

**ESPERMATOGÊNESE E QUALIDADE ESPERMÁTICA
EM VARRÕES PÓS-PÚBERES DE DIFERENTES
PESOS AO NASCIMENTO**

RAFAELA COSTA RUBIM SACRAMENTO

Orientadora: **Profa. Fernanda Radicchi C. L. de Almeida**
Coorientador: **Prof. Hélio Chiarini-Garcia**

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
FEVEREIRO DE 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ESPERMATOGÊNESE E QUALIDADE ESPERMÁTICA EM VARRÕES PÓS-
PÚBERES DE DIFERENTES PESOS AO NASCIMENTO**

Rafaela Costa Rubim Sacramento

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal na Área de Reprodução Animal

Orientadora: **Profa. Fernanda Radicchi C. L. de Almeida**

Coorientador: **Prof. Hélio Chiarini-Garcia**

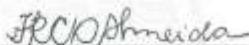
BELO HORIZONTE
FEVEREIRO DE 2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAFAELA COSTA RUBIM SACRAMENTO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

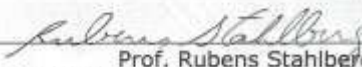
Aprovada em 27 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof^ª. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida
Presidente - Orientador



Prof. Hélio Chiarini Garcia
Instituto de Ciências Biológicas - ICB- UFMG



Prof. Rubens Stahlberg
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais- PUC



Prof^ª. Gleide Fernandes de Avelar
Instituto de Ciências Biológicas - ICB- UFMG

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER) do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciência Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Prof(a) Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida e do Prof. Dr. Hélio Chiarini- Garcia.

O projeto foi executado com o apoio logístico e parte do apoio financeiro da empresa de genética de suínos Agroceres PIC e da granja de suínos Granja Paraíso. Também foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Sacramento, Rafaela Costa Rubim, 1988-
S123e Espermatogênese e qualidade espermática em varrões pós-púberes de diferentes pesos ao nascimento / Rafaela Costa Rubim Sacramento. – 2018.
48 p. : il.

Orientadora: Fernanda Radicchi C. L. de Almeida
Coorientador: Hélio Chiarini-Garcia
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Suíno – Reprodução – Teses. 2. Espermatogênese em animais – Teses. 3. Sêmen – Análise – Teses. 4. Sêmen – Fertilidade – Teses. 5. Reprodução animal – Teses. I. Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato de. II. Chiarini-Garcia, Hélio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.408 926

“Ó Filho do Espírito!

A mais amada de todas as coisas, a Meu ver, é a Justiça; não te desvies dela, se é que Me desejas, nem a descures, para que eu em ti possa confiar. Nela te apoiando, verás com teus próprios olhos e não com os alheios; saberás pela Tua própria compreensão de teu semelhante. Pondera isto em teu coração: como te incumbe ser. Em verdade, a justiça é Minha dádiva a ti e o sinal de Minha misericórdia. Guarda-a, pois, ante os teus olhos”

Bahá'ú'lláh

“O dinheiro faz homens ricos, o conhecimento faz homens sábios e a humildade faz grandes homens.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, por tudo de bom que acontece na minha vida. Ele é a minha vida, sem Ele eu seria um nada, perdida. Obrigada Senhor pela minha vida, pelos meus pais, irmãs, marido, conquistas e apoio sempre.

Aos meus maravilhosos pais, tudo que eu sou hoje é fruto da educação, caráter, força, apoio em tudo, exemplos de conduta, de vida e de sabedoria que eles me deram. Muito obrigada pais, Olier e Soraya, por muitas vezes abrirem mão dos seus próprios desejos, sonhos em prol das filhas.

Às minhas irmãs, Fernanda, Natália e Helena, por serem minhas melhores amigas e eternas confidentes.

Ao meu maravilhoso marido, Donizetti, que, além de ser meu companheiro e amigo, sempre está ao meu lado me ajudando, pelo carinho, pela força, pelo apoio e paciência. Por aguentar os meus choros, prantos e sempre ter uma palavra que acalma o meu coração.

Aos meus lindos cachorros que estão sempre ao meu lado.

À minha orientadora, Fernanda Radicchi, por ter me aceitado como, primeiramente, aluna de iniciação científica e depois de mestrado. Muito obrigada Fê! Pelos seus conhecimentos de veterinária, pela sua postura ética, pela sua paciência e por ter me agraciado com um projeto tão interessante e importante para a suinocultura. E por todos os favores que você me concedeu.

Ao meu coorientador, Hélio Chiarini, pelos seus conhecimentos de morfologia e espermatogênese. Eles foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe do Laber, Fernando, André, Thaizinha, Thaís Garcia, Nihi, Kennedy, Lilin e aos novos alunos de IC, especialmente, Andréia, Fabíola e Marininha que foram e serão minhas companheiras, amigas. Agradeço pela ajuda a qualquer hora, pelas risadas, pelas broncas, pelo suporte tecnológico e tudo o mais.

À Prof(a). Monique Lagares pela disponibilidade sempre e pela ajuda na aprendizagem no estudo da morfologia espermática.

A todos os colegas, professores e funcionários do ICB, mas mais especificamente do Departamento de Morfologia.

À CAPES pelo apoio financeiro durante esses dois anos.

À Agroceres PIC, pela estrutura e por todo apoio oferecidos para que este trabalho se tornasse viável, e principalmente pela confiança, nos permitindo executar um trabalho tão extenso.

À Granja Paraíso e à todos os funcionários por todo apoio, pela recepção carinhosa, pelos sorrisos, respeito, lições de vida, confiança, experiência, aprendizado, ajuda incansável, e por torcerem sempre pelo projeto.

Aos animais utilizados no experimento, que deram suas vidas em prol do conhecimento.

A todos os animais, os quais são a razão de eu ter escolhido essa profissão tão maravilhosa e especial.

A todos os meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

SUMÁRIO

Resumo	10
1. Introdução	12
2. Objetivo	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivo Específicos	13
3. Revisão de Literatura	13
3.1 Restrição intrauterina do crescimento	15
3.2 Ontogênese Testicular	16
3.3 Desenvolvimento testicular pós-natal	16
3.4 Estrutura testicular e espermatogêneses em suínos	18
3.4.1 Anatomia do testículo	18
3.4.2 Histologia do testículo	18
3.4.3 Espermatogênese e esteroidogênese	19
3.4.4 Ciclo do epitélio seminífero	20
3.5 Inseminação artificial e qualidade espermática	23
4. Material Métodos	25
4.1 Local e período	25
4.2 Instalações e manejo do sistema de produção	25
4.3 Amostragem dos animais e grupos experimentais	27
4.4 Manejo dos animais	27
4.5. Coleta de amostras	28
4.5.1 Coleta de sêmen	28
4.5.2 Parâmetros corporais externos	28
4.5.3 Procedimento cirúrgico – coleta de testículos	28
4.5.4 Biometria testicular	29
4.5.5 Análise hormonal	30
4.6. Processamento das amostras	30
4.6.1 Análise de sêmen	30
4.6.2 Processamento histológico	30
4.6.3 Avaliações histomorfométricas	31
4.6.4 Análise de testosterona	33
4.6.5 Análise Estatística	34
5. Resultados e Discussão	33
5.1 Biometria corporal e testicular	34
5.2 Análise de sêmen	37
5.3 Avaliações histomorfométricas	40
6. Considerações finais	42
7. Bibliografia	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características quantitativas e qualitativas do sêmen de machos suínos jovens e adultos, e limites para normospermia	24
Tabela 2 - Dados biométricos ao nascimento e aos 10 meses e níveis plasmáticos de testosterona aos 10 meses de idade em leitões de alto (AP) e baixo (BP) pesos ao nascimento	35
Tabela 3 - Características seminais em animais de alto (AP) e baixo (BP) pesos ao nascimento coletados em intervalos de 15 dias a partir de 180 dias de idade	38
Tabela 4 - Morfologia espermática em animais de alto (AP) e baixo (BP) pesos ao nascimento coletados em intervalos de 15 dias a partir de 180 dias de idade	39
Tabela 5 - Análises histomorfométricas de animais de alto (AP) e baixo (BP) pesos ao nascimento, orquiotomizados com 10 meses de idade	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia de luz de testículo suíno aos 10 meses de idade	33
---	-----------

RESUMO

Nos últimos anos, o melhoramento genético tem se voltado ao aumento no tamanho da leitegada, o que favoreceu a ocorrência de leitões mais leves ao nascimento. Esses animais têm comprometimento do desenvolvimento muscular, maiores taxas de mortalidade e baixa qualidade da carcaça. Além dos efeitos sobre parâmetros de produção, pouco se sabe sobre o impacto do peso ao nascer sobre as características reprodutivas especialmente em machos. Nesse contexto, a qualidade dos machos selecionados como doadores de sêmen nas Centrais de Inseminação Artificial (CIA) é essencial para reduzir os custos de produção de doses seminais, maximizando os lucros. Considerando que os leitões de baixo peso são uma realidade em granjas comerciais, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do baixo peso ao nascer sobre a qualidade do sêmen em machos jovens. Vinte quatro machos foram selecionados de acordo com o peso ao nascimento e subsequentemente alocados em dois grupos experimentais: Alto Peso (AP): faixas de peso variando entre 1,80 e 2,15 kg; e Baixo Peso (BP): faixas de peso variando entre 0,75 e 1,10 kg, sendo criados em baias separadas até os 300 dias de idade. A partir dos 180 dias de idade, sete animais de cada grupo experimental foram selecionados e treinados para a coleta de sêmen, sendo coletados 5 ejaculados por animal, em intervalos de 15 dias, para a análise de qualidade espermática (motilidade, vigor, concentração e morfologia). Aos 300 dias de idade, foi feita coleta de sangue para dosagem de testosterona, sendo os animais posteriormente castrados, e os testículos coletados para análises biométricas e histomorfométricas. Para as avaliações biométricas, os testículos foram pesados e realizadas as medidas de comprimento, largura e espessura. Além disso, pequenos fragmentos do parênquima testicular foram coletados, fixados em glutaraldeído 5% e incluídos em resina de glicol metacrilato para análises de eficiência da espermatogênese. Os dados foram analisados usando o software SAS (versão 8.0), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste T de Student, sendo $P < 0,05$ considerado significativo. Todas as medidas biométricas corporais e testiculares foram menores no grupo BP ($P < 0,05$), mas o peso ao nascer não afetou a eficiência espermatogênica, tampouco as análises seminal e hormonal. Embora as análises seminais fossem semelhantes em ambos os grupos experimentais, o grupo BP apresentou menor CTTS (comprimento total do túbulo seminífero; $P < 0,05$), bem como tendência a menor número de células de Sertoli por testículo ($P < 0,10$), o que pode refletir diretamente na capacidade de produção espermática do indivíduo. Estudos futuros são necessários para entender melhor os efeitos do peso ao nascer sobre a fertilidade dos machos suínos.

Palavras-Chave: Restrição intrauterina de crescimento, sêmen, varrão, suíno

ABSTRACT

In recent years, the genetic improvement has focused on increasing litter size, which has favored the occurrence of lighter piglets at birth. These animals have impaired muscle development, higher mortality rates and poor carcass quality. In addition to the effects on production traits, little is known about the impact of birth weight on reproductive traits especially in males. In this context, the quality of the males selected as semen donors in Artificial Insemination Centers (CIA) is essential to reduce the production costs of seminal doses, maximizing profits. Considering that low birth weight piglets are a reality at commercial farms, the objective of this study was to investigate the effects of low birth weight on semen quality in postpubertal males. Twenty-four males were selected according to their birth weights and subsequently allocated to two experimental groups: High weight (HW): birth weight range from 1.80 to 2.15 kg; and Low Weight (LW): birth weight range from 0.75 to 1.10 kg. These animals were raised in separate pens for up to 300 days. Starting 180 days of age, seven animals were selected and trained for semen collection, and five ejaculates per animal were collected every 15 days for analysis of sperm quality (motility, vigor, concentration and morphology). At 300 days of age, blood samples were collected for testosterone analysis, and subsequently males were orchietomised and the testes were collected for biometrical and histomorphometrical analyzes. To obtain the biometrical data, testes were weighed, and measures of length, width and thickness taken. In addition, small fragments of the testicular parenchyma were collected, fixed in 5% glutaraldehyde and included in glycol methacrylate resin for analyzes of spermatogenesis efficiency. Data were analyzed using SAS statistical software (version 8.0), and treatment means were compared by the Student T-test, with $P < 0.05$ considered significant. All biometrical and testicular measurements were lower in LW males, but birth weight did not affect spermatogenic efficiency, seminal and hormonal analysis. Even though semen analysis were similar in both experimental groups, LW males had shorter total seminiferous tubules length and a trend for lower total number of Sertoli cells per testis, which may reflect on sperm production capacity. Further studies are necessary to better understand the effects of birth weight on fertility in boars.

Keywords: Intrauterine growth restriction, semen, boar, swine

1. Introdução

No sistema de produção de suínos, a eficiência reprodutiva é um importante parâmetro econômico utilizado para avaliar a produtividade do rebanho, sendo determinada pelo número de leitões desmamados por fêmea por ano (Dial et al., 1992). Assim, durante as últimas décadas, a contínua busca pelo aumento da produtividade tem levado à utilização de estratégias de melhoramento genético voltadas para o incremento da eficiência reprodutiva, sendo o aumento no número de leitões nascidos o principal parâmetro investigado pelos geneticistas até então (Knox, 2009). Nesse sentido, a seleção para maior prolificidade aumentou a discrepância entre taxa de ovulação e o número de conceptos sobreviventes após o período de implantação e capacidade uterina, principalmente em porcas com ordens de parto mais avançadas (Foxcroft et al., 2006). Taxas de ovulação maiores que o número de leitões que uma porca seja capaz de manter vivos até o parto leva a um aumento na competição entre fetos por nutrientes e oxigênio, o que favorece uma maior incidência de leitões mais leves ao nascimento (Foxcroft et al., 2006). Por sua vez, leitões mais leves ao nascimento são mais fracos, e não conseguem expressar o seu potencial de crescimento, sinais estes característicos de restrição intrauterina de crescimento (RIUC) (Wu et al., 2006). Neonatos acometidos por RIUC exibem crescimento assimétrico de órgãos, tais como: fígado, rins e intestinos. Além disso, há evidências de que estes animais apresentam pior desenvolvimento pós-natal, comprometimento na miogênese bem como alterações na mucosa intestinal e pior qualidade de carne (Gondret et al., 2006; Rehfeldt e Kuhn, 2006; Alvarenga et al., 2013; Ferenc, 2014). Entretanto, pouco se sabe sobre a interferência de insultos durante o período pré-natal sobre a função reprodutiva, especialmente em machos. Assim sendo, dada a grande incidência de leitões leves em granjas comerciais e a importância de machos como doadores de sêmen para uso na inseminação artificial (IA), o impacto do peso ao nascimento sobre a fertilidade em varrões merece atenção especial.

