testes, were captured using an Exapad Mini ultrasound device (IMV Imaging, Angoulême, France), and a gray-scale analysis (GSA) was performed. Testes were examined using B-mode ultrasound, 10 MHz frequency and linear transducer. Ultrasound measurements were obtained while manually stabilizing the testes, following the technique described by Clark *et al.* (2003). Two boars sent to the boar studs were excluded from the semen production analysis due to poor-quality ultrasonographic images.

#### *Calculation of the testicular grayscale parameters*

Grayscale analysis was conducted using MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) and Python-based software package (Python Software Foundation, Delaware, USA), while the remaining procedures followed the methodology described by Moreira *et al.* (2025 – Article 1). Four images per boar and age group were analyzed. The region of interest (ROI), measuring approximately  $18,000 \pm 100$  pixels, was consistently placed adjacent to the mediastinum testis, near the linear transducer. The following one- and two-dimensional grayscale analysis (GSA) parameters were evaluated: maximum gray value (MAXGV), minimum gray value (MINGV), mean gray value (MEANGV), standard deviation of the mean gray value (DEVOFTHEMEAN), heterogeneity (HET), normalized grayscale histogram width at the 5% level (NORMGSH), area under the curve (AUC), and mean gradient value (GRAD).

#### *Histological Processing*

Thirty-nine boars were selected for euthanasia, and testicular samples (2.0 mm thickness) were collected from the right testis using a razor blade. All samples were taken from the central region of the testis parenchyma, near the mediastinum, precisely at the site where the ultrasound probe had been positioned. The tissue samples were fixed by immersion in a 5% glutaraldehyde solution prepared in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.3) for 24 hours at 8°C. Following fixation, samples were dehydrated through a graded ethanol series, embedded in glycol methacrylate resin (Histo-resin®, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), sectioned at a thickness of 3 µm, and stained with toluidine blue and sodium borate for further analysis

(Chiarini-Garcia *et al.*, 2011). Photomicrographs were captured using a Q-Colour 3 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan) attached to a BX-51 Olympus microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

#### *Sertoli cells per seminiferous tubule*

The number of Sertoli cell nucleoli per seminiferous tubule cross-section was determined by analyzing ten randomly selected, round or nearly round cross-sections per testis. Evaluations were performed at 1000× magnification. The estimated coefficient of variation (CV) for this measurement was 24.39%.

#### *Seminiferous tubule diameter and area*

The mean diameter and area of the seminiferous tubules were measured using ImageJ software (IJ 1.46r, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Thirty round seminiferous tubules cross-sections were randomly selected, and measurements were performed at a final magnification of 400×.

#### *Volumetric proportion of the testicular parenchyma*

The volume densities (%) of the testicular structural components (Figure 1), including the tubular compartment (seminiferous epithelium composed of germ and Sertoli cells, lumen, and peritubular myoid cells) and the interstitial compartment (Leydig cells, blood vessels, lymphatic vessels, and connective tissue), as well as artifacts, were estimated through image analysis using (IJ 1.46r, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Photomicrographs were acquired at a final magnification 400×. For each animal, fifteen randomly selected fields were analyzed, totaling 9,570 points across the testicular parenchyma. The volumetric proportion of each structure was calculated by dividing the number of points overlaying the specific structure by the total number of points counted.

#### *Semen production analysis*

No reproductive selection criteria were applied beyond the presence of normal external genitalia for the 182 boars selected at off-test. Following selection, the boars were made available for shipment to commercial boar studs worldwide. Semen collection data were recorded in the Pictraq® database (Pig Improvement Company, Hendersonville, USA) across all boar studs. Semen parameters, including volume, concentration, motility, and morphology, were analyzed using Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) at each boar stud. The mean age of the boars between the first and last ejaculate collected was 302.29 days, ranging from 209 to 370 days. A total of 526 ejaculates from LD, 488 from LW, 992 from ST, and 503 from

DU boars were analyzed. Boars were classified as either ‘productive’ or ‘non-productive’ based on the semen quality guidelines outlined in the *Boar Stud Management Manual* (PIC, 2023), as well as the criteria established by Waberski *et al.* (2019) and Schulze *et al.* (2014) (Table 1). After classification, 162 boars were considered productive and 18 non-productive. The distribution across genetic lines was as follows: LD (30/2), LW (34/6), ST (64/4), and DU (34/6), with values representing the number of productive/non-productive animals, respectively. All semen collections were classified according to the criteria described in Table 1. A total of 18 boars were classified as non-productive; of these, 9 exhibited 100% of ejaculates falling within the non-productive criteria, while the remaining 9 showed more than 60% of ejaculates classified as non-productive. Among the 162 boars categorized as productive, 94 had 100% of ejaculates meeting the productive criteria, 29 exceeded 90%, and 39 surpassed 75% of collections classified as productive.

Table 1. Semen parameters and cut-off values for boar classification in “productive” and “non-productive”.

Sperm characteristics per ejaculate	Productive	Non-productive
Total sperm number, 10 <sup>9</sup>	≥15	≤14,9
Volume, mL	≥100	≤99,9
Motility, %	≥70	≤69,9
Total morphological defects, %	≤30	≥30,1

Adapted from Schulze *et al.* (2014), Waberski *et al.* (2019), and PIC (2023).

### *Statistical analysis*

The study was designed as an observational, longitudinal cohort study. Descriptive statistics were calculated to summarize the data, including means and standard deviations (SD) for continuous variables. Continuous variables were tested for normality and homogeneity. The covariate structure that best fitted each end point was used. Comparisons between genetic lines were performed using one-way ANOVA, with genetic line as the main fixed factor and age or weight included as covariates when applicable. The significance level was set as 0.05, and results were expressed as mean ± standard error (SE) unless stated otherwise. Post hoc tests were conducted using Tukey’s HSD test when appropriate. Variables that did not follow a normal distribution were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis’s test, followed

by Dunn's post hoc test when applicable. To assess the linear association between histological and ultrasonographic parameters, a simple linear regression model was fitted.

A binomial logistic regression model was used to evaluate the association between productivity status ("productive" vs. "non-productive") and selected GSA parameters. For the initial model, all grayscale analysis (GSA) parameters were included. The final model was chosen based on the lowest Akaike Information Criterion (AIC) value. To estimate the likelihood of a boar being classified as "non-productive" based on a given GSA parameter, the odds ratio (OR) was calculated. The significance and precision of the odds ratio were assessed using Fisher's exact test, with a 95% confidence interval (CI). Statistical analyses were performed using R version 4.4.2 (2024) (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## **Results**

### *Body and testicular weight*

The birth weight of boars selected for histological analysis was standardized across genetic lines to ensure similarity. At post-weaning and on-test stages, no significant differences in body weight were observed among the genetic lines. However, by off-test, body weight differed significantly among all genetic lines ( $P < 0.05$ ; Table 2). Regarding testicular weight at slaughter, Landrace boars exhibited the highest values, while Synthetic Terminal boars showed the lowest ( $P < 0.05$ ).

Table 2. Body and testicular weights across genetic lines and developmental stages in boars selected for histological evaluation.

Weight Parameters	Landrace		Large White		Synthetic Terminal		Duroc	
	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n
Birth, kg	1.67 ( $\pm$ 0.06) a	10	1.50 ( $\pm$ 0.06) a	9	1.70 ( $\pm$ 0.06) a	10	1.60 ( $\pm$ 0.06) a	10
Post-weaning, kg	7.95 ( $\pm$ 0.41) a	10	8.61 ( $\pm$ 0.43) a	9	7.46 ( $\pm$ 0.41) a	10	7.33 ( $\pm$ 0.41) a	10
On-test, kg	40.20 ( $\pm$ 1.39) a	10	36.28 ( $\pm$ 1.46) a	9	38.70 ( $\pm$ 1.39) a	10	35.70 ( $\pm$ 1.39) a	10
Off-test, kg	102.95 ( $\pm$ 2.28) bc	10	95.67 ( $\pm$ 2.40) c	9	111.95 ( $\pm$ 2.28) a	10	106.80 ( $\pm$ 2.28) ab	10
Left testicle, g	244.7 ( $\pm$ 14.04) a	10	214.0 ( $\pm$ 15.70) ab	8	182.2 ( $\pm$ 14.04) b	10	208.9 ( $\pm$ 14.04) ab	10
Right testicle, g	239.8 ( $\pm$ 13.40) a	10	213.7 ( $\pm$ 14.12) a	9	196.3 ( $\pm$ 13.40) a	10	232.5 ( $\pm$ 13.40) a	10
Paired testicles, g	484.5 ( $\pm$ 27.21) a	10	429.4 ( $\pm$ 30.42) ab	8	378.5 ( $\pm$ 27.21) b	10	441.4 ( $\pm$ 27.21) ab	10

Different letters indicate significant differences between groups in a row ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test.

For semen production data, Synthetic Terminal boars had a higher birth weight ( $P < 0.05$ ; Table 3) compared to the other dam lines. At post-weaning, body weight was similar across all lines. Though, at both on-test and off-test stages, Synthetic Terminal boars remained significantly heavier ( $P < 0.05$ ; Table 3).

Table 3. Body weight by genetic line and time points in the semen production subgroup.