A utilização da IA no sistema de produção de suínos tem sido de fundamental importância para o aprimoramento da taxa de fertilidade, da genética, da alocação de mão de obra, bem como para o estado sanitário do plantel. A criação de centrais de IA para a produção de sêmen tem permitido a seleção de varrões de alto mérito genético, objetivando maiores taxas de fertilidade e produção de sêmen (Knox, 2016). Em meados da década de 1980, a taxa de utilização de IA nos rebanhos comerciais em alguns países da Europa girava em torno de 50-75% (Crabo, 1990). Nos anos 2000, ocorreu um aumento exponencial no uso da IA em todo o mundo, de tal forma que a quase totalidade das fêmeas em reprodução eram inseminadas (Weitze, 2000). Hoje, não há dúvidas de que a eficiência da produção comercial na suinocultura esteja ligada ao uso desta técnica (Knox, 2016). No que diz respeito aos varrões, o aprimoramento dos índices genéticos, fertilidade e alta eficiência na produção de doses inseminantes são os principais fatores que contribuem para a alta performance desses indivíduos (Knox, 2016). Logo, o estudo dos fatores que afetam o desenvolvimento testicular, em especial o peso ao nascimento, e as possíveis consequências sobre a espermatogênese e a qualidade do sêmen no animal adulto torna-se especialmente importante no âmbito da suinocultura moderna mundial, na qual a utilização da IA encontra-se incorporada ao manejo reprodutivo das granjas tecnificadas (Bortolozzo et al., 2005). Certamente, achados neste assunto poderão contribuir ainda mais para o aumento da eficiência na produção de suínos, alertando os geneticistas sobre a possível importância do peso ao nascimento como um critério essencial na seleção de animais para a linha macho.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral:

Investigar os efeitos do baixo peso ao nascimento sobre a espermatogênese e a qualidade do sêmen em varrões aos 10 meses de idade.

2.2 Objetivos específicos:

Comparando machos de diferentes pesos ao nascimento na idade de 10 meses, os objetivos específicos foram:

- Acompanhar o desenvolvimento pós-natal dos animais por meio de medidas biométricas corporais e testiculares;
- Avaliar as características seminais (motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática);
- Avaliar a concentração plasmática de testosterona;
- Investigar por meio de análises histomorfométricas o parênquima testicular.

3. Revisão de Literatura

3.1 Restrição intrauterina do crescimento

A restrição intrauterina do crescimento (RIUC) pode ser definida como o nascimento de neonatos que não atingiram o seu potencial de crescimento intrauterino normal e apresentam crescimento de órgãos assimétricos, caracterizado pelo crescimento normal do cérebro em detrimento de outros órgãos internos, como por exemplo fígado e rins (Ashworth, 2013). Este fato é devido principalmente a um suprimento insuficiente de nutrientes e oxigênio, levando ao nascimento de animais pequenos, fracos e que não conseguem expressar o seu potencial de crescimento (Foxforft et al., 2006). O suíno é uma espécie animal em que a RIUC ocorre de forma natural, não necessitando ser induzida (Wu et al., 2006). Assim sendo, foram reportadas nesta espécie outras formas de diagnóstico dessa patologia, além do baixo peso ao nascimento, baseadas na morfologia da cabeça (Chevaux et al., 2010). Leitões com RIUC apresentam o formato da cabeça íngreme, tipo testa de golfinho, olhos esbugalhados e rugas perpendiculares com a boca (Hales et al., 2013). A partir do exame físico do animal, foram determinados escores de classificação em razão do número de características presentes no mesmo animal. Quando todas as características estavam presentes, o leitão apresentava RIUC severa (grau 3). Se uma ou duas presentes, RIUC leve (grau 2). Se nenhuma das características estiverem presentes, o leitão era considerado normal (grau 1) (Hales et al., 2013).

A RIUC é um problema relevante tanto para humanos quanto para os animais domésticos, estando associada a morbidade e mortalidade perinatal elevadas (Wu et al., 2006). Em humanos, 8% das gravidezes são diagnosticadas com RIUC. Contudo, acredita-se que este número seja subestimado, em virtude de 2/3 das crianças que nascem no mundo não terem registro do peso ao nascimento (Ferenc et al., 2014). Entre os animais, esse número pode ser ainda maior. Estudos epidemiológicos conduzidos nos Estados Unidos verificaram uma prevalência de RIUC em 30 % do número total de leitões nascidos por ano, enquanto na Europa, as taxas de prevalência variam entre 6-10%.

A ocorrência de RIUC, na suinocultura, está diretamente relacionada ao tamanho da leitegada, mais precisamente ao número de embriões/ fetos presentes dentro do corno uterino. Como a prole é um importante parâmetro econômico para as espécies de produção (Johnson et al., 1998), a RIUC é mais frequentemente observada em granjas com programas intensivos de produção (Quiniou et al., 2002). A seleção para alta prolificidade em fêmeas suínas (maior número de leitões nascidos por leitegada) tem aumentado bastante durante a última década, fazendo com que a prevalência de RIUC também se torne alta. A RIUC beneficia o desenvolvimento do cérebro em detrimento de outros órgãos fetais (“brain sparing effect” ou “efeito de poupar o cérebro”) (Bauer et al., 1998) em função da redistribuição do fluxo sanguíneo para órgãos – chave, como o cérebro, em detrimento de outros órgãos e tecidos como músculos, rins, pâncreas e fígado (Bauer et al., 1998; Ashworth, 2013 e Miller et al., 2016). Isso se deve ao fato de que frente a insulto no ambiente intrauterino, o feto lança mão de adaptações para aumentar as chances de sobrevivência após o nascimento. Segundo Barker (1998) e Martin – Gronert e Ozanne (2006), a resposta imediata exibida pelo feto é a obtenção de energia por meio de um processo catabólico, sendo esta seguida de alterações na taxa metabólica, na esteroidogênese e na sensibilidade dos tecidos aos hormônios produzidos, quando o insulto se prolonga durante a gestação. Essas alterações metabólicas e fisiológicas determinam um menor crescimento fetal, aquém de seu potencial, o que resulta no nascimento de indivíduos de baixo peso.

Inúmeras são as causas associadas ao RIUC. Dentre elas destacam-se: desnutrição ou super nutrição, estresse térmico, doenças e toxinas. Entretanto, a causa mais comum de RIUC (80-90% dos casos) está relacionada ao comprometimento na transferência de nutrientes e oxigênio pela placenta. Em suínos, estudos relataram que em leitegadas maiores, o fluxo sanguíneo do útero também aumentaria (de 0,31 para 0,72; de 0,26 para 0,60 e de 0,20 para 0,43 litros/minuto/feto do 44º ao 111º dia de gestação, na presença de 2 a 3, 4 a 5 e 6 a 8 fetos no corno uterino, respectivamente). Porém, este aumento no fluxo sanguíneo ocorreria em menor proporção que o número de fetos, reduzindo o fluxo de sangue no útero e conseqüentemente o fornecimento de nutrientes por feto (Père e Etienne, 2000).

A placenta é o órgão chave de trocas entre mãe e feto. Inúmeros são os fatores que influenciam o seu crescimento e, conseqüentemente, o desenvolvimento fetal. Dentre eles, pode-se citar: o tamanho corporal materno, a idade e a ordem de parição da fêmea, o genótipo, a capacidade uterina, a nutrição, a disponibilidade de oxigênio dentre outros (Bauer et al., 1998; Ashworth et al., 2001).

As conseqüências da RIUC abrangem todos os sistemas orgânicos, podendo inclusive favorecer o desenvolvimento de desordens metabólicas (Gatford et al., 2010). Há evidências de que a restrição do crescimento fetal tem impactos negativos permanentes sobre o desenvolvimento pós-natal do indivíduo: sobrevivência pré-desmame, eficiência de utilização de alimentos, estado sanitário, composição de tecidos corporais (incluindo proteína, gordura e sais minerais) e qualidade da carne (Wu et al., 2006). Além disso, o baixo peso ao nascimento estaria associado a altas taxas de morbidade e mortalidade em animais domésticos (Mellor, 1983; Azzam et al., 1993; Van Rens et al., 2005), sendo as disfunções intestinais e respiratórias os principais fatores contribuintes para a alta mortalidade pré- desmame (Rossdale e Ousey, 2002).

A viabilidade de leitões pequenos foi investigada no trabalho de Smit (2007), onde foi reportado que leitegadas com 10 a 15 suínos nascidos apresentariam mais leitões nascidos mortos e menos leitões desmamados, sugerindo uma reduzida viabilidade dessas leitegadas. Adicionalmente, o ganho de peso diário (GPD) seria maior em leitões nascidos mais pesados resultando em um maior peso à desmama (Alvarenga et al, 2013).

O baixo peso ao nascimento também compromete o sistema genital masculino tanto em homens quanto em animais. O estudo de Boeri et al. (2016) comparando homens inférteis e homens férteis de diferentes pesos ao nascimento revelou que a infertilidade foi mais frequente em pacientes que nasceram com peso menor. Estes também apresentaram menor volume testicular e menor nível de testosterona circulante. Em relação às análises seminais, o grupo de homens inférteis com baixo peso ao nascimento apresentou maiores taxas de astenospermia (redução ou ausência da mobilidade dos espermatozoides) e maior percentual de alterações morfológicas dos espermatozoides. Já em animais, Auler et al. (2017) demonstraram que varrões mais leves ao nascimento (entre 0,8 a 1,0 kg de peso vivo) apresentaram testículos mais leves aos 8 dias e 8 meses de idade, bem como menor número de espermátides alongadas em comparação com varrões com maior peso ao nascimento (1,8-2,0 kg).

Estudos envolvendo nutrição materna também revelaram que ratos descendentes de mães que passaram por uma restrição calórica no período gestacional tiveram um menor crescimento testicular e um atraso na puberdade (Léonhardt et al., 2003), bem como demora na maturidade sexual (Zambrano et al., 2005). Além disso, foi observada redução no número de células de Sertoli, menor contagem espermática e redução da motilidade dos espermatozoides na vida adulta (Toledo et al., 2011). Similarmente, a restrição calórica em dieta de ovelhas gestantes provocou redução do peso ao nascimento, peso do testículo bem como reduziu o número de células de Sertoli dos cordeiros (Kotsampasi et al., 2009). Recentemente, Melo et al. (2013) demonstraram que a restrição proteica durante a gestação promoveu redução no número das células germinativas (espermatogônia, espermátocito, espermátide) e de Leydig, sem, no entanto, alterar o número de células de Sertoli em ratos. Mesmo tendo sido reportados efeitos de RIUC sobre o sistema genital, estudos envolvendo esse tema na espécie suína ainda são escassos, principalmente em machos.

3.2 Ontogênese testicular em suínos

O sistema reprodutivo fetal origina-se na parte dorsal da cavidade abdominal, a partir de duas cristas germinativas. Antes de se diferenciar no trato reprodutor masculino ou feminino, o sistema é composto por duas gônadas indiferenciadas, dois pares de ductos, um seio urogenital, um tubérculo genital, e diversas pregas vestibulares (Hafez, 2004). As células germinativas primordiais (CGP) têm origem extragonadal, sendo formadas a partir do saco vitelínico mesentérico. Essas células são móveis e altamente invasivas (Gonçalves et al., 2001), sendo capazes de migrar do saco vitelino para as cristas genitais, dando origem aos cordões gonadais (Ortavant, 1977). Nas fêmeas, esses cordões são chamados de cordões corticais, e nos machos, cordões medulares. As células mesenquimais também migram para a crista gonadal dando origem às células de Leydig nos machos, e as células da teca e estroma nas fêmeas.

As células do epitélio celômico também migram e dão origem às células de Sertoli nos machos, e células da granulosa nas fêmeas (Gilbert, 2003). Os cordões medulares, nos machos, continuam a proliferar formando uma rede interna de cordões sexuais, e uma outra rede mais distal e mais fina, denominada rede testicular (rede testis). Os ductos deferentes são remanescentes do rim mesonéfrico embrionário e ligam os testículos aos ductos de Wolff (Gilbert, 2003).

Os ductos de Müller e os ductos de Wolff compõem o embrião sexualmente indiferenciado. As fêmeas possuem dois cromossomos X (XX) e os machos possuem um cromossoma X e o outro Y (XY). O espermatozoide é quem determinará o sexo genotípico, já que ele é quem detém os cromossomas sexual (Y). A substância que determina o sexo genotípico masculino é chamada fator determinante testicular (FDT), o qual é controlado pelo cromossoma Y. O cromossoma X não possui esse gene. Quando o FDT é produzido pelos cordões sexuais na gônada primitiva, o desenvolvimento do trato reprodutivo masculino é estimulado. A ausência do FDT resulta no desenvolvimento do trato reprodutivo feminino (Senger, 2003).

Nos machos os ductos de Wolff se desenvolvem controlados pelos andrógenos testiculares, e os ductos de Müller atrofiam sob influência do hormônio anti-mulleriano (HAM) produzido pelas células de Sertoli (Park e Jameson, 2005). Nos testículos, as células de Sertoli originam-se, provavelmente, do epitélio celômico, e são as primeiras células somáticas a se diferenciarem (Karl e Capel, 1998). A migração das demais células somáticas do testículo, como as células de Leydig, a partir da região mesonéfrica para a crista genital, ocorre sob influência das células de Sertoli (Capel, 2000), inclusive em suínos. Já as células mióides originam-se mais provavelmente do epitélio celômico ou do mesênquima, que constitui a crista genital (Combes et al., 2009).

Nos suínos, a diferenciação testicular ocorre por volta do 26º até 56º dia de gestação, e se caracteriza pela formação dos cordões testiculares e diferenciação das células somáticas precursoras das células de Sertoli e células mióides peritubulares. Essa diferenciação é necessária para que ocorra o desenvolvimento normal da espermatogênese, e para inibição da progressão dos gonócitos para a fase de meiose, como acontece nas fêmeas (Yao et al., 2002).

Durante o desenvolvimento testicular, as células de Sertoli também são responsáveis por secretar o hormônio anti-mülleriano, que inibe o desenvolvimento do trato reprodutivo feminino. Sendo assim, as células de Sertoli são responsáveis pela diferenciação e desenvolvimento dos testículos. Porém, as células de Leydig é que são responsáveis por conferir as características secundárias masculinas e desenvolvimento do trato reprodutor masculino, pois são as que secretam a maior parte dos andrógenos durante a vida fetal (Senger, 2003).

3.3 Desenvolvimento testicular pós-natal

O desenvolvimento testicular pós-natal em suínos é variável dentre as diferentes raças, provavelmente devido a particularidades envolvendo diferenciação sexual e que se mantêm durante a organogênese (Kaminsky et al., 1999). Assim, ao nascimento, o parênquima testicular é constituído por cordões seminíferos, formados por células de Sertoli e gonócitos, envolvidos por uma camada de células

peritubulares mioides. O interstício é composto principalmente por células de Leydig, células do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (França, 1987; Avelar et al., 2010). De acordo com Harayama et al. (1991), o principal componente dos testículos, neste momento, é o interstício.

Durante o período compreendido entre o nascimento e os dois primeiros meses de vida, a população de gonócitos presente nos cordões seminíferos reduz acentuadamente, sendo observadas, ao final destes períodos, as primeiras espermatogônias A (França et al., 1988; Avelar et al., 2010). Apesar da existência de um consenso quanto ao momento do desaparecimento total dos gonócitos, o surgimento das primeiras espermatogônias A parece variar entre raças e cruzamentos (França e Cardoso, 1998; Avelar et al., 2010). A população de espermatogônias A apresenta um discreto aumento entre dois e três meses de idade, momento em que ocorre simultaneamente a estabilização da população destas células e o desaparecimento dos gonócitos (França et al., 1988). De acordo com França et al. (1988), neste momento, o estoque basal de espermatogônias A está definido.