Weight	Landrace		Large White		Synthetic Terminal		Duroc	
	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n	Mean ( $\pm$ SE)	n
Birth, kg	1.51 ( $\pm$ 0.06) b	32	1.43 ( $\pm$ 0.05) b	40	1.70 ( $\pm$ 0.04) a	69	1.58 ( $\pm$ 0.05) ab	41
Post-weaning, kg	7.56 ( $\pm$ 0.21) a	32	7.61 ( $\pm$ 0.19) a	40	7.27 ( $\pm$ 0.14) a	66	7.40 ( $\pm$ 0.18) a	41
On-test, kg	33.64 ( $\pm$ 0.81) b	32	34.79 ( $\pm$ 0.72) ab	40	36.81 ( $\pm$ 0.55) a	69	35.04 ( $\pm$ 0.72) ab	41
Off-test, kg	94.56 ( $\pm$ 1.15) c	32	92.89 ( $\pm$ 1.03) c	40	105.97 ( $\pm$ 0.79) a	69	102.06 ( $\pm$ 1.02) b	41

Different letters indicate significant differences between groups in a row ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test.

#### *Histological analysis*

According to Table 4, Landrace boars exhibited a significantly higher percentage of tubular compartment than Duroc boars ( $P < 0.05$ ), while Duroc boars showed a greater proportion of interstitial compartment. Landrace boars also exhibited higher percentages of seminiferous

epithelium (germ and Sertoli cells) and lumen than Duroc boars ( $P < 0.05$ ). The number of Sertoli cells per tubule, seminiferous tubule area, and average diameter were similar among the genetic lines evaluated (Table 4).

Table 4. Results for histological parameters of the testicular parenchyma among different genetic lines.

Parameters	Landrace n=10	Large White n=9	Synthetic Terminal n=10	Duroc n=10
Tubular compartment, %	69.11 ( $\pm 2.74$ ) a	64.13 ( $\pm 2.89$ ) ab	65.45 ( $\pm 2.74$ ) ab	57.17 ( $\pm 2.74$ ) b
Germ and Sertoli cell, %	56.27 ( $\pm 2.35$ ) a	52.89 ( $\pm 2.47$ ) ab	52.60 ( $\pm 2.35$ ) ab	46.71 ( $\pm 2.35$ ) b
Lumen, %*	1.81 ( $\pm 0.44$ ) a	1.45 ( $\pm 0.46$ ) ab	1.21 ( $\pm 0.44$ ) ab	0.45 ( $\pm 0.44$ ) b
Peritubular myoid cell, %	11.03 ( $\pm 0.54$ ) a	9.78 ( $\pm 0.57$ ) a	11.65 ( $\pm 0.54$ ) a	10.01 ( $\pm 0.54$ ) a
Interstitial compartment, %	30.18 ( $\pm 2.63$ ) b	35.26 ( $\pm 2.78$ ) ab	33.95 ( $\pm 2.63$ ) ab	41.72 ( $\pm 2.63$ ) a
Leydig cell, %	15.57 ( $\pm 2.04$ ) a	18.10 ( $\pm 2.15$ ) a	14.69 ( $\pm 2.04$ ) a	21.59 ( $\pm 2.04$ ) a
Connective tissue, %	12.01 ( $\pm 2.79$ ) a	13.21 ( $\pm 2.94$ ) a	16.04 ( $\pm 2.79$ ) a	17.62 ( $\pm 2.79$ ) a
Lymphatic vessel, %	0.30 ( $\pm 0.15$ ) a	0.69 ( $\pm 0.16$ ) a	0.41 ( $\pm 0.15$ ) a	0.16 ( $\pm 0.15$ ) a
Blood vessel, %	2.29 ( $\pm 0.26$ ) a	3.26 ( $\pm 0.28$ ) a	2.82 ( $\pm 0.26$ ) a	2.34 ( $\pm 0.26$ ) a
Sertoli cells per seminiferous tubule, n	13.69 ( $\pm 0.52$ ) a	12.11 ( $\pm 0.54$ ) a	12.47 ( $\pm 0.52$ ) a	12.51 ( $\pm 0.52$ ) a
Seminiferous tubule area, $\mu\text{m}^2$	32421 ( $\pm 1367$ ) a	31854 ( $\pm 1441$ ) a	31091 ( $\pm 1367$ ) a	31021 ( $\pm 1367$ ) a
Seminiferous tubule diameter, $\mu\text{m}$	200.68 ( $\pm 4.26$ ) a	198.52 ( $\pm 4.49$ ) a	196.83 ( $\pm 4.26$ ) a	194.75 ( $\pm 4.26$ ) a

Different letters indicate significant differences between rows ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test or \*Dunn test.

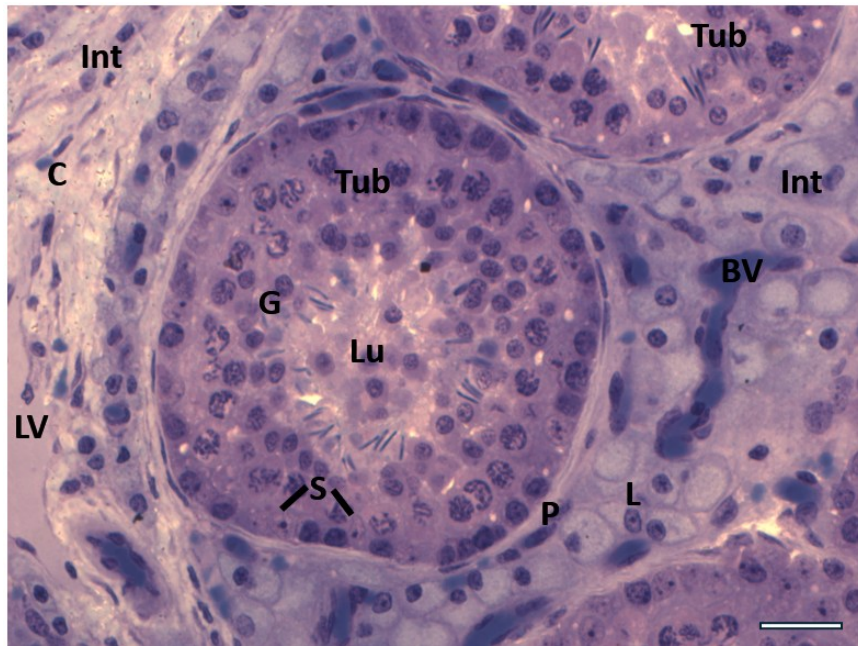


Figure 1. Testicular parenchyma photomicrograph. Tub: Tubular compartment; Int: Interstitial compartment; S: Sertoli cell; L: Leydig cell; G: Germinative cells at different stages of differentiation; P: Peritubular myoid cell C: Connective tissue; BV: Blood vessel; LV: lymphatic vessel; Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

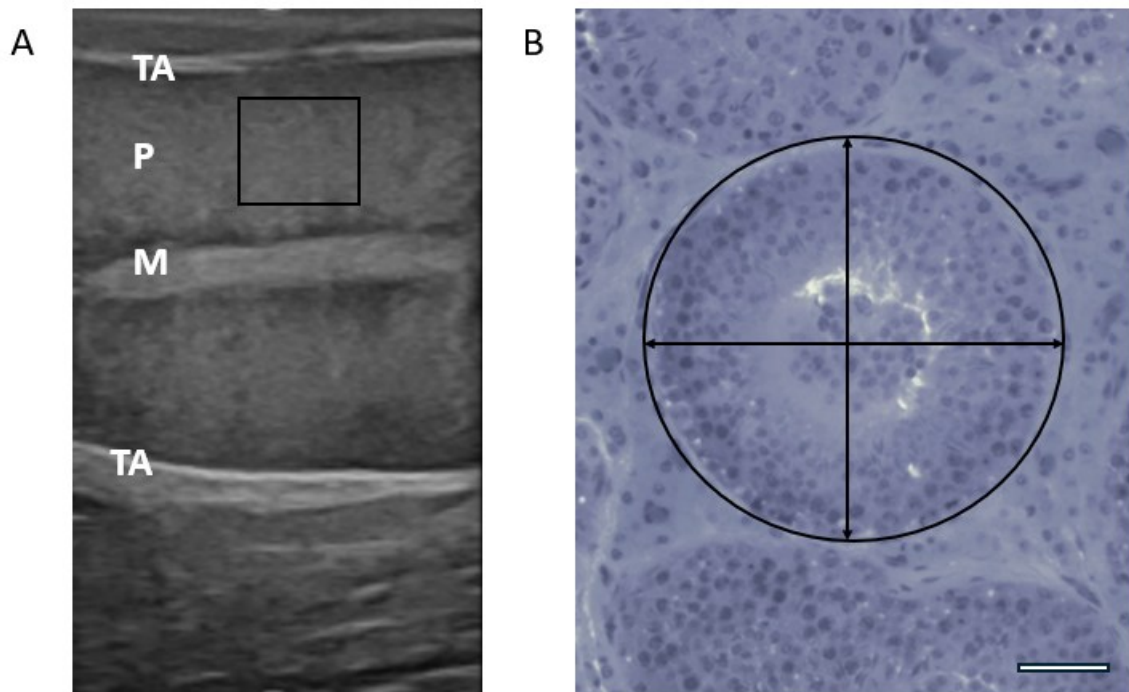


Figure 2. A. Longitudinal B-mode ultrasonographic image of a boar at the off-test stage. Anatomical landmarks: M – mediastinum; P – testicular parenchyma; TA – tunica albuginea. The black square indicates the region of interest (ROI) selected for grayscale analysis. B. Photomicrograph of testicular parenchyma. The black circle delineates the measured area of

a seminiferous tubule, and the arrows indicate the two perpendicular axes used to calculate the mean tubule diameter. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

Figures 1 and 2 support the interpretation of the results by illustrating the associations between testicular histology and grayscale ultrasonographic parameters. All histology–GSA regression models were based on transverse ultrasound images of the right testis, as the histological samples were collected from the same anatomical location.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

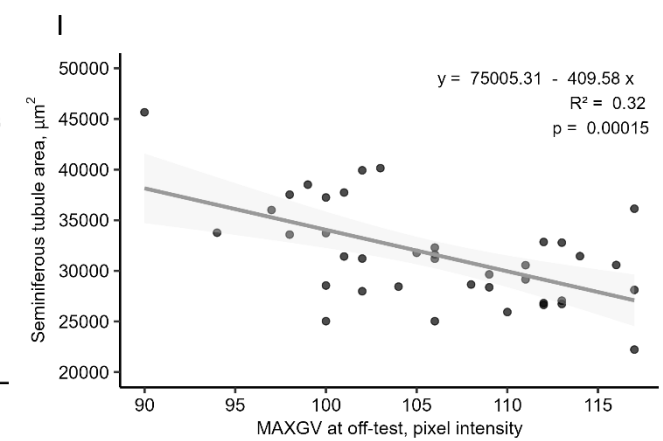
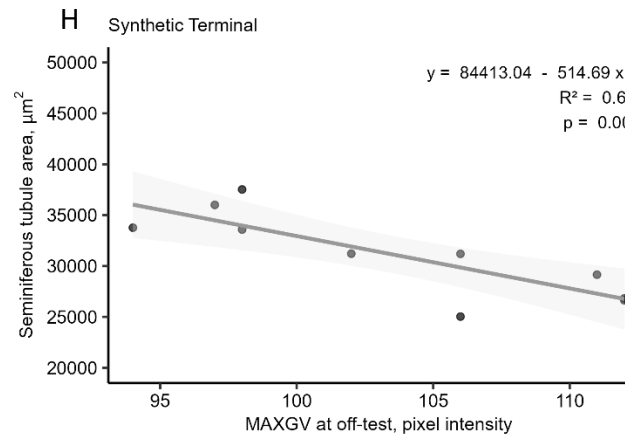
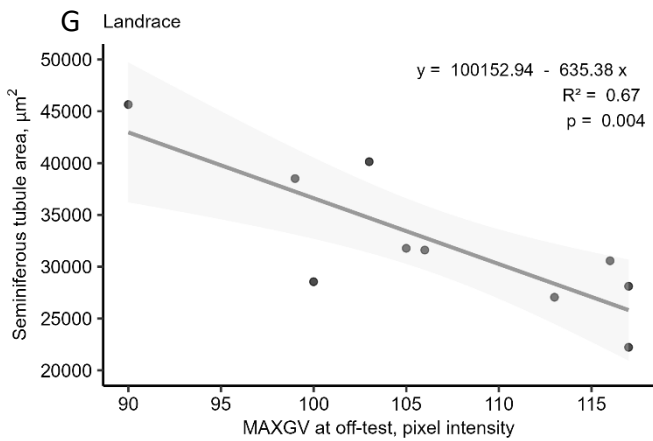
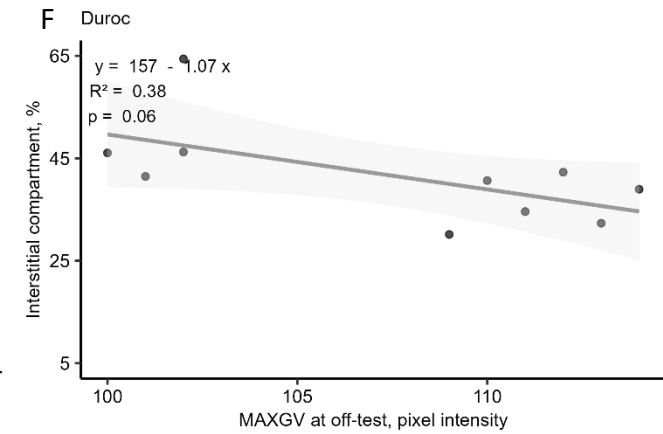
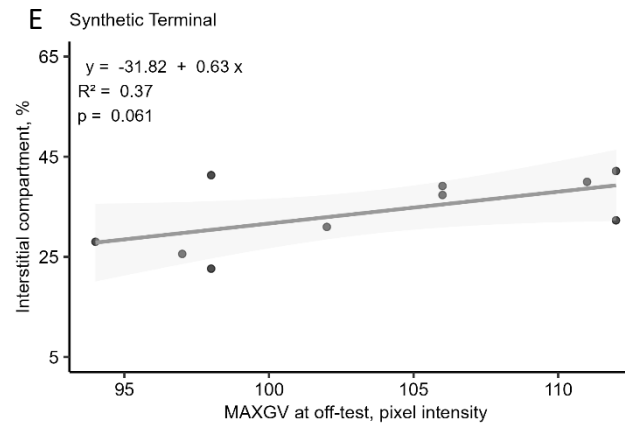
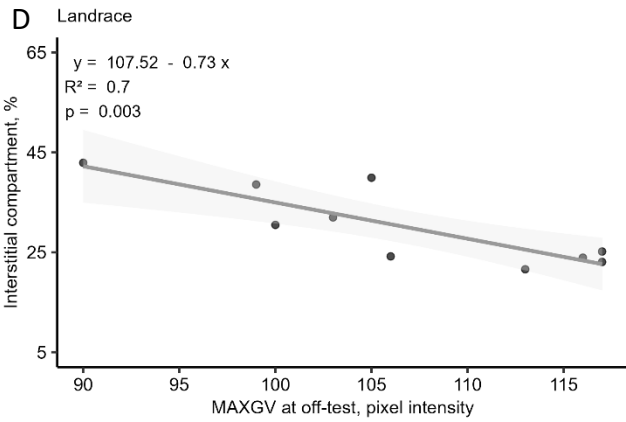
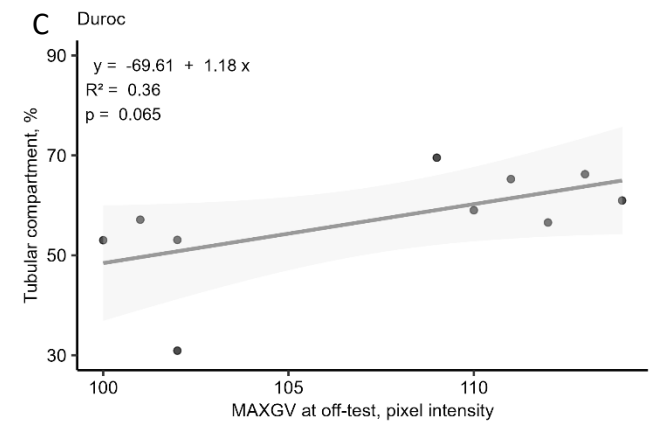
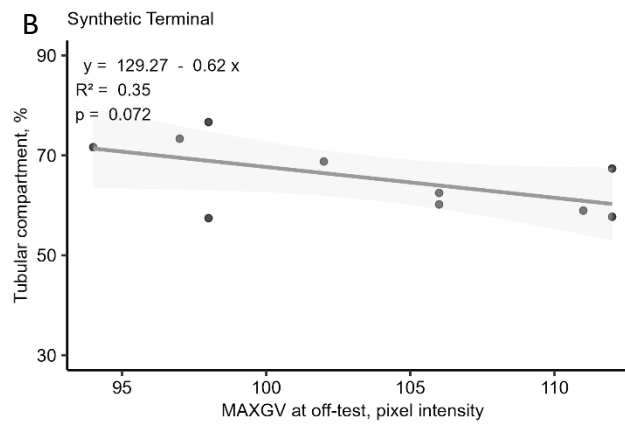
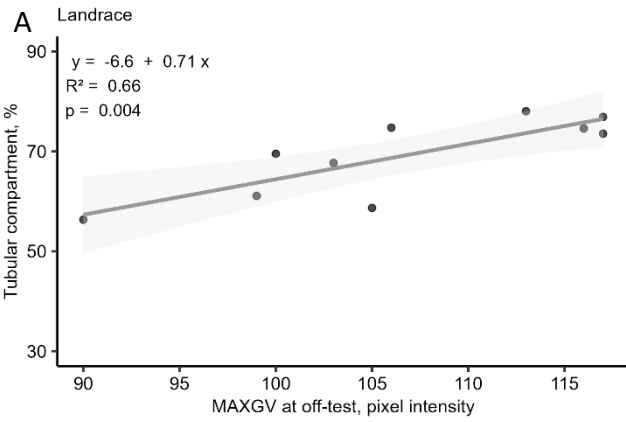


Figure 3. Relationship between the maximum gray value (MAXGV) obtained from testicular ultrasonography and histological parameters (percentage of tubular and interstitial compartments, and seminiferous tubule area) at the off-test stage in boars. A–C: Percentage of the tubular compartment vs. MAXGV in Landrace (A), Synthetic Terminal (B), and Duroc (C) boars. D–F: Percentage of the interstitial compartment vs. MAXGV in Landrace (D), Synthetic Terminal (E), and Duroc (F) boars. G–H: Seminiferous tubule area vs. MAXGV in Landrace (G) and Synthetic Terminal (H) boars. I: Seminiferous tubule area vs. MAXGV considering all genetic lines combined.

When all genetic lines were analyzed together, no significant association was observed between the percentage of the tubular compartment and MAXGV at the off-test stage ( $P > 0.05$ ). However, when genetic lines were evaluated separately, Landrace boars exhibited a strong positive correlation ( $R^2 = 0.66$ ;  $P < 0.005$ ; Figure 3A). Both Synthetic Terminal ( $R^2 = 0.36$ ;  $P = 0.07$ ; Figure 3B) and Duroc ( $R^2 = 0.36$ ;  $P = 0.06$ ; Figure 3C) boars showed a moderate trend toward association, positive for Duroc and negative for Synthetic Terminal.