Aos dois meses de idade, concomitante ao início do crescimento da população de espermatogônias A, surgem as primeiras espermatogônias B e espermátocitos primários e, em algumas raças, as primeiras espermátides arredondadas. Assim como em outros mamíferos, a população celular dos cordões/túbulos seminíferos se mantém baixa até próximo a puberdade. Entretanto, com o início deste período, ocorre um aumento acentuado dessa população, sendo constituída por espermatogônias, espermátocitos primários e secundários e espermátides arredondadas e alongadas (França et al., 1988; Harayama et al., 1991; Avelar et al., 2010). Estas modificações na população celular dos túbulos seminíferos durante a fase pré - púbere são acompanhadas pelo aumento progressivo do peso testicular, comprimento e diâmetro dos túbulos seminíferos e porcentagem destas estruturas no parênquima testicular (França et al., 1988; Harayama et al., 1991; Avelar et al., 2010; Ford e Wise, 2011).

Em suínos, a puberdade é caracterizada por um aumento significativo nos pesos corporal e testicular, comprimento e diâmetro dos túbulos seminíferos, na população de células espermatogênicas, concentrações plasmáticas de testosterona, além do percentual de túbulos seminíferos no parênquima. Entretanto, os eventos mais marcantes da puberdade são a presença de espermátides alongadas no lúmen tubular e a maturação das células de Sertoli (França, 1987; Harayama et al., 1991; França et al., 2000; Avelar et al., 2010). Durante o período compreendido entre a puberdade e a maturidade sexual, a população de células espermatogênicas aumenta progressivamente (França, 1987).

Por sua vez, a maturidade sexual é caracterizada pela estabilização de vários parâmetros testiculares, como a porcentagem de túbulos seminíferos e células de Leydig no parênquima testicular, diâmetro tubular e população de células espermatogênicas (França, 1987; Harayama et al., 1991; França et al., 2000; Avelar et al., 2010). Este momento é marcado também pela estabilização das concentrações plasmáticas de testosterona (França et al., 2000).

Durante o desenvolvimento testicular, as células de Sertoli apresentam duas fases funcionalmente distintas, denominadas de fase de proliferação e fase de maturação. A fase de proliferação corresponde ao período pré-púbere, no qual as células de Sertoli proliferam ativamente. Durante essa fase, são observados dois momentos marcantes de divisão celular. O primeiro compreende o período do nascimento até os 30 dias de idade, principalmente durante os primeiros 15 dias pós-nascimento

(McCoard et al., 2003; Avelar et al., 2010), quando ocorre o aumento de aproximadamente seis vezes no número de células de Sertoli por testículo. O segundo momento é observado entre três e quatro meses de idade para a maioria das raças, no período pré-puberdade, quando se observa um aumento de quase 100% no número de células de Sertoli por testículo. Estes períodos de maior proliferação das células de Sertoli coincidem com níveis plasmáticos mais elevados de FSH (França et al., 2000). O encerramento da atividade mitótica das células de Sertoli define o início da fase de maturação, caracterizada pela diferenciação destas células. Nesta fase, alguns eventos relacionados às funções das células de Sertoli passam a ser observados, como a formação do lúmen tubular devido secreção de fluidos pelas células de Sertoli, desenvolvimento do citoesqueleto e filamentos de actina relacionados às especialidades destas células, formação das junções de oclusão responsáveis pelas barreiras de células de Sertoli e proliferação de espermatócitos primários (Russel et al., 1989; França et al., 2000; Ford e Wise, 2011; Avelar et al., 2010).

As células de Leydig se encontram completamente diferenciadas após o nascimento (França et al., 2000; França et al., 2005), sendo observadas, durante o desenvolvimento pós-natal, duas fases de proliferação destas células. A primeira ocorre durante o período perinatal compreendido entre o nascimento e 30 dias de vida e a segunda, entre o início da puberdade até a idade adulta. Ambas as fases coincidindo com o aumento das concentrações plasmáticas de testosterona (França et al., 2000).

3.4. Estrutura testicular e espermatogênese em suíno

3.4.1 Anatomia dos testículos

Os testículos são os órgãos do sistema genital masculino responsáveis pela produção de espermatozoides e do hormônio sexual masculino testosterona. Na espécie suína, os testículos estão localizados no interior do escroto, estrutura formada pela pele da parede ventral do abdômen, que se encontra na região perineal, não sendo pendular como em outras espécies de animais domésticos. Apresentam posição oblíqua com o eixo longo direcionado dorso caudalmente. A borda livre do testículo, associada à cabeça do epidídimo, se encontra em posição crânio-ventral, enquanto a borda fixada à cauda do epidídimo, porção mais alta, em posição caudo-dorsal (Dyce et al., 2010)

Dentro do compartimento escrotal, os testículos estão localizados em uma cavidade serosa revestida por uma evaginação do peritônio, a túnica vaginal (parietal e visceral), o que permite certo grau de mobilidade do órgão no interior do escroto (Gartner e Hiatt, 2007).

3.4.2 Histologia do testículo

O parênquima testicular é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso modelado denominada de túnica albugínea (Setchell, 1977). A túnica albugínea emite septos fibrosos que dividem todo o órgão em lóbulos, sendo o espaço interlobular muito abundante na espécie suína (Junqueira e Carneiro, 2008).

Assim como em outros mamíferos, o parênquima testicular do suíno sexualmente maduro é formado por dois compartimentos principais: o compartimento intersticial e o compartimento tubular. O

interstício é composto por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e por um grande número de células de Leydig, produtoras de esteroides (França e Chiarini-Garcia, 2000).

O compartimento tubular consiste na túnica própria, no epitélio seminífero, especializado, e no lúmen tubular. Os túbulos seminíferos são estruturas longas e convolutas, desprovidas de inervação e vascularização, que compreendem aproximadamente 90% do testículo. Entretanto em suínos, devido à grande abundância de células de Leydig, essa proporção é reduzida (Setchell, 1977; França e Chiarini-Garcia, 2000). França et al. (2005) demonstraram uma proporção de aproximadamente 85% de túbulos seminíferos e 10% de células de Leydig no testículo de suínos em contraste a, aproximadamente 90% de túbulos seminíferos e 4% de células de Leydig nos testículos de pequenos roedores de laboratório. A túnica própria reveste externamente o epitélio, sendo formada por uma camada externa de tecido conjuntivo, uma camada mais interna composta por células musculares lisas – células peritubulares mioides– e a membrana basal, que por sua vez, é formada pelas células peritubulares mioides juntamente com as células de Sertoli, dando suporte para o epitélio seminífero. As células peritubulares mioides são células contráteis responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão de espermatozoides no lúmen tubular (Setchell, 1977; França e Chiarini-Garcia, 2000; Gartner e Hiatt, 2007). Adicionalmente, apresentam um importante papel no processo espermatogênico, devido à produção de fatores que modulam a função de Sertoli (Skinner et al., 1985).

No interior dos túbulos seminíferos, o epitélio seminífero é constituído pelas células de Sertoli e por três diferentes gerações de células germinativas que se encontram inseridas e associadas às criptas do citoplasma das células de Sertoli: espermatogônias, espermatócitos e espermátides. A orientação das células germinativas no epitélio seminífero ocorre de acordo com o grau de diferenciação destas, sendo as células mais avançadas localizadas mais próximas do lúmen tubular (França e Chiarini-Garcia, 2000).

3.4.3 Espermatogênese e Esteroidogênese

O processo espermatogênico em suínos, assim como em outros mamíferos, é composto por três fases que são distintas funcional e morfológicamente: 1- espermatogonial (proliferativa ou mitótica); 2- espermatocitária (meiótica) e 3- espermiogênica (diferenciação), todas as fases estão sob o controle de mecanismos regulatórios específicos (Sharpe, 1994; Russell, 1990; Rooij e Russell, 2000). Nos suínos estão presentes três classes de espermatogônias: espermatogônia do tipo A, espermatogônia intermediária (In) e a espermatogônia do tipo B (Costa et al., 2013). As fases meiótica e espermiogênica são muito similares entre os animais. Há um aumento considerável no tamanho da célula e isto é observado nos espermatócitos primários de suínos, de pré- leptóteno à diplóteno. Este aumento é seguido por um decréscimo no tamanho da célula durante a espermiogênese, de tal forma que, em ratos, por exemplo, devido a mudanças na cromatina e na condensação nuclear, o volume nuclear antes da espermição permanece apenas 2% do volume inicial (uma diminuição de 500 para 10 mm³ (Russell e França, 1995).

No entanto, deve ser mencionado que características específicas podem ser encontradas em diferentes espécies no que diz respeito à forma e o tamanho do acrossoma, o tamanho do flagelo, e a forma do núcleo da espermátide madura, o qual em suínos é espatulada (Eddy e O'Brien, 1990). O volume das células de Sertoli, nos túbulos seminíferos, varia consideravelmente entre os mamíferos (de

15% no camundongo para 40% em humanos) (Russell et al., 1990). Em geral, espécies com baixa proporção de células de Sertoli nos túbulos seminíferos, como: camundongo, rato, e hamster, estes animais possuem uma alta eficiência da célula de Sertoli, resultando em alta produção espermática diária (eficiência espermatogênica) (Russell et al., 1990).

Como em outros mamíferos, as células germinativas de suínos estão arranjadas em associações específicas, conhecidas como estádios, os quais são segmentados (apenas um estágio por seção transversal do túbulo) assim como em outros mamíferos investigados (França e Russell et al., 1998) e helicoidal em alguns primatas, incluindo os humanos (Sharpe, 1994). Estas associações celulares podem ser identificadas com base em características morfológicas do núcleo das espermátides, permitindo assim a identificação dos oito estádios do ciclo como já foi demonstrado para os suínos (Swierstra, 1968; França e Cardoso, 1998)

A duração total da espermatogênese baseada em 4,5 ciclos espermatogênicos é de aproximadamente de 30-75 dias em mamíferos (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998; Sharpe, 1994) e está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). Embora, possam existir diferenças entre linhagens e raças em membros da mesma espécie, a duração dos ciclos espermatogênicos tem sido, geralmente, considerada constante para determinadas espécies. Em varrões, cada ciclo espermatogênico dura em média 8,6 – 9,0 dias, onde a duração total da espermatogênese é de aproximadamente 40 dias, ou seja, cerca de duas semanas para cada fase da espermatogênese (Swierstra, 1968; França e Cardoso, 1998).

A célula de Sertoli exerce uma série de funções importantes na espermatogênese. Dentre estas podemos destacar: suporte e nutrição das células germinativas, compartimentalização do epitélio seminífero pelas junções de oclusão para fornecer proteção e um ambiente especializado para o desenvolvimento das células germinativas, liberação de espermátides maduras no lúmen tubular, secreção de fluidos, proteínas e vários fatores de crescimento, fagocitose de células germinativas degeneradas e do excesso de citoplasma remanescente das espermátides liberadas (Russell et al., 1993).

3.4.4 Ciclo do Epitélio Seminífero

Durante o processo espermatogênico, as células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento se organizam em quatro ou cinco camadas celulares, formando associações específicas entre si, denominadas estádios. As associações celulares ocorrem em uma sequência específica, sendo que um mesmo estágio se repete em uma determinada área do epitélio seminífero com o decorrer do tempo (Clermont, 1972). Em suínos, é observado apenas um estágio por seção transversal de túbulo seminífero (França et al., 2005).

Dois métodos foram descritos para a identificação dessas associações celulares no testículo do suíno: o método do sistema acrossômico, descrito para a espécie suína por França et al. (2005), baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico nas espermátides recém-formadas; e o método da morfologia tubular, baseado simultaneamente nas características morfológicas do núcleo das espermátides e a posição dos núcleos das espermátides mais avançadas no epitélio seminífero (Swierstra, 1968). Este último

método determina oito estádios do ciclo do epitélio seminífero. Neste trabalho, apenas o método da morfologia tubular será descrito por ter sido utilizado na metodologia de análise morfométrica.

A descrição dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero, de acordo com o método da morfologia tubular, foi realizada para diferentes raças de suínos de forma muito similar por diversos autores (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Entretanto, devido à ocorrência de pequenas diferenças quanto ao início e término de alguns estádios e quanto à classificação e presença dos tipos espermatogoniais também em alguns estádios, tal descrição será apresentada de acordo com os achados mais frequentes:

- O *estádio 1* se estende desde a ausência das espermátides alongadas no lúmen até o início da alongação do núcleo destas células. Nesse estágio, apenas são observadas espermátides arredondadas, formando quatro a seis camadas no compartimento adluminal do epitélio seminífero. Próximas à membrana basal, são observadas espermatogônias tipo A e espermátócitos primários em transição de pré-leptóteno para leptóteno. Acima da camada de espermátócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno são observadas uma ou duas camadas de espermátócitos primários em paquíteno (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). A frequência observada para este estágio é de aproximadamente 10,8% (Ortavant et al., 1977).

- O *estádio 2* se inicia com o alongamento do núcleo das espermátides e termina com a formação dos feixes de espermátides alongadas. Nesse estágio, são observadas espermatogônias do tipo A e espermátócitos primários na fase de zigóteno e paquíteno da prófase meiótica (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Para este estágio, a frequência observada é de aproximadamente 14,4% (Ortavant et al., 1977).

- O *estádio 3* compreende o momento do ciclo entre a formação dos feixes de espermátides alongadas no citoplasma das células de Sertoli e o aparecimento de figuras de meiose. As espermátides alongadas formam os feixes com seus núcleos direcionados para os nucléolos das células de Sertoli na base do túbulo seminífero. São observadas espermatogônias do tipo A, espermátócitos primários em zigóteno e em transição da fase de paquíteno para diplóteno da prófase meiótica (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998 e Garcia-Gil et al., 2002). A frequência observada para este estágio é de aproximadamente 3,5 % (Ortavant et al., 1977).

- O *estádio 4* se estende do início da primeira divisão meiótica ao término da segunda divisão meiótica caracterizado pela presença das figuras de meiose da primeira e segunda divisão e espermátócitos secundários. Estão ainda presentes espermatogônias do tipo A, espermátócitos primários em transição da fase de zigóteno para paquíteno da prófase meiótica e espermátides alongadas. Os feixes de espermátides alongadas se localizam nas criptas do citoplasma das células de Sertoli no meio do epitélio seminífero (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Para este estágio, a frequência observada é de aproximadamente 11,6 % (Ortavant et al., 1977).

- No *estádio 5*, são observadas duas gerações de espermátides: arredondadas e alongadas. Os feixes de espermátides alongadas se localizam nas criptas do citoplasma das células de Sertoli, na porção mais basal do epitélio seminífero. São observados espermátócitos primários em paquíteno e espermatogônias

do tipo A e intermediárias (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). A frequência observada para este estágio é de aproximadamente 8,9 % (Ortavant et al., 1977).