Regarding the association between the percentage of the interstitial compartment and MAXGV, Landrace boars exhibited a strong negative correlation ( $R^2 = 0.70$ ;  $P = 0.003$ ; Figure 3D). Both Synthetic Terminal and Duroc boars showed moderate associations ( $P = 0.06$ ; Figures 3E and 3F), with the former displaying a positive relationship and the latter a negative one. In relation to the association between MAXGV and seminiferous tubule area across the entire dataset (Figure 3I), a moderate and negative relationship was identified at the off-test stage ( $R^2 = 0.32$ ;  $P < 0.001$ ). In the genetic line-specific analysis, Landrace and Synthetic Terminal boars exhibited a strong negative association (Landrace:  $R^2 = 0.67$ ; Synthetic Terminal:  $R^2 = 0.69$ ;  $P < 0.005$ ). Ultrasound (MAXGV) and histological parameters were not associated with the data obtained from LW boars.

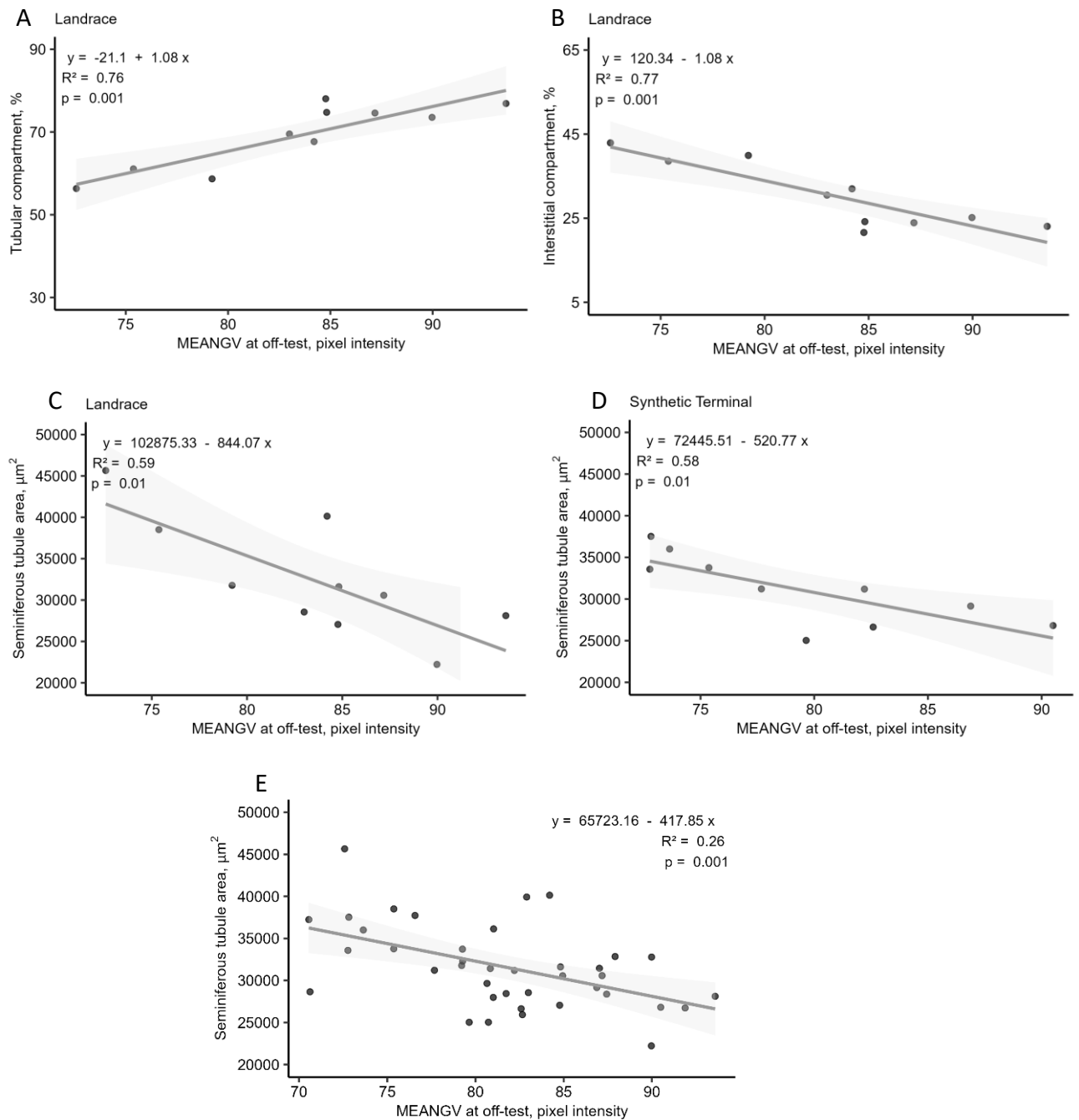


Figure 4. Relationship between the mean gray value (MEANGV) obtained from testicular ultrasonography and histological parameters (percentage of tubular and interstitial compartments, and seminiferous tubule area) at the off-test stage in boars. A–C: Landrace; D: Synthetic Terminal; E: All genetic lines.

Assessment of the associations between MEANGV and the tubular compartment revealed no significant relationship at the off-test stage in the overall population. However, a strong positive association was detected in Landrace boars ( $R^2 = 0.76$ ;  $P = 0.001$ ; Figure 4A). No association was found between the interstitial compartment and the MEANGV at the off-test

( $P > 0.05$ ). Notably, when each genetic line was analyzed separately, Landrace boars exhibited a strong negative association ( $R^2 = 0.77$ ;  $P = 0.001$ ; Figure 4 B). When the data were stratified by genetic line, both Landrace and Synthetic Terminal boars exhibited strong negative associations (LD:  $R^2 = 0.59$ ; ST:  $R^2 = 0.58$ ;  $P = 0.01$ ; Figure 4 C and D). Furthermore, in the overall analysis, a moderate association was observed between the seminiferous tubule area and the MEANGV at the off-test ( $R^2 = 0.26$ ;  $P = 0.001$ ; Figure 4 E). Ultrasound (MEANGV) and histological parameters were not associated with the data obtained from LW and DU boars.

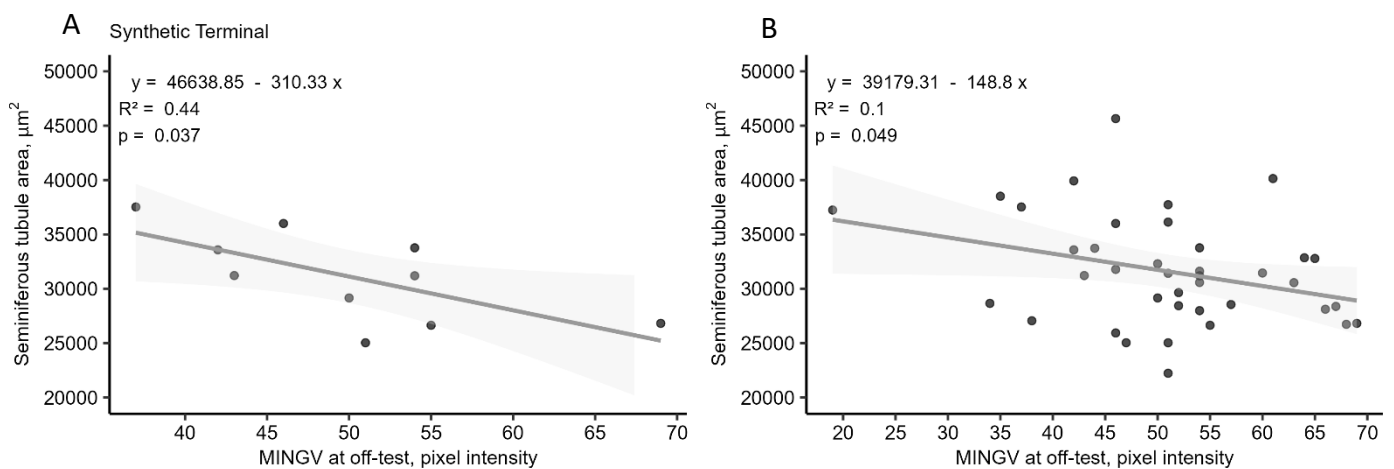


Figure 5. Relationship between the minimum gray value (MINGV) obtained from testicular ultrasonography and seminiferous tubule area at the off-test stage in boars. A: Synthetic Terminal; B: All genetic lines.

Upon stratifying the data by genetic line, Synthetic Terminal boars exhibited a moderate negative association ( $R^2 = 0.44$ ;  $P < 0.05$ ; Figure 5 A). In the overall analysis, a weak association was found between the seminiferous tubule area and the MINGV at the off-test ( $R^2 = 0.10$ ;  $P = 0.05$ ; Figure 5 B). Ultrasound (MEANGV) and histological parameters were not associated with the data obtained from LW and DU boars.

In the overall analysis including all animals, no association was found between the tubular compartment and the MEANGRAD at the off-test stage ( $P > 0.05$ ). However, when analyzing each genetic line separately, Synthetic Terminal boars exhibited a moderate negative association ( $R^2 = 0.54$ ;  $P = 0.01$ ; Figure 6 A). When evaluating all animals, no association was observed between the interstitial compartment and the MEANGRAD at the off-test ( $P > 0.05$ ).