- O *estádio 6* apresenta a mesma população celular do estágio 5. Entretanto, observa-se o início da migração dos feixes de espermátides alongadas em direção ao lúmen do túbulo seminífero. Nesse momento, os feixes são menos evidentes. As espermatogônias intermediárias são observadas em maior número, podendo ser observadas espermatogônias tipo B (Swierstra, 1968; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998). A frequência observada para este estágio é de aproximadamente 20,3 % (Ortavant et al., 1977).

- No *estádio 7*, as espermátides alongadas terminam a migração em direção ao lúmen e se dissociam. São observados os primeiros corpos residuais. Espermatogônias tipo A e tipo B, além de espermátides arredondadas podem ser observados (Swierstra, 1968; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998). Para este estágio, a frequência observada é de aproximadamente 18,5 % (Ortavant et al., 1977).

- O *estádio 8* se estende do momento em que as espermátides alongadas estão localizadas no lúmen do túbulo ao seu completo desaparecimento da porção luminal. A principal característica deste estágio é a liberação das espermátides alongadas no lúmen, com a presença de corpos residuais na superfície luminal do epitélio seminífero e no citoplasma das células de Sertoli em direção à base do túbulo. São observadas espermatogônias tipo A, espermátides arredondadas e espermátides arredondadas. Ocasionalmente podem ser observadas espermatogônias do tipo B (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Para este estágio, a frequência observada é de aproximadamente 12,0 % (Ortavant et al., 1977).

A frequência dos estádios pode variar entre as diferentes raças da espécie suína, como foi demonstrado em estudos realizados para as raças Yorkshire e Lacombe (Swierstra, 1968), Meishan (Okwun et al., 1996), Piau (França et al., 1998) e Landrace (Garcia-Gil et al., 2002). O intervalo compreendido entre a ocorrência de um determinado estágio e o seu reaparecimento em um mesmo ponto do epitélio seminífero, ou seja, uma série completa de associações celulares é denominada ciclo do epitélio seminífero (Clermont, 1972). Em torno de 4,5 ciclos são necessários para que a espermatogênese se complete a partir do surgimento da espermatogônia A (Russell et al., 1990). Para uma mesma espécie, a duração do ciclo espermatogênico é considerada constante (Clermont, 1972), muito embora exista uma pequena variação entre raças e, possivelmente, genéticas de suínos, como observados em alguns estudos (Swierstra, 1968; Okwun et al., 1996; França et al., 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Cada ciclo do epitélio seminífero, na espécie suína, apresenta a duração média de 8,5 a 9 dias, sendo a duração total da espermatogênese de aproximadamente 38,5 a 40 dias (Swierstra, 1968; França et al., 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Neste período, cada fase da espermatogênese apresenta duração de aproximadamente duas semanas (França et al., 2005). Devido a curta duração do ciclo do epitélio seminífero e também maior eficiência da célula de Sertoli, os suínos apresentam uma elevada eficiência da espermatogênese quando comparados a outras espécies de mamíferos (França et al., 2005).

3.5 Inseminação artificial e qualidade espermática

A inseminação artificial (IA) é uma técnica de reprodução assistida que consiste na deposição do sêmen nas vias genitais da fêmea por meio de um cateter (Ferreira, 1986), sendo utilizada em casos em que os espermatozoides não conseguem atingir as tubas uterinas ou simplesmente o indivíduo opta por esse procedimento. Esta técnica consiste em transferir, para a cavidade uterina, os espermatozoides previamente recolhidos e processados, com a seleção dos espermatozoides morfológicamente normais e móveis.

A primeira IA registrada foi realizada em 1779, quando o italiano Lázaro Spalanzan colheu o sêmen de um cachorro e o aplicou em uma cadela em cio, a qual pariu três filhotes 62 dias após a realização da técnica (Foote, 2002). Em suínos, os primeiros relatos de IA datam de 1926 – 1940 em países como Rússia, Estados Unidos, Japão e Europa (Weitze, 2000; Foote, 2002). Por volta dos anos de 1990, os registros revelaram que a grande maioria dos suínos que nascia na Europa foram provenientes do uso dessa técnica (Knox, 2016). Nos anos 2000, ocorreu um aumento exponencial do uso da IA em todo o mundo, de tal forma que a quase totalidade das fêmeas em reprodução eram inseminadas (Weitze, 2000). Hoje, não há dúvidas de que a eficiência da produção comercial de suínos esteja ligada ao uso desta técnica (Knox, 2016).

Inúmeras são as vantagens que impulsionaram a ampla utilização da IA como: ganhos genéticos, redução nos custos de cobertura e de mão de obra, melhor utilização das instalações, controle de doenças, seleção de ejaculados que apresentasse maior qualidade espermática, bem como redução do número de reprodutores alojados nas granjas (Flowers e Esbenshade, 1993; Wentz et al., 2000). Dentre todas as vantagens citadas anteriormente, a mais importante delas é a redução da proporção de machos em relação ao número de fêmeas atendidas. No caso da monta natural, são necessários 5% de machos, já para IA essa proporção é reduzida para 0,5 a 1% (Wentz et al., 2000).

Existem vários tipos de IA e dentre elas podemos citar: 1) cervical (convencional), 2) intrauterina (pós-cervical) e 3) intrauterina profunda. Em se tratando de IA cervical, o cateter é introduzido na vagina após a realização de uma higienização prévia da vulva e é direcionado até a entrada da cérvix. Neste local, o cateter é fixado e o sêmen ali depositado. O volume das doses inseminantes varia de 90-100 mL e a concentração é de $2,5-3,0 \times 10^9$ espermatozoides/mL (Knox, 2016). Até pouco tempo atrás, a IA convencional atendia às exigências do sistema de produção de suínos. Assim, novas tecnologias foram desenvolvidas e permitiram utilizar um menor número de espermatozoides por dose inseminante, baixando os custos de uma dose de sêmen e permitiram a melhor utilização de machos de alto mérito genético (Johnson, 1988).

Para a IA intrauterina (pós-cervical), o local de deposição dos espermatozoides neste procedimento é o corpo uterino. A mudança do local de deposição do sêmen apresenta algumas vantagens, dentre elas: redução de até 50% do número de espermatozoides e do volume da dose inseminante, minimização das perdas espermáticas e, principalmente, a maximização do uso de machos geneticamente superiores (Martinez et al., 2002; Mezalira et al., 2005). O principal desafio para esta

técnica é o canal cervical, caracterizado pela presença dos pulvinos cervicais. Vários instrumentos foram desenvolvidos a fim de facilitar a passagem pelo canal cervical e depositar o sêmen no corpo do útero. Assim, a introdução de uma sonda ao longo do colo uterino, passando pelos pulvinos cervicais até alcançar o corpo do útero permitiu que o sêmen fosse ali depositado (Mezzalira et al., 2005).

Enquanto na inseminação intrauterina o sêmen é depositado 20 cm depois da entrada da cérvix, podendo se direcionar para ambos os cornos uterinos, na inseminação intrauterina profunda, o sêmen pode ser depositado profundamente na junção útero-tubárica de apenas um dos cornos. Essa técnica ainda não está muito divulgada, não sendo assim muito utilizada como rotina na prática. Além disso, comparando os dados reprodutivos das inseminações cervical e a intrauterina profunda, verifica-se que não são significativamente diferentes, indicando que a inseminação intrauterina não tem efeito sobre o potencial de fertilidade das fêmeas (Bolarin, 2006).

Contudo a IA intrauterina profunda permite uma redução de até 20 vezes o número de espermatozoides por dose inseminante, podendo chegar a 100 milhões de espermatozoides em 5 mL, sem nenhum efeito sobre a taxa de parto e tamanho da leitegada (Martinez et al., 2002). Um cateter, muito leve e fino com 1,2 m de comprimento, é introduzido no cérvix da porca até o útero, muito próximo da junção útero-tubárica. Mesmo o cateter sendo introduzido em um dos cornos uterinos, a fecundação ocorre em ambas as tubas uterinas, mostrando que ocorre a migração dos espermatozoides de um corno para o outro (Almeida et al., 2014).

Para que todas essas técnicas de IA atinjam o seu propósito, primeiramente o sêmen do macho deve ser avaliado a fim de predizer a fertilidade. Neste sentido, alguns parâmetros de qualidade do ejaculado já foram determinados como referência. A rotina de avaliação espermática do ejaculado passa pelas seguintes análises: volume, motilidade e vigor espermáticos, concentração espermática, número de células no ejaculado e morfologia (Bonet et al., 1993; Gadea, 2005) e sua execução já foi previamente descrita por Bortolozzo et al., (2005). Os parâmetros para a espécie suína estão apresentados na Tabela 1, conforme informações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).

Tabela 1: Características quantitativas e qualitativas do sêmen de machos suínos jovens e adultos, e limites para normospermia

Características	Jovens (8 meses)	Adultos (> 12 meses)	Limites
Volume (mL)	190-225	200-350	100
Motilidade espermática	75%	80%	70%
Concentração espermática (x10 ⁶ /mL)	180-200	200-400	—
N ^o total de espermatozoides (x10 ⁹)	35-45	30-60	10
Espermatozoides morfológicamente alterados	20-25%	5-15%	20% (máx)

Adaptado do Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (1998)

Essas análises podem ser feitas visualmente ao microscópio óptico ou por meio de sistemas computadorizados, como CASA (Computer Assisted Semen Analysers). O sistema CASA é o método mais eficiente para exame andrológico, uma vez que elimina o efeito do analista e tem correlação altamente positiva com as análises manuais (Vale Filho et al., 2010). Vários autores citados por Vertegen et al. (2002) descreveram variações de 80% para o mesmo ejaculado quando analisados manualmente em

laboratórios diferentes. Assim, o sistema CASA permite a comparação e classificação de ejaculados diferentes para posterior prognóstico de fertilidade.

O consumo de carne suína vem aumentando gradativamente em todo o mundo. Para atender a tal demanda, a sistema de produção de suínos deve aumentar a produção de animais de forma sustentável, altamente eficiente e o menos degradante possível para o meio ambiente (FAO, 2003). Assim sendo, os estudos que avaliam os efeitos da RIUC sobre o sistema genital de machos suínos tornam-se cada vez mais importantes para compreender sua origem e tentar minimizar seus efeitos, para dessa forma preservar a eficiência do sistema de produção suinícola.

4. Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pelo antigo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), protocolo nº 65/2011. Atualmente este comitê é conhecido como Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

4.1 Local e período

O experimento foi realizado na Granja Paraíso, núcleo filial de multiplicação genética de suínos da empresa Agrocerec PIC®, no período compreendido entre novembro de 2011 a agosto de 2012. A granja localiza-se no município de Patos de Minas/MG, à margem da rodovia BR-365, Km 429, na região do Alto Paranaíba (Mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba).

4.2 Instalações e manejo do sistema de produção

A Granja Paraíso é uma granja multiplicadora de ciclo completo com sistema de produção em sítios segregados, apresentando três unidades de produção denominadas Sítio, Nest I e Nest II. Na unidade de produção Sítio, estão localizados os setores de Reposição, Gestação e Maternidade e em ambas as unidades Nest I e Nest II, encontram-se os setores de creche, recria e terminação. Durante o período do experimento, o plantel era composto por 4007 fêmeas reprodutoras, com um total de 107.189 leitões desmamados/ano.

No setor de gestação, ao término do período de aleitamento, as matrizes eram alojadas em gaiolas individuais, para posteriormente serem submetidas à inseminação artificial. O período médio de descanso após a desmama era de cinco dias, sendo as fêmeas inseminadas 24 horas após a primeira detecção de cio, seguindo um protocolo de 24, 48 e 72 horas, quando ainda se observava manifestação de cio pela fêmea. A confirmação da gestação era realizada entre 45 e 50 dias pós-inseminação, quando então, as fêmeas eram transferidas para baias coletivas onde permaneciam até o período pré-parto. Do primeiro dia pós-desmame ao sexto dia pós-inseminação, as fêmeas consumiam ração peletizada para gestantes *ad libitum*. A partir do sétimo dia pós-inseminação, o fornecimento de ração passava a ser controlado de acordo com o tempo de gestação, sendo do 7^o ao 74^o dia, 2,0 a 2,5 kg de ração/dia; do 75^o ao 89^o dia, 3,0 kg de

ração/dia; e do 90^o ao 110^o dia de gestação, 3,0 a 3,3 kg de ração/dia. As matrizes eram conduzidas ao setor de maternidade, em média, quatro a cinco dias antes da data prevista para o parto. Após desinfecção das salas da maternidade, era realizado vazio sanitário, por um período de dois dias. Do 110^o dia de gestação até o dia do parto, as fêmeas recebiam, de forma controlada, ração farelada para lactantes, sendo que após o parto até a desmama, a ração passava a ser oferecida *ad libitum*.

A granja não utilizava protocolo de indução de parto, entretanto, o tempo máximo de gestação permitido para porcas multíparas era de 115 dias, quando então se realizava a aplicação de prostaglandina F2 α (Lutalyse®) para induzir o parto. Imediatamente após o nascimento, era realizada a limpeza e secagem dos leitões, sendo, em seguida, direcionados e estimulados a mamar o colostro. Não eram utilizadas como medidas de manejo a cura de umbigo e o corte de dentes. Após um período mínimo de 12 horas de colostragem, eram realizados o corte de cauda, o registro dos animais e a homogeneização de leitegada. O registro dos animais era realizado com tatuagem, que continha os códigos da linhagem do leitão, da linhagem da mãe e o dia do nascimento. Os leitões de baixo peso ao nascimento eram transferidos para mães de leite de 1^o ordem de parto e recebiam, durante os primeiros dias de vida, manejo diferenciado, principalmente o estímulo constante para mamada.

Os leitões eram desmamados em média aos 21 dias de idade, quando eram levados para o setor de Creche nos Nests I ou II, onde passavam por uma nova homogeneização de lote. As baias tinham capacidade para 50 animais, sendo evitada a mistura de lotes nas transferências para os setores subsequentes. O período de Creche era de 42 dias, compreendendo animais do 21^o até ao 63^o dia de vida. Durante esse período, os leitões recebiam ração peletizada triturada *ad libitum*, dividida em quatro tipos de acordo com a idade: pré- I, pré- II, Inicial I e Inicial II. A transferência para a Recria ocorria aos 63 dias de idade, onde permaneciam por 42 dias. Na Recria, os animais recebiam a ração Recria I, *ad libitum*, dos 65 aos 90 dias de idade, e ração Recria II, também *ad libitum*, dos 91 aos 105 dias, quando eram transferidos para o setor de terminação, onde permaneciam até serem vendidos como reprodutores ou para o abate. Nesse período, era fornecida ração para Terminação I dos 106 aos 120 dias, Terminação II, dos 121 aos 130 dias de vida, e Final, dos 131 dias até o abate.

No setor de terminação, era realizada a seleção dos machos reprodutores, nas linhagens desenvolvidas para reprodução, a partir dos 140 dias de vida. Eram avaliadas as seguintes características: peso corporal, sendo o peso mínimo de 80 kg e o máximo de 150 kg, a conformação corporal, aprumos, conformação testicular, espessura de toucinho, profundidade de lombo e classificação do pernil (escore de 2 a 10).

4.3 Amostragem dos animais e grupos experimentais

Para a execução do presente trabalho, foram selecionados 24 leitões machos, de composição racial Landrace, Large White e Puro sintético (Landrace, Large White e Duroc), originadas de cruzamento entre fêmeas da linhagem 1062 x machos AG1020 ou 1210. Os animais utilizados no experimento eram provenientes da linha fêmea, ou seja, filhos de porcas cujas fêmeas seriam destinadas à reprodução e os machos, ao abate.