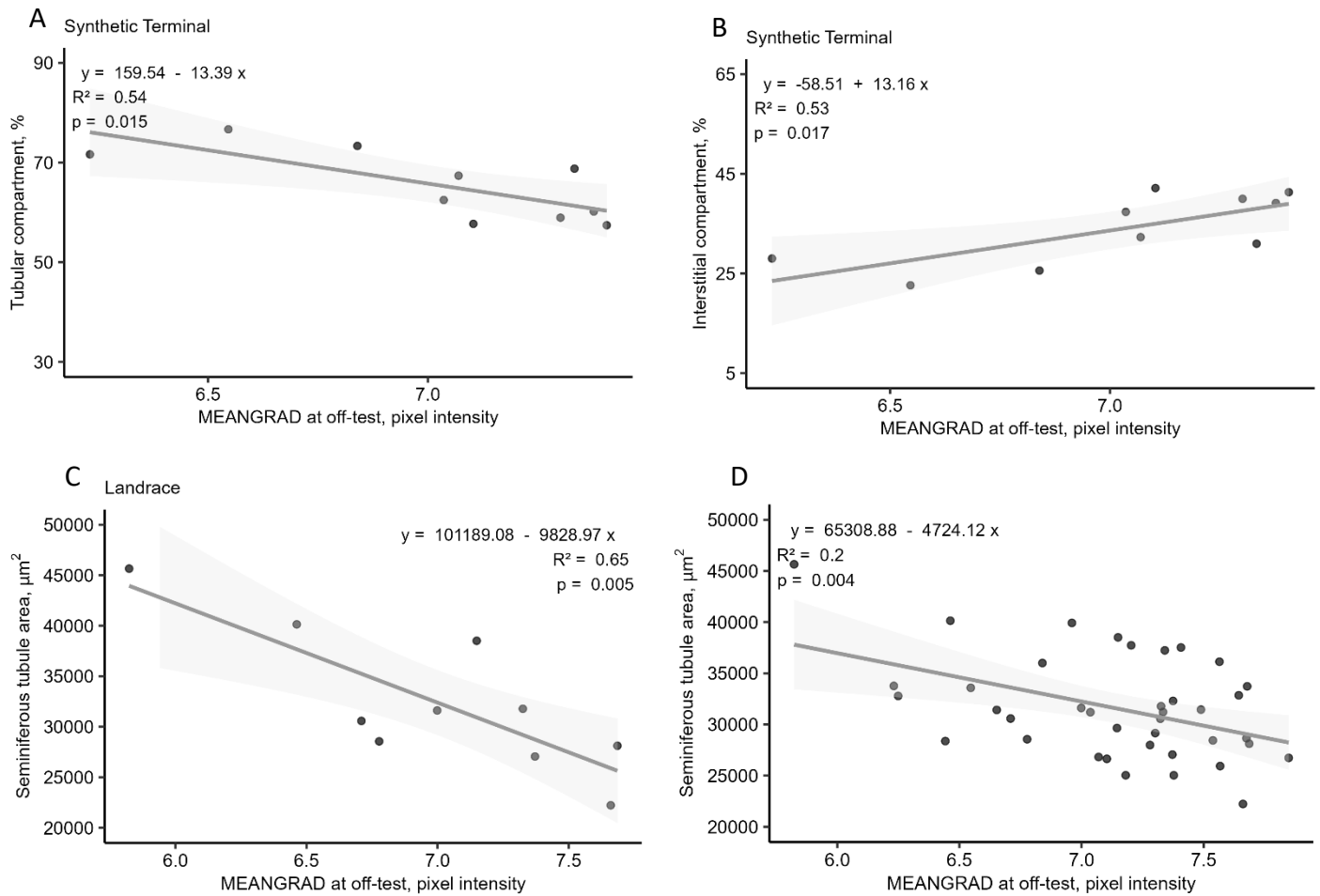


Figure 6. Relationship between the mean gradient value (MEANGRAD) obtained from testicular ultrasonography and histological parameters (percentage of tubular and interstitial compartments, and seminiferous tubule area) at the off-test stage in boars. A–B: Synthetic Terminal; C: Landrace; D: All genetic lines.

However, when each line was analyzed individually, Synthetic Terminal boars showed a moderate positive association ( $R^2 = 0.53$ ;  $P < 0.05$ ; Figure 6 B), explaining 53% of its variation. When data were analyzed by genetic line, Landrace boars showed a strong negative association ( $R^2 = 0.65$ ;  $P = 0.005$ ; Figure 6 C). When evaluating all animals, a weak association was found between the seminiferous tubule area and the MEANGRAD value at the off-test ( $R^2 = 0.20$ ;  $P = 0.004$ ; Figure 6 D). Ultrasound (MEANGRAD) and histological parameters were not associated with the data obtained from LW and DU boars.

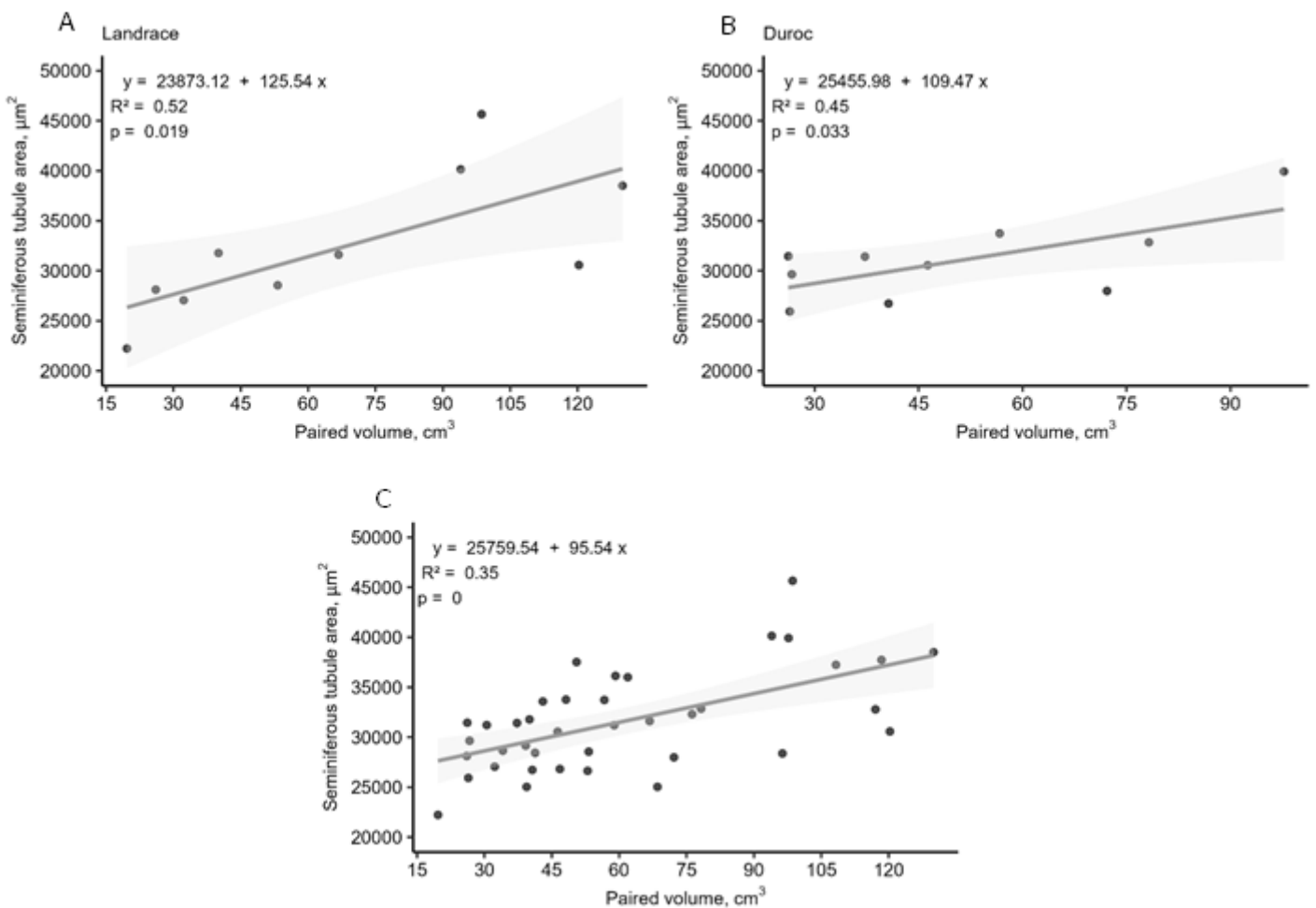


Figure 7. Association between paired testicular volume estimated by ultrasonography ( $\text{cm}^3$ ) and seminiferous tubule area at the off-test stage A: Landrace; B: Duroc; C: All genetic lines.

When each genetic line was analyzed individually, Landrace and Duroc boars showed strong positive associations (LD:  $R^2 = 0.52$ ; DU:  $R^2 = 0.45$ ;  $P < 0.05$ , Figure A and B). Across all genetic lines combined, a moderate association was observed between seminiferous tubule area and paired testicular volume at the off-test ( $R^2 = 0.35$ ;  $P < 0.001$ ; Figure 7 C). Paired testicular volume and histological parameters were not associated with the data obtained from LW and ST boars.

When genetic lines were analyzed separately, Landrace and Duroc boars showed moderate positive associations between seminiferous tubule area and right testicular volume at the off-test stage (Landrace and Duroc:  $R^2 = 0.49$ ;  $P = 0.02$ ; Figure 8 A and B). In the overall analysis combining all genetic lines, a moderate association was also observed ( $R^2 = 0.25$ ;  $P = 0.001$ ;

Figure 8 C). Right testicular volume and histological parameters were not associated with the data obtained from LW and ST boars.