Para garantir a superlotação uterina e a consequente ocorrência do crescimento intrauterino retardado, foram utilizadas fêmeas entre a 4^o e a 6^o ordem de parição e leitegadas compostas por 10 a 15 leitões (Alvarenga et al., 2013). Em cada leitegada, foi selecionado um par de leitões que foram distribuídos uniformemente entre dois grupos experimentais, de acordo com o peso ao nascimento, sendo um dos animais de alto peso ao nascimento (AP), peso variando entre 1,8 a 2,15 kg, e o outro animal, de baixo peso ao nascimento (BP), peso variando entre 0,75 a 1,1 kg.

Para estabelecer as faixas de peso que representariam cada grupo experimental, foram pesados imediatamente após o nascimento aproximadamente 1000 (mil) leitões do plantel, originados da mesma linhagem materna. Dessa forma, foram calculados a média (μ) e o desvio-padrão (σ) da variável peso ao nascimento. As faixas de peso de cada grupo foram determinadas como sendo: $\mu + \sigma$ a $\mu + 2\sigma$, para o grupo AP e $\mu - 2\sigma$ a $\mu - \sigma$, para o grupo BP.

Com o objetivo de evitar possíveis efeitos do peso de leitegada sobre o desenvolvimento fetal (Foxcroft, 2006), somente foram selecionados leitões oriundos de leitegadas de peso médio. Para definir o intervalo de confiança da média (95%) utilizado como critério de seleção as leitegadas, foi realizado um levantamento do peso médio de leitegada obtido e registrado na granja durante o ano anterior. Dessa forma, foi definido o intervalo para peso médio de leitegada, sendo este de 1,250 kg a 1,650 kg. Ao término da seleção dos animais, foram formados dois grupos experimentais, compostos por 12 animais AP e 12 BP, submetidos à orquiectomia aos 300 dias de idade. A idade escolhida para a castração foi determinada com o objetivo de se avaliar os testículos dos animais no período pós-puberal, tomando como base facilidades e limitações das instalações e manejo dos animais.

4.4 Manejo dos animais

Os procedimentos adotados no parto e posterior manejo dos leitões foram os mesmos utilizados na granja, descritos anteriormente. Imediatamente após o nascimento e antes da mamada do colostro, foi realizada a pesagem dos leitões e obtidas as seguintes medidas biométricas, por meio da utilização de uma fita métrica: comprimento cabeça-cauda, circunferência torácica e circunferência abdominal.

Após a pesagem e avaliação biométrica, os leitões foram identificados com um número na região dorsal, referente à ordem de nascimento. Durante os períodos de creche, recria e terminação, os animais permaneceram no fluxo normal de produção, sendo submetidos à rotina diária da granja. Devido à homogeneização de lotes realizada na desmama, os grupos de alto e baixo peso ao nascimento permaneceram em baias separadas, com mesma densidade animal, até os 300 dias de idade. Nesse momento, os animais foram retirados do fluxo de produção da granja e transferidos para uma baia coletiva, com capacidade para 50 animais, previamente dividida ao meio por uma estrutura metálica removível. Os grupos experimentais foram mantidos separados, sendo cada grupo alocado em um lado da baia. A alimentação dos animais, neste período, manteve-se inalterada.

4.5. Coleta das amostras

4.5.1 Coleta de sêmen

Aos 170 dias de idade, os 24 animais foram retirados das baias de terminação e levados ao galpão de machos, onde permaneceram em gaiolas individuais por dois dias, quando se iniciou o

treinamento. Para tal, foram colocados em gaiolas próximas ao manequim para visualizar os animais que já estavam em coleta. Posteriormente, todos os machos, com aproximadamente 180 dias de idade, começaram a rotina de coleta quinzenal de sêmen, durante cinco semanas. Na sala de coleta, fazia-se o esvaziamento do divertículo prepucial, seguido de higienização do prepúcio com auxílio de papel toalha. Procedia-se à coleta por meio da técnica da Mão Enluvada (Bortolozzo et al., 2005), sendo o ejaculado acondicionado em caneco térmico próprio, protegido por um saco de coleta com filtro para separação da fração gelatinosa. Terminada a coleta, direcionava-se a fração rica do ejaculado ao laboratório para processamento das amostras.

4.5.2 Parâmetros corporais externos

Foram realizadas a pesagem dos animais em balança mecânica para suínos e a mensuração da biometria corporal - comprimento cabeça-cauda (CCC) - por meio da utilização de uma fita métrica. Para as aferições métricas aos 300 dias de idade, os animais foram sustentados em posição de estação.

As medidas biométricas CCC foram obtidas pela demarcação prévia de um ponto central no crânio, equidistante entre as bases da orelha e entre um ponto na altura dos olhos e a nuca. A partir da sobreposição da fita métrica ao ponto central do crânio, o CCC foi determinado pela distância compreendida entre o ponto central do crânio e a base da cauda.

4.5.3 Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico realizado nos animais aos 10 meses de idade, foi adotado o método de orquiectomia aberta (Turner e McIlwaith, 2002). Os animais foram submetidos à anestesia geral com cloridrato de xilazina a 2% e quetamina a 10%, na dose de 1,0 mg/kg e 5,0 mg/kg, respectivamente, ambas por via endovenosa. Posteriormente, foi realizada a aplicação de anestesia local na linha de incisão, com 20 mL de cloridrato de lidocaína a 2%. Realizou-se incisão longitudinal no escroto, e, em seguida na túnica vaginal. O cordão espermático foi obliterado por uma ligadura com fio categute cromado nº 4, e posteriormente seccionado caudalmente à ligadura, com o auxílio de uma tesoura, com o objetivo de causar o esgarçamento do tecido e hemostasia local. Após a remoção do testículo, foram aplicados, no interior do escroto, solução de gentamicina a 2% em solução fisiológica 0,5% e pó larvicida (Tanidil®), e, externamente, na área ao redor da incisão, spray repelente e cicatrizante. O mesmo procedimento foi realizado para o testículo contra-lateral. Os animais foram acompanhados durante os primeiros dez dias após a cirurgia, quando foram realizadas as aplicações de anti-parasitário (Ivermectina, Ivomec®), antiinflamatório (Flunixin meglumine, Flumegam®) e antibiótico (enrofloxacino, Kinetomax®).

4.5.4 Biometria testicular

Os testículos coletados foram identificados em direito e esquerdo, pesados em balança de precisão e mensurados, com o auxílio de um paquímetro (mm), para obtenção das medidas morfométricas largura, altura e comprimento. O volume testicular utilizado para comparação entre os dois grupos experimentais foi obtido pela multiplicação entre as três medidas: altura, largura e comprimento.

Para a obtenção do índice gonadossomático (IGS), parâmetro também utilizado para comparação entre os dois grupos experimentais, foi calculada a razão entre o peso médio dos testículos direito e esquerdo e o peso corporal, sendo o valor final obtido multiplicado por 100.

4.5.5 Análise Hormonal

Amostras de sangue (5 mL) foram coletadas, por meio de punção da veia jugular, em frascos com EDTA no momento de realização do procedimento de orquiectomia para a análise de concentração plasmática de testosterona.

4.6 Processamento das amostras

4.6.1 Análise de sêmen

A partir dos 180 dias de idade, 7 animais de ambos os grupos experimentais foram selecionados para a coleta de sêmen, sendo coletados 5 ejaculados por animal, a cada 15 dias de intervalo, para a análise de qualidade espermática (motilidade, vigor, concentração e morfologia). Todas as coletas foram realizadas pela mesma pessoa, sendo interrompidas antes dos animais atingirem os 300 dias de idade, por motivo de desativação do galpão no qual os animais estavam alojados. Na nova instalação, não havia possibilidade de realizar a coleta de sêmen. A coleta do sêmen foi realizada com um caneco térmico e escuro, após a realização da coleta, este era imediatamente encaminhado ao laboratório para realização dos testes. Foram realizadas análises de volume, concentração, motilidade e morfologia. Para determinação do volume, o conteúdo do caneco térmico foi pesado em balança digital considerando-se cada grama (g) correspondente ao volume do ejaculado. Para as demais análises, foram retiradas três alíquotas de sêmen, uma que seria utilizada para determinação da concentração, a segunda para avaliação da motilidade e vigor, e a última alíquota seria diluída em formol salina tamponada para a determinação da morfologia dos espermatozoides.

Para efetuar as análises de concentração, motilidade e vigor, o sêmen foi diluído com diluente aquecido a 37°C na proporção de 1:10, e colocado uma alíquota de 2mL da solução em um tubo eppendorf. Para as análises iniciais de motilidade e vigor, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula para observação ao microscópio óptico. Para a determinação do número de espermatozoides/mL (concentração), uma gota de sêmen foi colocada na câmara de contagem (câmara de Neubauer) para análise em microscópio de contraste de fase. Para a análise de morfologia, uma alíquota do sêmen foi diluída em formol salina tamponada, colocado em um tubo eppendorf e armazenada para análise ao final do mesmo dia. As análises foram feitas em preparação úmida, entre lâmina e lamínula, para observação ao microscópio óptico de campo claro com contraste de fase, utilizando aumento de 1000x. Foram observados 200 espermatozoides por amostra que foram classificados em defeitos maiores e menores, de acordo com Blom (1973).

4.6.2 Processamento histológico

Para as avaliações morfológicas e morfométricas, foram coletados fragmentos dos testículos de 1,0 a 2,0 mm de espessura, fixados por imersão em solução de glutaraldeído a 5% em tampão fosfato a 0,05M e pH 7,3, por 24 horas. Após esse período, as amostras foram armazenadas a 4^o C em solução

tampão fosfato a 0,05M e pH 7,3 até o momento da inclusão. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois (70%, 80%, 90%, 95%, 100%) e infiltrados em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica®), para posterior inclusão.

Após a polimerização dos blocos, foram obtidos cortes histológicos de 3 e 5µm de espessura, que, após terem sido distendidos em água destilada, foram transferidos para lâminas histológicas e secos em chapa quente a 60° C. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração histológica com azul de toluidina-borato de sódio (Chiarini-Garcia et al., 2011).

4.6.3. Avaliações histomorfométricas

Para as análises morfométricas foram selecionados, aleatoriamente, sete animais em cada grupo experimental.

• *Número de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero*

O número núcleos de células de Sertoli por secção transversal/túbulo seminífero foi determinado nos cortes histológicos de 5 µm de espessura, com aumento final de 1000x em microscópio Olympus BX-41. Foram avaliadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 por testículo (direito e esquerdo), de contorno o mais circular possível.

• *Diâmetro dos túbulos e altura do epitélio*

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio foram determinados nos cortes histológicos de 5µm de espessura, utilizando-se régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus BX-41, sendo que esta régua foi aferida com o auxílio de uma lâmina micrométrica de Leitz. Foram mensurados o diâmetro e a altura do epitélio de dez secções transversais por testículo (direito e esquerdo), de contorno o mais circular possível, selecionadas aleatoriamente por varredura horizontal do tecido, sendo as mensurações realizadas em aumento final de 400x.

• *Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular*

A análise das proporções volumétricas (Vv%) dos diferentes componentes do parênquima testicular foi realizada utilizando-se retículo com 21 linhas horizontais e 21 linhas verticais, totalizando 441 interseções (pontos), acoplado à ocular de um microscópio Olympus BX-41. Foram analisados, em cada testículo, cinco campos, selecionados aleatoriamente por varredura horizontal do tecido, perfazendo-se um total de 2.205 pontos. Para a obtenção das proporções volumétricas, foram contados, em aumento final de 400X, os pontos coincidentes sobre túbulos seminíferos e interstício.

• *Comprimento Total do Túbulo Seminífero - CTTS*

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo, e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (Dorst e Sajonski, 1974).

$$CT=VTS/\pi R^2$$

onde:

VTS= volume total dos túbulos seminíferos no testículo

πR^2 = área da secção transversal de túbulos seminíferos ($\pi = 3,14$ e $R = \text{diâmetro tubular}/2$)

• *Eficiência do processo espermatogênico*

A análise da eficiência do processo espermatogênico foi realizada por meio da contagem das células espermatogênicas do epitélio seminífero e do cálculo das razões entre os números corrigidos dessas células e entre estas e as células de Sertoli. Tal contagem foi realizada em 10 secções transversais de túbulo seminífero (cinco por testículo) de contorno o mais circular possível, contendo o estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, estágio este classificado de acordo com o método da morfologia tubular (Swiestra, 1968; França e Cardoso, 1998). A escolha do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero foi determinada pela presença, neste estágio, das células germinativas necessárias para o cálculo da eficiência do processo espermatogênico, sendo elas: espermatogônia do tipo A, espermatócito primário em pré-leptóteno, espermatócito primário em paquíteno e espermátides arredondadas. Também foram contados os nucléolos das células de Sertoli.

A partir dessas contagens celulares, foram obtidos os seguintes índices:

- *Índice mitótico* (determinar o coeficiente da eficiência mitótica das espermatogônias): n° espermatócito em preleptóteno/ n° espermatogônia A;
- *Índice meiótico* (verificar a taxa de apoptose/morte das células germinativas durante a divisão meiótica): n° espermátide arredondada/ n° espermatócito em paquíteno;
- *Índice apoptótico* (verificar a taxa de apoptose/morte durante a fase de espermatócito primário): espermatócito primário em paquíteno / Espermatócito primário em pré-leptóteno;
- *Capacidade de suporte da célula de Sertoli* (estimar o número de espermátides arredondadas suportadas por cada célula de Sertoli): n° espermátides arredondadas/ n° NCS;
- *Eficiência geral da espermatogênese* (determinar o número de espermátides arredondadas produzidas após um ciclo completo de fase proliferativa (espermatogonial) e meiótica (espermatocitária), estimando a eficiência global da espermatogênese): n° espermátides arredondadas/ n° espermatogônia A.

A população celular obtida por secção transversal de túbulo seminífero em estágio 1 foi corrigida pela espessura do corte histológico ($5\mu\text{m}$) e pelo diâmetro nuclear, utilizando a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura de corte} + \sqrt{\left(\frac{D2M}{2}\right)^2 + \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

Devido à forma irregular do núcleo da célula de Sertoli, os nucléolos foram utilizados para a obtenção dos números corrigidos desse tipo celular por secção transversal de túbulo seminífero. Adicionalmente, o diâmetro nuclear médio (DM), para cada tipo celular estudado, foi obtido pela média das medidas do diâmetro de 10 núcleos por animal, sendo cinco por testículo. Devido à sua forma irregular, o diâmetro do núcleo das espermatogônias foi calculado pela média entre os diâmetros maior e menor. A mensuração do diâmetro nuclear foi realizada, em aumento final de 1000X, utilizando-se uma régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus CX-31.

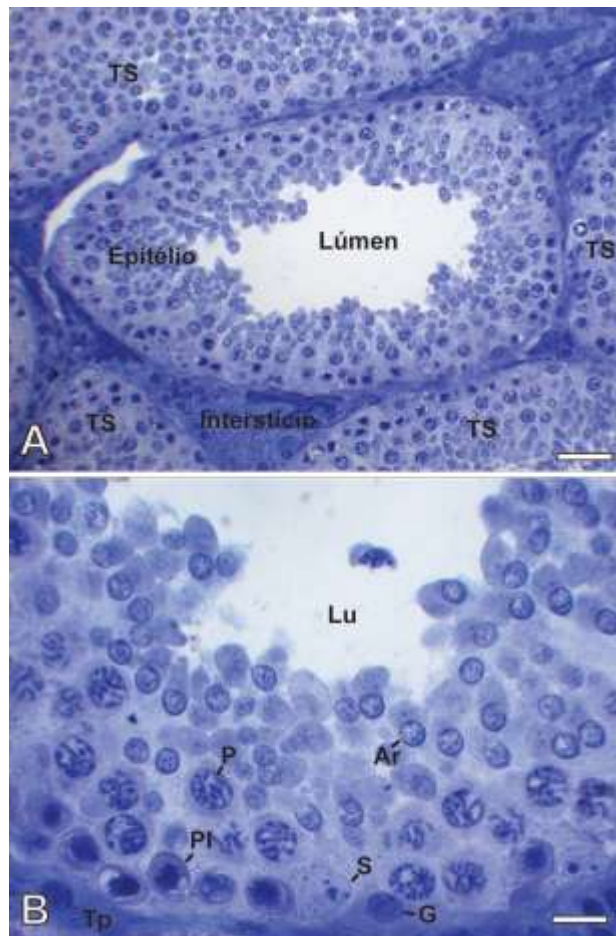


Figura 1. Fotomicrografia de luz de testículo suíno aos 10 meses de idade. (A) Parênquima testicular apresentando secção transversal de túbulo seminífero (TS) no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e tecido intersticial. (B) Detalhe do epitélio seminífero mostrando o tipos celulares presentes no estágio 1: S, célula de Sertoli; G, espermatogônia A; Pl, espermatócito primário em pré-leptóteno; P, espermatócito primário em paquíteno; Ar, espermatíde arredondada; Lu, lúmen; Tp, túnica própria. Barras: (A), 40 μ m e (B), 13 μ m.

4.6.4 Análise de Testosterona

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas à 1500g por 15 minutos, e o plasma armazenado a -20°C até o momento das análises. As concentrações de testosterona foram quantificadas

em duplicata por analisadores de imunoensaio COBAS E 411 (Roche Diagnostics USA), usando kit de imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA) (Roche Diagnostics USA) disponível comercialmente. De acordo com o fabricante, o anticorpo usado para a análise de testosterona teria menos de 1% de reação cruzada com outros andrógenos.

4.6.5 Análise Estatística

Todos os parâmetros avaliados foram testados quanto à normalidade antes da análise, usando o procedimento univariado do programa Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC, Estados Unidos). Os dados foram analisados como um delineamento inteiramente ao acaso e o modelo estatístico incluiu machos como fatores fixos e biometria e morfologia seminal como fatores aleatórios. Os efeitos do tratamento (peso ao nascimento) sobre peso corporal, medidas testiculares e parâmetros seminais foram analisados utilizando o modelo linear geral (GLM) do programa SAS, sendo as médias comparadas por meio do teste *T de Student*. As avaliações dos parâmetros seminais ao longo das coletas foram analisadas por análise de variância de medidas repetidas do programa SAS. A frequência de machos aprovados até a última coleta em cada grupo experimental foi comparada pelo teste de Qui-Quadrado. Associações importantes entre dados biométricos (pesos corporais e medidas testiculares) e reprodutivos (características seminais) foram avaliadas por análises de regressão e correlação. Em todas as análises, $P < 0,05$ foi considerado significativo e $P < 0,1$, tendência. Nas tabelas e gráficos, os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média.

4 Resultados e Discussão

5.1 Biometria corporal e testicular

Os valores médios referentes à biometria tanto corporal quanto testicular em ambos os grupos experimentais obtidos ao nascimento e aos 10 meses de idade estão apresentados na Tabela 2.

As medidas biométricas obtidas dos leitões ao nascimento foram maiores nos animais do grupo AP em comparação com os do grupo BP ($P < 0,05$). A presença de leitões pequenos ao nascimento caracterizados por baixo peso corporal e medidas biométricas reduzidas também foi demonstrada previamente por outros autores (Wang et al., 2010; Alvarenga et al., 2013; Auler et al., 2017), sendo comum seu relato em granjas comerciais em função das características genéticas das matrizes contemporâneas, que são hiperprolíficas. Há evidências de que para cada leitão a mais na leitegada o peso ao nascimento reduz em 35 gramas (Quiniou et al, 2002).

De forma interessante, aos 10 meses de idade, as diferenças observadas entre os dois grupos experimentais ao nascimento permaneceram para os parâmetros biométricos corporais avaliados, sendo ainda observadas diferenças para os parâmetros testiculares peso e volume.

Tabela 2. Dados biométricos obtidos ao nascimento e aos 10 meses e níveis plasmáticos de testosterona aos 10 meses de idade em leitões de alto (AP) e baixo (BP) pesos ao nascimento

Parâmetros	AP (n=12)	BP (n=12)	Significância
Nascimento			
PC (kg)	1,9 ± 0,4 ^a	0,9 ± 0,3 ^b	P < 0,05
DPC (cm)	5,1 ± 0,1 ^a	4,5 ± 0,1 ^b	P < 0,05
CA (cm)	22 ± 0,6 ^a	21 ± 0,7 ^b	P < 0,05
CCC (cm)	28 ± 0,7 ^a	24 ± 0,8 ^b	P < 0,05
CT (cm)	28 ± 0,7 ^a	25 ± 0,9 ^b	P < 0,05
10 meses			
PC (kg)	199 ± 3,6 ^a	168 ± 4,4 ^b	P < 0,05
DPC (cm)	15,7 ± 0,4 ^a	15,2 ± 0,5 ^b	P < 0,05
CA (cm)	139 ± 2,0 ^a	131 ± 2,6 ^b	P < 0,05
CCC (cm)	132 ± 0,8 ^a	124 ± 1,1 ^b	P < 0,05
CT (cm)	132 ± 1,6 ^a	128 ± 2,1 ^b	P < 0,05
PT (g)	458 ± 17 ^a	352 ± 21 ^b	P < 0,05
IGS	0,23 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,01 ^a	NS
VT (cm ³)	727 ± 45 ^a	546 ± 54 ^b	P < 0,05
Testosterona ng/mL	4,3 ± 1,0 ^a	4,5 ± 1,3 ^a	NS

Valores expressos como média ± erro-padrão. PC: peso corporal; DPC: Diâmetro bi-parietal da cabeça; CA: Circunferência abdominal; CCC: Comprimento cabeça-cauda; CT: Circunferência torácica; PT: Peso testicular; IGS: Índice gonadossomático (peso testicular/peso corporal x 100); VT: volume testicular.^{ab}Médias com letras distintas na mesma linha diferem (P < 0,05); NS: não significativo.

Contudo, o índice gonadossomático (IGS) foi semelhante entre ambos os grupos experimentais. A similaridade observada entre tal índice nos animais AP e BP retrata a proporcionalidade existente entre os pesos corporal e testicular, ou seja, animais mais leves apresentam testículos também mais leves, conforme resultados descritos por Auler et al. (2017).

Para se prever o efeito do peso ao nascimento sobre o desenvolvimento corporal futuro dos animais, foram feitas correlações entre as características biométricas neonatais e aos 10 meses de idade. Assim, os pesos ao nascimento e aos 10 meses apresentaram fortes correlações com CA ($r = 0,58$; $P < 0,05$ e $r = 0,75$; $P < 0,05$); CCC ($r = 0,69$; $P < 0,05$ e $r = 0,94$; $P < 0,05$) e CT ($r = 0,62$; $P < 0,05$ e $r = 0,87$; $P < 0,05$), respectivamente ao nascimento e 10 meses. Esses dados comprovam que animais maiores ao nascimento serão os animais com melhor desenvolvimento pós-natal, pois além de ganharem mais peso diariamente durante o ciclo de produção, apresentarão maiores medidas biométricas.

Os leitões AP apresentaram maiores peso e volume testiculares em relação aos animais BP aos 10 meses de idade. Maiores pesos e volumes testiculares em machos de diferentes pesos ao nascimento também foram descritos por outros autores em idades diversas. Por exemplo, Almeida et al. (2009) relatou essa diferença em leitões aos 7 dias de idade, Lin et al. (2017) em machos de 12 meses e Auler et al. (2017) aos 8 meses de idade.

Também foram feitas, correlações do peso corporal dos animais aos 10 meses de idade com o peso e volume testiculares. Houve correlação positiva do peso corporal aos 10 meses com o peso testicular ($r = 0,74$; $P < 0,05$) e com o volume testicular ($r = 0,60$; $P < 0,05$). Esses dados comprovam evidências anteriores de que animais maiores ao nascimento, à desmama e à puberdade apresentam testículos maiores (Wolf, 2009).

O peso ao nascimento não afetou os níveis plasmáticos de testosterona, como também foi observado por Lin et al. (2017) e Auler et al. (2017). Isto sugere que a maturidade sexual não foi comprometida pelo peso ao nascer, fato este comprovado pelas avaliações seminais, evento totalmente andrógeno-dependente. Neste contexto, há evidências de que machos com menos libido apresentaram menor concentração de testosterona plasmática (Flowers, 2008; Oberlender et al. 2010).

5.2 Análise de sêmen

Os parâmetros seminais avaliados durante as coletas de sêmen, em intervalos de 15 dias, nos animais AP e BP estão apresentados na Tabela 3.

O peso ao nascimento não afetou os principais parâmetros seminais avaliados (volume, concentração, motilidade, vigor, número de espermatozoides totais) no exame de qualidade seminal. No entanto, volume do ejaculado aumentou ao longo das coletas, ao passo que a concentração do ejaculado diminuiu ($P < 0,05$). Avaliações seminais entre animais de diferentes pesos ao nascimento foram recentemente realizadas em machos aos 12 meses de idade por Lin et al. (2017), sendo demonstrado menor volume e maior concentração nos animais que sofreram RIUC. De acordo com esses autores, o aumento na concentração seria decorrente ao menor volume do ejaculado nos animais que sofreram RIUC. É interessante notar que essa diferença desapareceu quando foi calculado o número total de espermatozoides no ejaculado, corroborando com os achados do presente estudo.

Da mesma forma, o peso ao nascimento não afetou o número total de espermatozoides no ejaculado e conseqüentemente o número de doses totais inseminantes. Embora o peso ao nascimento não tenha comprometido os resultados citados anteriormente, os animais do grupo BP produziram aproximadamente 40% menos espermatozoides e doses inseminantes. A quantidade e a qualidade do sêmen, especialmente volume, concentração espermática e motilidade, determinam o número total de doses destinadas para inseminação originárias de um único ejaculado. Além disso, o número total de doses inseminantes afeta diretamente os custos associados ao uso de IA (Flowers, 2008). Portanto, a presença de machos produtores de grandes quantidades de sêmen, originando inúmeras doses inseminantes durante seu período de permanência nas centrais IA, deve ser particularmente valorizada (Knecht et al, 2017).

Quanto à morfologia espermática, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais no tocante às patologias listadas na Tabela 4. Contudo, no presente trabalho, 50% dos animais do grupo BP foram reprovados por ultrapassarem o limite recomendado pelo Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen Animal (CBRA, 1998), para alguma patologia específica, ao passo que 37,5% dos animais AP foram reprovados, em se considerando os mesmos critérios.

Para os parâmetros volume seminal e concentração espermática, foi observado um efeito de tempo, ou seja, o volume aumentou enquanto a concentração diminuiu com o avançar da idade (Tabela 3). Até o macho atingir a maturidade sexual, há uma melhora gradual dessas características, chegando à estabilização (França et al., 2000). A maturidade sexual pode ocorrer a partir de oito meses, mas vários autores relatam variações de acordo com a raça ou linhagem, época do ano, manejo e tipo de alojamento (Flowers, 2008; Banaszewska e Kondracki, 2012; Schulze et al., 2014; Flowers, 2015).

Assim sendo, não seria recomendável a avaliação andrológica em machos com menos de oito meses de idade. Schulze et al. (2014) relataram que metade dos machos descartados nas centrais de inseminação por baixa qualidade seminal, tinham idade inferior a oito meses. Esse fato pode trazer prejuízo ao programa de seleção uma vez que machos com bons índices zootécnicos poderiam ser excluídos antes de atingirem a maturidade sexual.

Tabela 3. Características seminais em animais de alto (AP) e baixo (BP) pesos ao nascimento coletados em intervalos de 15 dias a partir de 180 dias de idade

Características seminais	AP (n=7)	BP (n=7)	Significância
Volume (mL)			
1° semana	164 ± 24	121 ± 25	NS
2° semana	164 ± 19	126 ± 20	NS
3° semana	171 ± 21	160 ± 23	NS
4° semana	178 ± 14	134 ± 15	P < 0.05
5° semana	185 ± 15	166 ± 17	NS
Concentração (x10⁶/mL)			
1° semana	329 ± 49	213 ± 53	NS
2° semana	284 ± 57	240 ± 61	NS
3° semana	208 ± 36	196 ± 41	NS
4° semana	236 ± 53	188 ± 63	NS
5° semana	254 ± 55	159 ± 61	NS
Motilidade (%)			
1° semana	85 ± 4,5	72 ± 4,7	NS
2° semana	83 ± 4,4	74 ± 4,6	NS
3° semana	82 ± 2,6	78 ± 3,0	NS
4° semana	80 ± 3,2	79 ± 3,2	NS
5° semana	80 ± 4,0	82 ± 4,3	NS
Vigor			
1° semana	4,5 ± 0,3	4,3 ± 0,2	NS
2° semana	4,3 ± 0,2	4,0 ± 0,2	NS
3° semana	4,6 ± 0,2	4,3 ± 0,2	NS
4° semana	4,7 ± 0,3	4,4 ± 0,2	NS
5° semana	4,4 ± 0,2	4,6 ± 0,2	NS
Espermatozoides totais (x10⁹)			
1° semana	57 ± 12	26 ± 13	NS
2° semana	48 ± 10	30 ± 11	NS
3° semana	40 ± 9	34 ± 10	NS
4° semana	41 ± 9	26 ± 11	NS
5° semana	47 ± 9	28 ± 10	NS
Número de doses totais			
1° semana	19 ± 4	8,4 ± 4,3	P < 0.056
2° semana	16 ± 3,3	10 ± 3,6	NS
3° semana	13 ± 2,8	11 ± 3,2	NS
4° semana	14 ± 3	8,5 ± 4,0	NS
5° semana	15 ± 3	9,5 ± 3,4	NS

Valores expressos como média ± erro-padrão para cada grupo experimental. NS: não significativo

Tabela 4. Morfologia espermática das amostras de sêmen, coletadas em intervalos de 15 dias a partir de 180 dias de idade, em animais de alto (AP) e baixo (BP) pesos ao nascimento