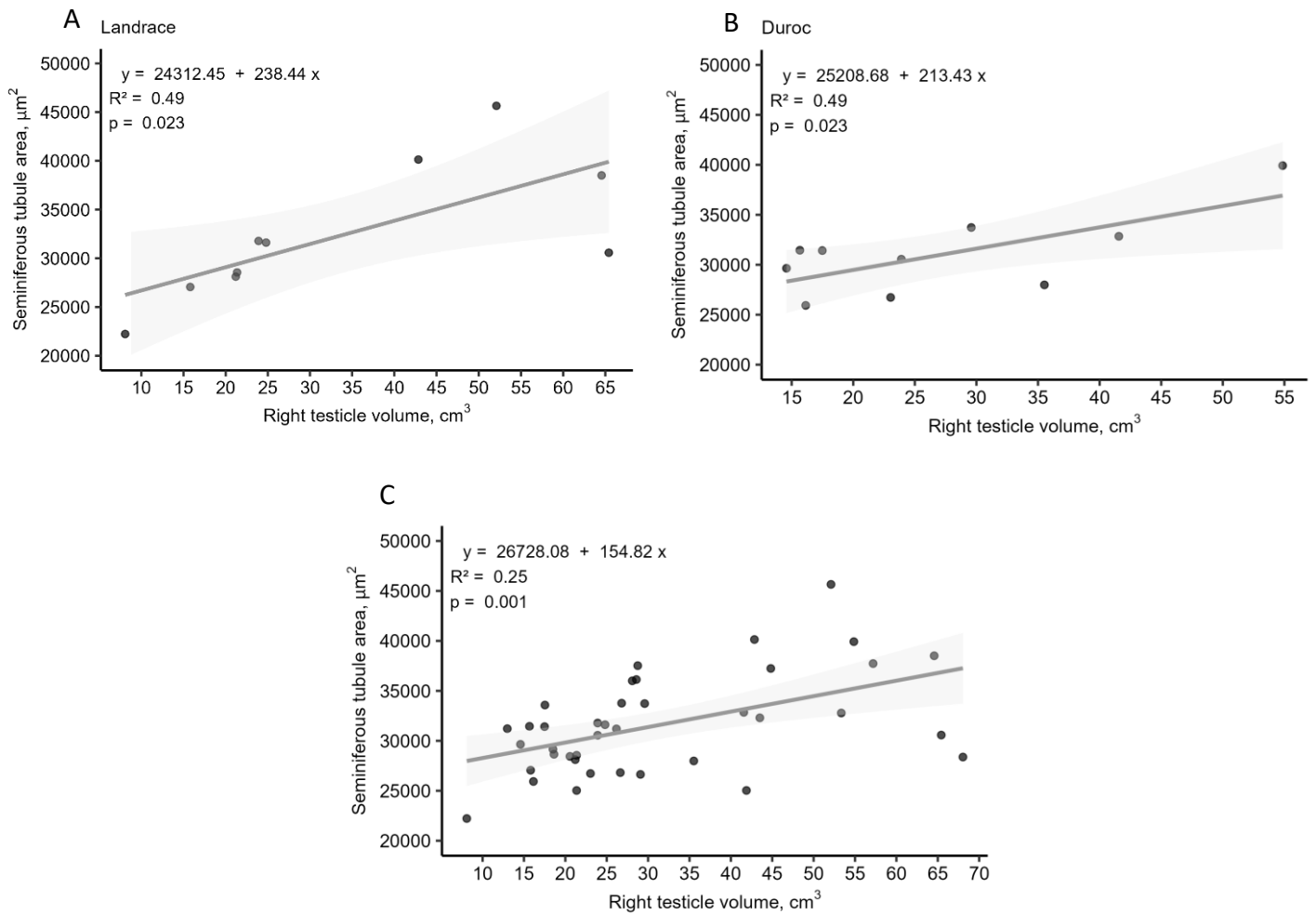


Figure 8. Association between seminiferous tubule area and right testicular volume ( $\text{cm}^3$ ) measured by ultrasonography at the off-test stage. A: Landrace; B: Duroc; C: All genetic lines.

#### *GSA parameters as predictors of semen productivity*

Binomial logistic regression models were developed to predict semen productivity based on GSA parameters, considering each testis (right and left), imaging plane (transverse and longitudinal), and evaluation overtime (post-weaning, on-test, and off-test). The models, including odds ratios, confidence intervals, and p-values, are summarized in Table 5.

Table 5. Predictive models and odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) from the binary logistic regression analysis associating GSA parameters with boar semen productivity across image planes and testes.

Image	Predictor	Estimate ( $\beta$ )	SE	OR	95% CI for OR	z	P-value
Post-weaning							
TR	Intercept	2.61	2.349	13.66	0.15 – 1,602.79	1.113	0.266
	HET	-7.67	3.810	0.00046	$1.70 \times 10^{-7}$ – 0.60329	-2.014	0.044
LR	Intercept	0.43	2.092	1.541	0.026 - 100.218	0.207	0.836
	MAXGV	-0.07	0.045	0.934	0.851 - 1.016	-1.515	0.130
	MINGV	0.10	0.056	1.109	0.994 - 1.242	1.836	0.066
TL	Intercept	-11.97	5.4729	$6.34 \times 10^{-6}$	$1.03 \times 10^{-10}$ - 0.28	-2.187	0.029
	MEANGV	0.21	0.1026	1.24	1.01 - 1.52	2.066	0.039
	DEVOFTHEMEAN	-1.04	0.4623	0.35	0.14 - 0.83	-2.247	0.025
	HET	16.56	7.6201	$1.56 \times 10^7$	$7.04 - 9.14 \times 10^{13}$	2.174	0.029
LL	Intercept	-2.20	0.2555	0.1104	0.0645 - 0.1767	-8.624	<0.001
On-test							
TR	Intercept	-4.87	1.283	0.0077	0.0005 – 0.0829	-3.795	<0.001
	HET	4.92	2.226	137.35	1.90 – 12,641.73	2.211	0.027
LR	Intercept	-2.21	0.248	0.110	0.065 – 0.173	-8.899	<0.001
TL	Intercept	-6.52	3.305	0.0015	0.000002 – 0.955	-1.974	0.048
	MAXGV	-0.13	0.053	0.880	0.787 – 0.973	-2.380	0.017
	MINGV	0.24	0.094	1.275	1.074 – 1.554	2.590	0.010
	HET	14.19	4.329	$1.45 \times 10^6$	$449.83 - 1.28 \times 10^{10}$	3.277	0.001
LL	Intercept	-4.15	1.07	0.016	0.0017 – 0.113	-3.88	<0.001
	HET	3.86	1.97	47.62	1.07 – 2613	1.96	0.050
Off-test							
TR	Intercept	-9.03	3.56	0.0001	$6.00 \times 10^{-8}$ – 0.078	-2.534	0.011
	MEANGV	0.11	0.05	1.12	1.01 – 1.26	2.073	0.038
	MINGV	-0.05	0.03	0.95	0.90 – 1.01	-1.628	0.104
LR	Intercept	-4.77	4.862	0.008	$4.00 \times 10^{-7}$ – 108.2	-0.982	0.326
	MAXGV	-0.11	0.061	0.897	0.792 – 1.009	-1.767	0.077
	DEVOFTHEMEAN	1.58	0.655	4.868	1.373 – 18.821	2.417	0.016
	HET	-22.71	9.481	~0†	~0† – 0.006	-2.395	0.017
	MEANGRAD	1.15	0.682	3.150	0.838 – 12.498	1.682	0.093
	Intercept	-10.88	4.66	0.00002	$1.00 \times 10^{-9}$ – 0.12	-2.33	0.020
TL	MEANGV	0.24	0.10	1.27	1.05 – 1.58	2.37	0.018
	DEVOFTHEMEAN	-1.13	0.77	0.32	0.06 – 1.16	-1.47	0.143
	MINGV	-0.13	0.06	0.88	0.78 – 0.99	-2.15	0.032
	HET	14.58	10.31	$2.15 \times 10^6$	$0.02 - 9.11 \times 10^{15}$	1.42	0.157
LL	Intercept	-11.56	3.94	0.00001	$2.25 \times 10^{-9}$ – 0.013	-2.94	0.003
	MAXGV	0.06	0.036	1.06	0.996 – 1.147	1.74	0.082
	DEVOFTHEMEAN	0.43	0.213	1.54	1.016 – 2.360	2.04	0.042

Estimate ( $\beta$ ): Estimated regression coefficient. SE: Standard error of the estimate. OR > 1 indicates a higher likelihood of the animal being non-productive (reference category: YES = productive). z: Wald test. TR: Transversal right; LR: Longitudinal right; LL: Longitudinal left; MAXGV: Maximum gray value; MINGV: Minimum gray value; MEANGV: Mean gray value; DEVOFTHEMEAN: Standard deviation of MEANGV; HET: Heterogeneity; MEANGRAD: Mean gradient value.

At post-weaning, a higher odds ratio in HET, in the transversal right (TR) plane testis was associated with a significantly lower likelihood of being non-productive, indicating a greater probability of boar productivity (Table 5). In the longitudinal right (LR) image, two GSA parameters were included as predictors; however, neither reached statistical significance (Table 5). In the left testis, transversal (TL) image, the odds of being non-productive increased 24% for each unit increase in MEANGV ( $P < 0.05$ ; Table 5). For each unit increase in DEVOFTHEMEAN, the odds of being non-productive decreased by 65%, suggesting an association with higher productivity. HET showed a very high odds ratio ( $P < 0.05$ ), indicating that the presence of heterogeneity is strongly associated with productivity. For the longitudinal left (LL) plane, only the intercept was included in the model, suggesting that none of the evaluated parameters contributed significantly to the prediction of productivity.

By on-test time, HET at TR image was associated with higher odds of non-productivity ( $p < 0.05$ ). The LR image did not show predictive characteristics associated with boar productivity (Table 5). The variable HET at LL image showed an odds ratio of 47.62 ( $P = 0.05$ ), indicating that for each unit increase in this parameter, the likelihood of a boar being non-productive increases by more than 47 times, holding all other factors constant. On the TL image, the MAXGV is associated with a lower likelihood of being non-productive ( $P < 0.05$ ), the MINGV indicating that an increase in the minimum pixel intensity is associated with a 27% higher chance of a boar being non-productive ( $P < 0.01$ ) and HET presented a very high OR ( $1.45 \times 10^6$ ,  $P = 0.001$ ), meaning that increased heterogeneity in the testicular parenchyma is strongly associated with a greater probability of being non-productive (Table 5).

At off-test, a one-unit increase in MEANGV in the TR scan is associated with a 12% higher likelihood of the boar being classified as a non-productive semen donor ( $P < 0.05$ ). Boars with higher DEVOFTHEMEAN in the LR image had a 4.87 times higher chance of being classified as non-productive compared to those with lower values ( $p < 0.05$ ; Table 5), indicating a negative

association with productivity. Increased HET in the longitudinal right testicular image was strongly associated with a greater likelihood of being classified as productive ( $p < 0.05$ ), indicating a strong positive association with productivity. At LL image, the DEVOFTHEMEAN presented an odds ratio of 1.54 ( $P < 0.05$ ), indicating that, holding other variables constant, each unit increase in this parameter is associated with a 54% higher likelihood of the boar being non-productive. Boars with higher MEANGV in the TL testicular image had a 27% higher likelihood of being non-productive ( $p < 0.05$ ), holding other variables constant. In contrast, for each unit increase in the MINGV, the likelihood of being non-productive decreased by 12% ( $p < 0.05$ ).

### *Semen production*

Semen quality analysis revealed significant differences among the evaluated genetic lines (Table 6). Ejaculate volume was highest in DU boars, while the ST showed the lowest average total sperm count per ejaculate ( $P < 0.05$ ). Sperm motility was also greater in DU animals compared to the other genetic groups ( $P < 0.05$ ).

Table 6. Semen characteristics of boars from different genetic lines.

Parameters	Landrace	n	Large White	n	Synthetic	n	Duroc	n
	(Mean $\pm$ SE)		(Mean $\pm$ SE)		Terminal		(Mean $\pm$ SE)	
	(Mean $\pm$ SE)		(Mean $\pm$ SE)		(Mean $\pm$ SE)		(Mean $\pm$ SE)	
Sperm volume, mL	268.45 ( $\pm 6.28$ ) b	526	189.14 ( $\pm 6.58$ ) c	479	203.02 ( $\pm 4.62$ ) c	973	329.18 ( $\pm 6.42$ ) a	503
Total sperm number per ejaculate, $\times 10^9$ spz	68.28 ( $\pm 1.26$ ) a	526	65.88 ( $\pm 1.31$ ) a	588	57.66 ( $\pm 0.92$ ) b	988	68.34 ( $\pm 1.29$ ) a	503
Total motility, %*	85.0 (85-91) d	525	91.8 (86-94) b	485	89.2 (84 - 93) c	898	94.7 (92-96) a	181

Different letters indicate significant differences between groups in a row ( $P < 0.05$ ) according to Tukey test or \*Dunn (Median - IQR).

### **Discussion**

Accurate estimation of sperm production capacity requires a histomorphological foundation consistent, objective process, in one way that is non-invasive, and practical for application in the selection of high-genetic-merit boars.

Differences among genetic lines in terms of birth weight and performance characteristics are well known and were further supported by the findings of this study (Resende *et al.* 2019; Moreira *et al.* 2025 – Artigo 1).

França *et al.* (2005) reported that in adult boars, approximately 85% of the testicular parenchyma consists of the tubular compartment, with around 10% represented by Leydig cells in the interstitial compartment. In contrast, our findings indicate that at approximately 145 days of age, prepubertal boars exhibit a lower tubular-to-interstitial ratio, with around 65% tubular and 35% interstitial components. Similarly, Avelar *et al.* (2010) characterized the postnatal maturation of seminiferous cords and tubules, reporting that tubular volume density increases between 30 and 180 days of age, reaching nearly 60% at 120 days and up to 80% at 180 days, which is consistent with our results.

The tubular compartment includes seminiferous tubules, surrounded by the basal lamina, peritubular myoid cells, and tunica propria. Its epithelium contains two main cell types: Sertoli and germ cells (França *et al.*, 2000; McCoard *et al.*, 2001, 2003; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024). During puberty, particularly during the first wave of spermatogenesis, germ cells are loosely organized within the lumen, making their identification challenging (Avelar *et al.*, 2010; França *et al.*, 2005). Landrace boars presented a greater proportion of tubular compartment and seminiferous epithelium compared with DU, while DU boars presented more interstitial tissue. The interstitial compartment contains connective tissue, blood and lymphatic vessels, nerves, and immune cells such as macrophages, fibroblasts, and mast cells, along with clusters of Leydig cells (Russell *et al.*, 1990; França *et al.*, 2000; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2024). Leydig cells are rich in smooth endoplasmic reticulum, lipid droplets, and mitochondria with tubular cristae, which house key enzymes for steroid hormone production (Russell *et al.*, 1990; Haider *et al.*, 2004; Simoni & Huhtaniemi, 2017; Shima, 2019). These findings suggest that Landrace boars reach sexual maturity earlier than Duroc boars. Alternatively, the observed differences in testicular parenchyma composition could indicate distinct reproductive profiles between the lines. The lower proportion of interstitial tissue and greater tubular compartment in Landrace boars may be associated with higher sperm concentration but potentially reduced libido, whereas the opposite pattern observed in Duroc boars could reflect greater steroidogenic activity and libido, but lower spermatogenic capacity.

Malmgren *et al.*, (1996) observed that the mean number of Sertoli cells per tubule decreased over time, from 20.8/tubule at 100 days of age to 8.9/tubule at 180 days of age. The number

and function of Sertoli cells throughout life are essential for proper functioning of the testes, including sperm production and androgen production (O'Donnel *et al.*, 2022). In this study, at approximately 145 days of age, the number of Sertoli cells per tubule ranged from 12.11 to 13.69 across the different genetic lines.

In the simple regression analysis between histological and GSA parameters, few significant associations were observed when all genetic lines were analyzed collectively. However, line-specific analyses revealed distinct patterns in the relationships between histological features and grayscale ultrasonographic variables, suggesting that each genetic line exhibits unique testicular tissue dynamics. These findings are consistent with those reported by Brito *et al.* (2012) in bulls from different breeds.

Landrace boars exhibited positive associations between the tubular compartment and grayscale parameters such as MAXGV and MEANGV, which are unidimensional measures of pixel intensity and based on histogram analysis. In contrast, Synthetic Terminal boars showed stronger associations with MEANGRAD, a multidimensional gray level parameter that captures variations in image texture and pixel distribution.

Montes-Garrido *et al.* (2022) investigated the use of ultrasonography as a predictive tool for estimating variations in sperm quality in donor rams subjected to different semen collection frequencies at reproduction centers. The authors reported a significant reduction in MINGV, seminiferous tubule area, and tubular diameter with increased collection frequency—findings likely related to changes in the lumen of the seminiferous tubules. Also in rams, significant increases in MAXGV and MEANGV were observed, which may reflect alterations in the cellular composition of the tubule lumen, as previously demonstrated by Giffin *et al.* (2014).

The seminiferous tubule area showed strong associations with several grayscale ultrasound parameters across most comparisons. These findings align with previous studies (Giffin *et al.*, 2009; Giffin *et al.*, 2014), which reported positive correlations between seminiferous tubule dimensions—including outer and inner diameters, total and luminal areas—and pixel intensity of the testicular parenchyma. However, it differs from two other studies in which pixel intensity was negatively correlated with ST diameter and/or area (Gábor *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2012) and seminiferous epithelium area (Brito *et al.*, 2012) in postpubertal yearling bulls. Similarly, Brito *et al.* (2012) reported a negative correlation between MEANGV and both seminiferous tubule diameter and area ( $r = -0.30$  and  $-0.31$ , respectively) in bulls at 70 weeks of age.

In this study, both paired testicular volume and the volume of the right testis were positively correlated with seminiferous tubule area, indicating that larger testes are associated with greater tubular development and, consequently, a more advanced stage of sexual maturity. Logistic regression models identified the off-test phase—approximately 135 days of age—as the optimal time for performing testicular ultrasound, given that a greater number of grayscale variables were significant predictors of semen productivity at this stage. From a practical perspective, this timing is advantageous as it aligns with routine management procedures already performed on farms. Moreover, this period coincides with the onset of sexual maturation in boars, which begins between 135 and 165 days of age, whereas full breeding maturity is typically reached around 210 days (Schinckel *et al.*, 1983). At this time, semen quality assessments may have limited predictive value for future reproductive performance (Schulze, 2014).