Características seminais	AP (n=7)	BP (n=7)	Significância
Normais %			
1° coleta	87 ± 2,6	87 ± 2,6	NS
2° coleta	76 ± 6,0	91 ± 6,0	NS
3° coleta	77 ± 7,1	84 ± 7,1	NS
4° coleta	81 ± 7,3	88 ± 6,8	NS
5° coleta	78 ± 10,5	82 ± 10,5	NS
Gota Citoplasmática proximal (GCP) %			
1° coleta	3,3 ± 1,7	5,0 ± 1,7	NS
2° coleta	2,3 ± 1,1	1,8 ± 1,1	NS
3° coleta	3,0 ± 1,7	4,6 ± 1,7	NS
4° coleta	1,5 ± 0,5	1,3 ± 0,5	NS
5° coleta	3,5 ± 1,6	3,4 ± 1,6	NS
Gota Citoplasmática distal (GCD) %			
1° coleta	3,8 ± 1,2	4,0 ± 1,2	NS
2° coleta	8,8 ± 3,1	2,5 ± 3,1	NS
3° coleta	7,0 ± 2,4	4,0 ± 2,4	NS
4° coleta	3,5 ± 1,1	2,6 ± 1,1	NS
5° coleta	6,3 ± 2,3	5,0 ± 2,3	NS
Cauda Dobrada (CD) %			
1° coleta	5,7 ± 2,1	2,6 ± 2,1	NS
2° coleta	11,8 ± 3,2	4,5 ± 3,2	NS
3° coleta	13,0 ± 5,4	6,6 ± 5,4	NS
4° coleta	12,3 ± 5,6	7,0 ± 5,6	NS
5° coleta	12,0 ± 7,3	9,8 ± 7,3	NS
Defeitos de cabeça %			
1° coleta	0,4 ± 0,8	1,8 ± 0,8	NS
2° coleta	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,2	NS
3° coleta	0,4 ± 0,5	0,8 ± 0,5	NS
4° coleta	0,5 ± 0,6	0,9 ± 0,5	NS
5° coleta	0,2 ± 0,1	0 ± 0,1	NS

Valores expressos como média ± erro-padrão para cada grupo experimental. NS: não significativo

Para se predizer a produção espermática de varrões de diferentes pesos ao nascimento, algumas correlações foram estabelecidas entre medidas testiculares e concentração espermática. Observou-se tendência entre os pesos dos testículos direito e esquerdo ($r = 0,51$; $P = 0,06$ e $r = 47$; $P = 0,08$), respectivamente, e concentração espermática. Além de correlação positiva entre o comprimento do testículo esquerdo e tendência com o direito ($r = 0,55$; $P = 0,039$ e $r = 0,51$; $P = 0,06$), respectivamente, e concentração espermática.

5.3 Avaliações histomorfométricas

As análises histomorfométricas do parênquima testicular dos animais de alto e baixo pesos ao nascimento estão apresentadas na Tabela 5. Os resultados revelam que o peso ao nascimento não alterou o diâmetro e a altura do epitélio dos túbulos seminíferos, avaliados em estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. Resultados semelhantes também foram observados por Lin et al. (2017) e Auler et al. (2017) para machos suínos nas idades de 12 e 8 meses, respectivamente.

Tabela 5. Análises histomorfométricas do parênquima testicular em animais de alto (AP) e baixo (BP) pesos ao nascimento, orquiectomizados aos 10 meses de idade

Parâmetros	AP (n=7)	BP (n=7)	Significância
Diâmetro Túbulo Seminífero (μm)	262 \pm 4,3 ^a	260 \pm 5,1 ^a	NS
Altura do Epitélio (μm)	92 \pm 1,2 ^a	95 \pm 1,4 ^a	NS
CTTS (m)	7323 \pm 348	6093 \pm 376 ^b	P < 0,05
Nº células Sertoli/testículo ($\times 10^6$)	14 \pm 0,8 ^a	11 \pm 0,8 ^a	P = 0,07
Proporção Volumétrica (Vv%)			
Túbulo Seminífero	86 \pm 3,4 ^a	85 \pm 3,7 ^a	NS
Interstício	14 \pm 3,4 ^a	15 \pm 3,7 ^a	NS
Nº células/STTS			
Sertoli	7,2 \pm 0,4 ^a	7,4 \pm 0,4 ^a	NS
Espermatogônia A	1,8 \pm 0,2 ^a	2,23 \pm 0,2 ^a	NS
Pré-leptóteno	29 \pm 1,8 ^a	31 \pm 2,1 ^a	NS
Paquíteno	36 \pm 2,7 ^a	37 \pm 3,1 ^a	NS
Espermátide arredondada	100 \pm 11 ^a	95 \pm 11 ^a	NS
Total de células espermatogênicas	175 \pm 14 ^a	173 \pm 16 ^a	NS
Eficiência da Espermatogênese			
Índice mitótico	17,3 \pm 2,1 ^a	14,4 \pm 2,5 ^a	NS
Índice meiótico	2,7 \pm 0,2 ^a	2,6 \pm 0,2 ^a	NS
Índice apoptótico	1,3 \pm 0,07 ^a	1,2 \pm 0,09 ^a	NS
Suporte célula de Sertoli	13,7 \pm 1,1 ^a	13,1 \pm 1,3 ^a	NS
Eficiência geral da Espermatogênese	57 \pm 6,1 ^a	47 \pm 7,2 ^a	NS

Valores expressos como média \pm erro-padrão. CTTS: Comprimento Total de Túbulo Seminífero; STTS: Secção Transversal de Túbulos Seminíferos. ^{a,b}Médias com letras distintas na mesma linha diferem (P < 0,05); NS: não significativo.

Como demonstrado por alguns autores, o diâmetro dos túbulos seminíferos depende do tamanho do lúmen tubular e do número total de células por secção transversal de túbulo seminífero (Godinho e Cardoso, 1979; França et al., 2000; Avelar et al., 2010). Assim, o diâmetro tubular pode ser utilizado para avaliação da eficiência da espermatogênese. Diversos parâmetros contribuem para a determinação do diâmetro tubular, dentre os quais podem ser mencionados o número de camadas de células mioídes, que constituem a túnica própria, a eficiência das células de Sertoli, responsáveis pela altura do epitélio seminífero, e a secreção de fluidos pela célula de Sertoli, que determina o tamanho do lúmen tubular (França e Russell, 1998). Os elementos citados podem diferenciar-se consideravelmente nas diferentes espécies de mamíferos e ainda dentro de linhagens ou raças de uma mesma espécie (França e Russell, 1998). No presente trabalho, nem o diâmetro tubular tampouco o número de células de Sertoli por secção transversal foram afetados pelo peso ao nascer, o que vai de encontro ao trabalho de Lin et al.

(2017) em machos adultos. Além disso, não foram observadas diferenças entre os animais de alto e baixo peso em relação à altura do epitélio, diferentemente do que foi observado por Auler et al. (2017), em machos de oito meses de idade. A semelhança na altura do epitélio seminífero entre os grupos experimentais aos 10 meses de idade aqui apresentada pode ser explicada pela constância no número total de espermátocitos primários em paquíteno e de espermátides arredondadas por secção transversal de túbulo seminífero.

Utilizando os valores de peso testicular, diâmetro tubular e volume de túbulos seminíferos no testículo, foi obtido o valor correspondente ao comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS). O peso do testículo varia nas diferentes espécies de mamíferos. As variações no diâmetro e no volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo constituem a grande diferença no valor do CTTS. A título de exemplo, é esperado que um maior diâmetro tubular implique em menor comprimento tubular por grama de testículo em uma dada espécie. No geral, de 10 a 20 metros de túbulos seminíferos por grama de testículo são observados na maioria dos mamíferos já investigados (França e Russell, 1998). No presente estudo, os suínos dos grupos AP e BP apresentaram um valor aproximado de 16 e 17 metros de túbulos seminíferos por grama de testículo, respectivamente. Contudo, no que se refere ao comprimento dos túbulos seminíferos, os animais BP apresentaram menor CTTS, o que justificaria um menor número de espermatozoides produzidos no ejaculado destes machos. Adicionalmente, foi observada uma tendência para menor número de células de Sertoli por testículo neste mesmo grupo experimental, o que confirmaria a menor capacidade de produção espermática nos varrões BP. Vale ressaltar que o menor número de células de Sertoli por testículo nos animais BP não refletiu em um menor número deste tipo celular por secção transversal de túbulo seminífero, o que também foi observado em machos de baixo peso ao nascimento aos 8 meses (Auler et al., 2017) e aos 12 meses (Lin et al., 2017) de idade. Segundo França et al. (2000), existe correlação significativa entre o número absoluto de células de Sertoli no testículo e o comprimento total dos cordões/túbulos seminíferos, sendo o alongamento destes durante a fase pré-puberal dependente da atividade mitótica das células de Sertoli. Por sua vez, maior número de células de Sertoli, como resultado de sua maior proliferação durante o período pré-puberal, está relacionado à maior produção espermática (França et al., 2000; Auler et al., 2017).

Os valores médios referentes à proporção (%) dos componentes do parênquima testicular revelaram similaridade na proporção de túbulos seminíferos e interstício entre os grupos experimentais, sugerindo que o peso ao nascer não altera a composição do parênquima testicular. Adicionalmente, foram computados os números das células germinativas e células de Sertoli, obtidos a partir do estágio 1 do ciclo de epitélio seminífero, cujos valores corrigidos demonstraram que os números de espermatogônias do tipo A, espermátocitos primários em pré-leptóteno, espermátocitos primários em paquíteno, espermátides arredondadas e total de células espermatogênicas foram semelhantes entre os machos AP e BP. No entanto, avaliando os machos AP e BP aos 8 meses de idade, Auler et al. (2017) reportaram menor número de espermátocitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas nos varrões BP. Provavelmente, tal diferença se deve ao fato de os animais estarem no período peripuberal, ou seja, no início da vida reprodutiva, sendo esta fase marcada por mudanças morfológicas e fisiológicas de comportamento e no ejaculado.

Há evidências de que o padrão de divisão espermatogonial governa a produção de espermatócitos primários e pode ser calculado pela razão entre o número destas células na fase de pré-leptóteno e o número de espermatogônias A, sendo denominado coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial (Ortavant et al., 1977). No presente estudo, devido à semelhança existente entre os números dessas células em ambos os grupos experimentais, não foi observada alteração no coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial, sugerindo que o peso ao nascimento não influencia as divisões mitóticas dessa fase da espermatogênese.

Além disso, a razão do número de células na fase de espermatídes arredondadas e espermatócitos primários em paquíteno, conhecido como coeficiente de eficiência meiótico, foi semelhante entre os grupos experimentais. Assim como os dados anteriores, o peso ao nascimento não alterou o índice apoptótico da espermatogênese, obtido pela razão entre o número corrigido de espermatócitos primários em paquíteno e em pré-leptóteno, nem a capacidade de suporte da célula de Sertoli, medida da capacidade de suporte e da função desta célula.

Segundo Okwun et al. (1996), este parâmetro está relacionado tanto à produção de espermatídes para cada espermatogônia A, quanto à produção espermatóica diária, sugerindo que estas características também estão preservadas nos animais de baixo peso ao nascimento. A semelhança observada entre os grupos experimentais tanto nos índices reportados acima, bem como na avaliação morfológica do sêmen, demonstra que o parênquima testicular foi preservado em detrimento do peso ao nascimento, que poderia, por exemplo, estar associado a falhas na espermatogênese, caso houvesse maior incidência de defeitos de cabeça.

Finalmente, a eficiência total da espermatogênese, definida pela razão entre o número de espermatídes arredondadas e espermatogônias do tipo A não sofreu influência do peso ao nascimento. De forma semelhante, Melo et al. (2013) demonstraram que a deficiência nutricional *in utero* não foi capaz de alterar a eficiência da espermatogênese em ratos, ocorrendo apenas uma ligeira redução da capacidade de suporte das células de Sertoli.

6. Considerações finais

Os resultados do presente estudo demonstraram que o peso ao nascimento influencia o tamanho testicular, já que existe uma proporcionalidade do tamanho do testículo em relação ao tamanho corporal. De tal forma que, animais que nascem menores apresentam testículos menores, sendo essa característica mantida até a idade adulta. No entanto, mesmo tendo testículos menores a espermatogênese não é alterada em varrões de baixo peso ao nascimento. De fato, os testículos são menores como consequência do menor comprimento dos túbulos seminíferos, e não por alterações na organogênese.

Entretanto, mesmo não havendo comprometimento na organogênese, estes animais apresentam uma menor produção espermatóica em decorrência da redução do comprimento tubular e do número total de células de Sertoli. Dessa forma, o peso ao nascimento deveria ser incluído como um parâmetro de seleção dos futuros reprodutores, visto que animais menores ao nascimento produzirão menos espermatozoides, não sendo eficientes e sustentáveis para o sistema de produção suinícola.

7. Bibliografia

- ALMEIDA, F. R. C. L.; ALVARENGA, A. L. N.; FOXCROFT, G. R., et al. Birth weight implications for reproductive parameters in boars. In: ADSA-CSAS-ASAS JOINT ANNUAL MEETING, Montreal. *Journal Animal Science*, v.87, p. 195-195, 2009.
- ALMEIDA, R. C. L.; GHELLER, V. A; AULER, P. A, et al. Migração espermática em suínos após inseminação artificial intrauterina profunda. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 5, p. 1359 – 1366, 2014
- ALMEIDA, F.L; LEAL, M. C; FRANÇA L.R. Testis Morphometry, Duration of Spermatogenesis, and Spermatogenic Efficiency in the Wild Boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 792-799, 2006
- ALVARENGA, A. L. N.; CHIARINI-GARCIA, H.; CARDEAL, P. C., et al. Intrauterine growth retardation affects birth weight and postnatal development in pigs, impairing muscle accretion, duodenal mucosa morphology and carcass traits. *Reproduction Fertility Development*, v. 25, n. 2, p. 387-395, 2013
- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D.; GOMES W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.) The testis. Nova York e Londres: *Academic Press*, v.1, p.433-482, 1970
- AMMAN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal. Andrology*, v.2, p. 37-58, 1981.
- AMDI, C.; KROGH, U.; FLUMMER, C. Intrauterine growth restricted piglets defined by their head shape ingest insufficient amounts of colostrum. *Journal Animal Science*, v.91, p. 5605–5613, 2013.
- ASHWORTH, C.J., FINCH, A.M., PAGE, K.R., et al. Causes and consequences of fetal growth retardation in pigs. *Reprod. (Cambridg England) Suppl*, v.58, p. 233–246, 2001.
- ASHWORTH, C. Lates regnancy: the effects of intra-uterine life on production traits in offspring. *Animal Frontiers*, v.3, 2013.
- AULER, P. A; MOREIRA, G. H. F. A; HOGG, C. O., et al. Testicular parameters and spermatogenesis in diferent birthweight boars. *Reproduction Fertility and Development*, v.29, p.1720-1728, 2017.
- AVELAR, G. F.; OLIVEIRA, C. F. A.; SOARES, J. M., et al. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: A non-random event. *Theriogenology*, v. 74, p. 11-23, 2010.
- AZZAM, S. M., J. E. KINDER, M. K. NIELSEN, L. A. WERTH, K. E, ET AL. Environmental effects on neonatal mortality of beef calves. *Journal Animal Science*, v.71, p. 282–290, 1993
- BAUER, R.; WALTER, B; HOPPE, A., et al. Body weight distribution and organ size in newborn swine (*sus scrofa domestica*): A study describing an animal model for asymmetrical intrauterine growth retardation. *Experimental Toxicology Pathology*, v. 50, p. 59-65, 1998.
- BARKER, D. J. In utero programming of chronic disease. *Clinical Science. (Lond.)*, v. 95, p. 115-128, 1998.
- BÉRARD, J.; PARDO, C.E.; BÉTHAZ, S., et al. Intrauterine crowding decreases average birth weight and affects muscle fiber hyperplasia in piglets. *Journal Animal. Science*, v.88, p.3242-3250, 2010.
- BOERI, L.; VENTIMIGLIA, E.; CAPOGROSSO, P. Low birth weight is associated with a decreased overall adult health status and reproductive capability. Results of a cross sectional study in primary infertility patients. *Journal Plos One*, 2016

- BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-391, 1973
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.17-32, 2005.
- CAMERON, N. M. Maternal programming of reproductive function and behavior in the female rat. *Frontiers in Evolutionary Neuroscience*, v.3, p. 1-10, 2011.
- CAPEL, B. The battle of the sexes. *Mechanisms of development*, New York, v. 92, n. 1, p. 89-103, 2000.
- CARDOSO, F. M.; GODINHO, H. P. Morphological events occurring in the seminiferous tubules of the Brazilian Nelore Zebu with puberty. *Acta Anatomica*. v. 103, p. 327-335, 1979.
- CHEVAUX, E.; SACY A.; LE TREUT, Y., et al. Intrauterine Growth Retardation (IUGR): Morphological and behavioural description. In: *Proc. 21st IPVS Congress Vancouver Canada*. p. 209, 2010
- 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: Helio Chiarini-Garcia e Rossana C. N. Melo. (Org.). *Light Microscopy: Methods and Protocols*. 1 ed. Totowa: Humana Press, v.689, p. 3-18, 2011.
- CLERMONT, YVES. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle, and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 1998
- COMBES, A. N. et al. Three- dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development. *Developmental Dynamics*, New York, v. 238, n. 5, p. 1033-1041, 2009.
- COSTA, D. S; FARIA, F. J; FERNANDES, C. A, et al. Testis morphometry and kinetics of spermatogenesis in the feral pig (*Sus scrofa*). *Animal Reproduction Science*, p. 63-70, 2013.
- CRABO, B. Preservation of boar semen: a worldwide application of swine AI. In: JOHNSON L. A. RATH D. Boar semen preservation. Berlin: *Paul Parey Scientific Publishers*, p. 3-9, 1990.
- DA SILVA-BUTTKUS, P; VAN DEN HURK, R.; TE VELDE, E. R., et al. Ovarian development in intrauterine growth-retarded and normally developed piglets originating from the same litter. *Reproduction*, v. 126, p. 249-258, 2003.
- DIAL, G. D.; MARSH, W. E.; POLSON, D. D., et al. Reproductive failure: differential diagnosis. In 'Diseases of Swine'. 7th ed. (Eds A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire and D. J. Taylor, p. 88-137, 1992
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Tratado de anatomia veterinária. 4^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 856, 2010
- DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monaths Veteriny Medicine*, v. 29, n. 24, p. 11298-11302, 1974.
- FERREIRA, A. B. H. Novo Dicionário da Língua Portuguesa. 2^a edição. Rio de Janeiro. *Nova Fronteira*. 1986. p. 950
- FLOWERS, W.L. & Esbenshade K.L. Optimizing management of natural and artificial mating in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 48, p. 217-228, 1993.

- FLOWERS, W.L. Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. *Theriogenology* 70, p. 1297–1303, 2008.
- FOOTE RH. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Journal Animal Science*, p. 80, 1–10, 2002.
- FOXCROFT, G. R.; DIXON, W. T.; NOVAK, S., et al. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. *Journal Animal Science*, v. 84, p. 105-112, 2006
- FRANÇA, L. R. Desenvolvimento testicular de suínos da raça piau, do nascimento aos 12 meses de idade. 40f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1987.
- FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M.; SANTANA-CASTRO, A. C. Desenvolvimento testicular de suínos Piau. IV. População celular dos túbulos seminíferos e rendimento da espermatogênese. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v. 40, n. 5, p. 339-53, 1988.
- FRANÇA, L.R.; CARDOSO, F.M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue Cell*, v. 30, n. 5, p. 573-582, 1998
- FRANÇA, L. R.; OGAWA, T.; AVARBOCK M. R, et al. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology Reproduction*, v. 6, p. 1371 -1377, 1998.
- 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. *Biological Reproduction*, v. 63, p. 1629-1636, 2000.
- FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v. 63, p. 300-318, 2005.
- FERENC, K. Intrauterine growth retarded piglet as a model for humans – studies on the perinatal development of the gut structure and function. *Reproductive Biology*, v.14, p.51-60, 2014.
- FORD, J. J.; WISE, T. H. Assessment of pubertal developmet of boars derived from ultrasonographic determination of testicular diameter. *Theriogenology*, v. 75, p. 241-247, 2011.
- GATFORD, K. L., SIMMONS, R. A., DE BLASIO, M. J., at al. Placental programming of postnatal diabetes and impaired insulin action after IUGR. *Placenta*, v.31, S6, 2010
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de histologia em cores. 3ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 592, 2007.
- GARCIA-GIL, N.; PINART, E.; SANCHO, S., et al. The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars. *Animal Reproduction Science*, v. 73, p. 211-225, 2002.
- GILBERT, S. F. Biologia do desenvolvimento. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 994, 2003.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, p. 340, 2001.
- GONDRET, F.; LEFRAUCHEUR, L.; JUIN, H., et al. Low birth weight is associated with enlarged muscle fiber area and impaired meat tenderness of the longissimus muscle in pigs. *Journal Animal Science*, v. 84, p. 93-103, 2006.
- HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). Reprodução animal. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 13

- HALES, J.; MOUSTSEN, V.A.; NIELSEN, M.B.F.; HANSEN, C.F. Individual physical characteristics of neonatal piglets affect preweaning survival of piglets born in a noncrated system. *Journal of Animal Science*. v. 91, p. 4991-5003, 2013.
- JOHNSON, L.A., AALBERS, J.G., GROOTEN, H.J.G. Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville TS BTS., Modified Modena MM , or MR-A and inseminated on one, three and four Ž days after collection. *Zuchthygiene*, v.23,p. 49–55, 1988.
- HARAYAMA, H., NANJO, I., KANDA, S., et al. Testicular development in chinese meishan boars. *Theriogenology*, v. 36, n. 4, p. 637-642, 1991.
- KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, v. 203, n. 2, p. 323-333, 1998.
- KAMINSKI, M. A.; CORBIN, C.J.; CONLEY, A.J. Development and Differentiation of the Interstitial and Tubular Compartments of Fetal Porcine Testes. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 119-127, 1999.
- KNECHT, D; JANKOWSKA-MAKOSA; DUZINSKI, K. Boar genotype as a fator shaping age-related changes in semen parameters and reproduction longevity simulations. *Theriogenology*, 2017.
- KOTSAMPASI, B., BALASKAS, C., PAPADOMICHELAKIS, G., et al. Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Animal Reproduction. Science*, v. 114, p. 135–147, 2009.
- KNOX, R. Getting to 30 pigs weaned/sow/year. In: LONDON SWINE CONFERENCE – PRODUCTION AT THE LEADING EDGE 6-7, 2005, London, Ontario. Anais... London, Ontario: Universidade de Guelph, p. 47-59, 2009.
- KNOX, R. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, v.85, p. 83-93, 2016.
- LÉONHARDT, M, LESAGE, J.; CROIX, D., et al. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 390–400, 2003
- LIN, Y.; CHENG, X.; SUTOVSKY, P. Effect of intra-uterine growth restriction on long-term fertility in boars. *Reproductin, Fertility and Development*, v.29, 2017.
- MCCOARD, S. A.; T. H. WISE; D. D. LUNSTRA, et al. Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *Journalof Endocrinology*, v. 178, p. 395–403, 2003.
- MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. *Biochemical Society Transectional*, v. 34, n.5, p. 779-782, 2006.
- MARTINEZ EA, VAZQUEZ JM, ROCA J, LUCAS X, GIL MA, PARRILLA, I, VAZQUEZ JL, DAY N. Minimum number of spermatozoarequired for normal fertility after deep intrauterineinsemination in non-sedated sows. *Reproduction*, v.123, p. 163–170, 2002.
- MELO, M. C.; ALMEIDA, F. R. C. L.; BRANT, A. L. C; PARREIRA, G. G.; CHIARINI-GARCIA. Spermatogenesis recovery in protein-restricted rats subjected to anormal protein diet after weaning. *Reprod.Fertil. Dev.*, (in press), 2013.
- MELLOR, D. J. Nutritional and placental determinants of fetal growth rate in sheep and consequences for the newborn lamb. *British Veterinary Journal*, v.139, p. 307–324, 1983.
- MEZALIRA, A.; DALLANORA D.; BERNARDI ML, et al. Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow of itrauterine inseminated sows. *ReproductionDomestic Animals*, v. 40, p. 1-5, 2005.

- MILLER, S.L., HUPPI, P.S., MALLARD, C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neuro developmental outcome. *Journal Physiology*, v. 594, p. 807–823, 2016.
- MYRIE, S. B., MCKNIGHT, L. L., VAN VLIET, B. N., et al. Low birth weight is associated with reduced nephron number and increased blood pressure in adulthood in a novel spontaneous intrauterine growth-restricted model in Yucatan miniature. *Swine Neonatology*, v.100, p. 380–386, 2011.
- OBERLENDER, G.; MURGAS, L.D.S.; LIMA, D. et al. Alterações endócrinas em reprodutores suínos de alto desempenho. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.1, p245-250, 2010.
- OKWUN, O.E; IGBOELI, G; FORD. J. J., et al. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in the three breeds of boar. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 107, p. 137-149, 1996.
- ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: H.H. Coole; P.T. Cupps (Eds). *Reproduction in Domestic Animals*. New York: Academic Press, p. 203-227, 1977.
- QUESNEL, H.; C. FARMER, AND N. DEVILLERS. Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation. *Livestock Science*, v. 146, p.105–114, 2012.
- QUINIQU, N.; DAGORN, J.; GAUDRE, D. Variation of piglets birth weight and consequences on subsequent performance. *Livestock Production Science*, n. 78, p.63-70, 2002.
- PARK, S. Y.; JAMESON, J. L. Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology*, v. 146, n. 3, p. 1035-1042, 2004.
- PÈRE, M. C.; ETIENNE, M. Uterine blood flow in sows: effects of pregnancy stage and litter size. *Reproduction Nutrition Development*, v. 40, p. 369-382, 2000.
- PERRY, B. D. Childhood experience and the expression of genetic potential: what childhood neglect tells us about nature and nurture. *Brain Mind*.v.3, p.79–100, 2002
- POORE, K. R.; FOWDEN, A. L. The effect of birth weight on hypothalamo–pituitary– adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *Journal Physiology Society*, v. 547, n. 1, p. 107-116, 2003.
- POORE, K. R.; FOWDEN, A. L. The effect of birth weight and postnatal growth patterns on fat depth and plasma leptin concentrations in juvenile and adult pigs. *JournalPhysiological*, v. 588, n. 1, p. 295-304, 2004.
- REHFELDT, C.; KUHN, G. Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis. *Journal Animal Science*, v. 84, n. 13, p. 113-123, 2006.
- RHIND, S. M; RAE, M. T.; BROOKS, A. N. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction*, v. 122, p. 205–214, 2001.
- ROSSDALE, P. D., AND J. C. OUSEY. Fetal programming for athletic performance in the horse: Potential effects of IUGR. *Equine Veterinary Education*, v.14, p. 98–112, 2002
- RUSSEL, L. D.; BARTKE, A.; GOH, J. C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Journal of Anatomy*, v. 184, p. 179-189, 1990.
- SENGER, P. L. Pathways to pregnancy and parturition. 2^o Edition, Pullman, 2003.
- SHIRAKATA, Y., HIRADATE, Y., INOUE, H., SATO, E., et al. Histone h4 modification during mouse spermatogenesis. *Journal Reproductive and Development*, v. 60, 2014

- SMIT, M.N. Study of fetal programming sex ratio and maternal parity in pigs in a multigenerational field data set. *Master Thesis*, Wageningen University, 2007
- STEVERINK D.W.B.; SOEDE N.M.; BOUWMAN E.G., et al. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. *Animal Reproduction Science*, 54:109–119, 1998.
- SWIESTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoam transit through the epididymis. *Anatomical Record*, v. 161, p. 171-186, 1968.
- TURNER, A. S., McILWAITH, C. W. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo: Roca, p. 341, 2002.
- VALE FILHO, V. R; ANDRADE, V. J; AZEVEDO, N. A. Avaliação Andrológica e Seleção de Tourinhos Zebu para Reprodução. *VII Simpósio de Produção de Gado de Corte*, 2010.
- VAN STRATEEN, H. W. M; WENSING, C. J. G. Histomorphometric Aspects of testicular Morphogenesis in the Pig. *Biological Reproduction.*, v. 17, p. 467-472, 1977.
- VAN RENS, B. T. T. M., G. DE KONING, R. BERGSMA ET AL. Preweaning piglet mortality in relation to placenta efficiency. *Journal Animal Science*, v.83, p.144–151, 2005.
- WANG, T.; XU, R.J. Effects of colostrum feeding on intestinal development in newborn pigs. *Biology of the Neonate*, 70: 339–348, 2005.
- WANG, T.; HUO, Y.J.; SHI, F.; XU, R.J.; HUTZ, R. Effects of intrauterine growth retardation on development of the gastrointestinal tract in neonatal pigs. *Biology of Neonate*, v.88, p.66-72, 2005.
- WANG, X.; WEIZONG, W.; GANG L., et al. Temporal proteomic analysis reveals continuous impairment of intestinal development in neonatal piglets with intrauterine growth restriction. *Journal of Proteome Research*, v. 9, p. 924-935, 2010.
- WENTZ I.; VARGAS A J.; BORTOLOZZO F.P., et al. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. In: Anais do III Simpósio Internacional de Inseminação Artificial em Suínos (Flores da Cunha, Brasil), p. 5-12, 2000
- WEITZE K.F. Update on the worldwide application of swine AI. In: Johnson LA, Guthrie HD, editors. IVth International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, MD. Allen Press Inc, Lawrence KS, p. 141–6, 2000.
- WU, G.; BAZER, F. W.; CUDD, T. A., et al. Maternal nutrition and fetal development. *Journal of Nutrition*, v. 134, p. 2169-2172, 2004
- WU, G.; BAZER, F. W.; WALLACE, J. M., et al. Board invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *Journal Animal Science*, v. 84, p. 2316-2337, 2006.
- XU, R.J.; MELLOR, D.J.; BIRTLES, M.J., et al. Impact of intrauterine growth retardation on the gastrointestinal tract and the pancreas in newborn pigs. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v.18, p.231-240, 1994.
- YAO, H. H. et al. The battle of the sexes: opposing pathways in sex determination. *Novartis Foundation Symposium*, v. 244, p. 187-198, 2002.
- ZAMBRANO, E.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L, GUZMÁN; C., ET AL. A maternal low protein diet during gestation and lactation in the rat male reproductive development. *Journal Physiology*, v.563, p. 275–284, 2005.