The establishment of the blood–testis barrier represents a critical step in testicular development and has been reported to occur between 120 and 130 days of age in boars (Malmgren *et al.*, 1996; Ford and Wise, 2009; Zheng *et al.*, 2022). Around this same period, the first spermatozoa can be detected in the cauda epididymis, although they often exhibit morphological abnormalities at this early stage (Malmgren *et al.*, 1996). These physiological milestones reinforce the recommendation to perform testicular ultrasonography at the off-test phase, as key structural and functional changes in the testes have already taken place by this age.

Lumen formation occurs after the establishment of the blood-testis barrier (França and Russell, 1998) and coincides with the initiation of fluid secretion by Sertoli cells (Griswold, 1998; Giffin, 2014), both of which can influence testicular echogenicity.

As expected, differences in semen production were observed among genetic lines, consistent with previous findings such as those reported by Resende *et al.* (2019). Unlike the results reported by Schulze *et al.* (2014), Duroc boars in the present study exhibited higher ejaculate volume compared to the other lines; however, it is important to note that collections were analyzed over a broader age range (210 to 370 days). In the same study, Landrace boars showed a higher total sperm count per ejaculate, which is in agreement with the present findings.

One important limitation of this study was the limited number of boars classified as “non-productive,” which was particularly constraining when analyses were stratified by genetic line.

To strengthen the statistical power and the generalizability of these findings, future investigations should incorporate larger cohorts of males, enabling a more robust evaluation of the predictive value of early-life parameters for subsequent semen quality. Moreover, given the distinct physiological characteristics inherent to each genetic line, additional studies with expanded sample sizes will be crucial to validate and refine the associations between grayscale ultrasonographic parameters and reproductive performance outcomes.

In conclusion, the associations between grayscale ultrasonographic parameters and testicular histology varied among genetic lines, with certain lines—such as Landrace—showing stronger and more consistent relationships. Around 135 days of age, proved to be the most informative period for predicting semen productivity using GSA variables, as a greater number of significant predictors were identified at this point. Accurate early prediction of semen-producing capacity not only streamlines selection and reduces quarantine costs but also ensures that boars are transferred at the optimal age, maximizing both reproductive performance and boar stud productivity.

### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to PIC, particularly the Apex staff, for providing the facilities necessary to conduct this study and for their financial support of the project. We also acknowledge the support of Brazilian funding agencies FAPEMIG, CNPq, and CAPES, whose financial contributions were integral to the development of this research.

### **References**

- ARAVINDAKSHAN, J. P. *et al.* Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology*, v. 54, n. 3, p. 339-354, 2000.
- ARTEAGA, A. A.; BARTH, A. D.; BRITO, L. F. C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology*, v. 64, p. 408-415, 2005.
- AVELAR, G. F. *et al.* Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: a non-random event. *Theriogenology*, v. 74, n. 1, p. 11–23, 2010.
- BAKOEV, S. *et al.* PigLeg: prediction of swine phenotype using machine learning. *PeerJ*, v. 8, e8764, 2020.

BRITO, L. F. C. *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. 69-76, 2012.

CHANDOLIA, R. K. *et al.* Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*, v. 48, n. 1, p. 119-132, 1997b.

CHANDOLIA, R. K. *et al.* Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. *Theriogenology*, v. 48, n. 1, p. 99-117, 1997a.

CHIARINI-GARCIA, H.; PARREIRA, G. G.; ALMEIDA, F. R. C. L. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. In: CHIARINI-GARCIA, H.; MELO, R. C. N. (Org.). *Light Microscopy: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press, v. 689, p. 3-18, 2011.

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, n. 6, p. 1011-1023, 2003.

EVANS, A. C. O. *et al.* Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology*, v. 46, n. 2, p. 345-357, 1996.

FORD, J. J.; WISE, T. H. Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *Journal of Animal Science*, v. 87, n. 8, p. 2536-2543, 2009.

FORD, J. J.; WISE, T. H. Assessment of pubertal development of boars derived from ultrasonographic determination of testicular diameter. *Theriogenology*, v. 75, n. 2, p. 241-247, 2011.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: MARTINEZ, F.; REGADERA, J. (ed.). *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*. p. 197-219, 1998.

FRANÇA, L. R. *et al.* Cell proliferation and hormonal changes during post development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 1629-1636, 2000.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. R. C. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v. 63, p. 300-318, 2005.

GÁBOR, G. *et al.* Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. *Theriogenology*, v. 50, p. 223-228, 1998.

- GIFFIN, J. L. *et al.* A study of morphological and haemodynamic determinants of testicular echotexture characteristics in the ram. *Experimental Biology and Medicine*, v. 234, p. 794–801, 2009.
- GIFFIN, J. L.; BARTLEWSKI, P. M.; HAHNEL, A. C. Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes. *Experimental Biology and Medicine*, v. 239, n. 12, p. 1606-1618, 2014.
- GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 9, n. 4, p. 411-416, 1998.
- HAIDER, S. G. Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology*, v. 233, p. 181-241, 2004.
- HENSEL, B. *et al.* Selection and direct biomarkers of reproductive capacity of breeding boars. *Animal Reproduction Science*, v. 269, p. 107490, 2024. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2024.107490.
- MALMGREN, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EINARSSON, S. Attainment of spermatogenesis in Swedish cross-bred boars. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v. 43, n. 1-10, p. 169-179, 1996.
- McCOARD, S. A. *et al.* Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 689–695, 2001.
- McCOARD, S. A. *et al.* Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *Journal of Endocrinology*, v. 178, p. 395–403, 2003.
- MONTES-GARRIDO, R. *et al.* Application of ultrasound technique to evaluate the testicular function and its correlation to the sperm quality after different collection frequency in rams. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 1035036, 2022.
- MOREIRA, L. P. *et al.* Selecting elite boars: enhancing efficiency through reproductive development kinetics and ultrasonography. (Artigo 1) UFMG, 2025.
- O'DONNELL, L.; SMITH, L. B.; REBOURCET, D. Sertoli cells as key drivers of testis function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 121, p. –, 2022.
- PASCHOAL, A. F. L. *et al.* Use of testicular tone and echogenicity in identifying boars with low sperm quality. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71, n. 4, p. 1277-1285, 2019.

- PIC. Boar Stud Management Manual. 2023. Disponível em: <https://www.pic.com/resources/boar-stud-management-guidelines/>. Acesso em: abr. 2025.
- POZOR, M. *et al.* Relationship between echotextural and histomorphometric characteristics of stallion testes. *Theriogenology*, v. 99, p. 134-145, 2017.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.
- RESENDE, P. C. *et al.* Relationship between prepubertal biometrical measures and sperm parameters for the selection of high genetic merit pure and crossbred boars. *Theriogenology*, v. 127, p. 1-6, 2019.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. *et al.* Reproductive physiology of the boar: what defines the potential fertility of an ejaculate? *Animal Reproduction Science*, p. 107476, 2024.
- ROTHSCHILD, F. M.; RUVINSKY, A. The genetics of the pig. 2. ed. Wallingford: CAB International, 2011.
- RUSSELL, L. D. *et al.* A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *American Journal of Anatomy*, v. 188, n. 1, p. 21-30, 1990.
- SCHINCKEL, A. *et al.* Testicular growth in boars of different genetic lines and its relationship to reproductive performance. *Journal of Animal Science*, v. 56, n. 5, p. 1065-1076, 1983.
- SCHULZE, M. *et al.* Relationship between pubertal testicular ultrasonographic evaluation and future reproductive performance potential in Piétrain boars. *Theriogenology*, v. 158, p. 58-65, 2020.
- SCHULZE, M. *et al.* Influences on semen traits used for selection of young AI boars. *Animal Reproduction Science*, v. 148, p. 164-170, 2014.
- SHIMA, Y. Development of fetal and adult Leydig cells. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 18, n. 4, p. 323-330, 2019.
- SIMONI, M.; HUHTANIEMI, I. T. (Eds.). *Endocrinology of the testis and male reproduction*. Cham: Springer International Publishing, 2017.
- WABERSKI, D. *et al.* Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges. *Theriogenology*, v. 137, p. 2-7, 2019.
- WHITTEMORE, C. T.; KYRIAZAKIS, I. *Whittemore's science and practice of pig production*. Oxford: John Wiley & Sons, 2008.

ZHENG, Y. *et al.* Sertoli cell and spermatogonial development in pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 45, 2022.

## **6. Considerações finais**

A suinocultura tem passado por uma transformação biotecnológica contínua, impulsionando inovações que viabilizaram este projeto. A aplicação de ferramentas práticas, ágeis e objetivas tem o potencial de otimizar a produtividade e a qualidade dos processos reprodutivos.

A compreensão detalhada da morfofisiologia do sistema genital, da ultrassonografia e dos parâmetros seminais dos machos suínos foi essencial para o desenvolvimento deste estudo. Além disso, é fundamental investigar os impactos do peso ao nascimento, do período pós-natal e da puberdade na vida produtiva dos varrões. O conhecimento desses fatores é indispensável para a definição de critérios de seleção mais eficientes, permitindo que os animais selecionados expressem todo o seu potencial genético com saúde e bem-estar nas centrais de coleta e processamento de sêmen.

Apesar das limitações de testes isolados, este estudo destaca o potencial da ultrassonografia como ferramenta preditiva na seleção reprodutiva. Foram observadas associações consistentes entre os parâmetros ultrassonográficos e a histologia testicular nas linhas Landrace, Terminal Sintético e Duroc. Além disso, a avaliação aos 135 dias de idade demonstrou valor preditivo em relação à qualidade do sêmen, reforçando a aplicabilidade prática da técnica no aprimoramento genético de reprodutores.