

GABRIELA MARQUES DE REZENDE

Efeitos do alojamento de cachacos sobre a biometria e a histologia testiculares e epididimárias e a qualidade espermática

São Paulo

2021

GABRIELA MARQUES DE REZENDE

Efeitos do alojamento de cachaços sobre a biometria e a histologia testiculares e epididimárias e a qualidade espermática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Eneiva Carla de Carvalho
Celeghini

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4140
FMVZ

Rezende, Gabriela Marques de
Efeitos do alojamento de cachacos sobre a biometria e a histologia testiculares e epididimárias e a qualidade espermática / Gabriela Marques de Rezende. – 2021.
48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Eneiva Carla de Carvalho Celeghini.

1. Suínos. 2. Epididimos. 3. Testículos. 4. Bem-estar. 5. Alocação. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Alterações testiculares biométricas, histopatológicas e da qualidade espermática epididimária em cachorros submetidos a diferentes alojamentos.", protocolada sob o CEUA nº 3829221019 (ID 007311), sob a responsabilidade de **Enelva Carla Carvalho Celeghini e equipe; Gabriela Marques de Rezende; Laura Nataly Garcia Oliveros; Samara Cristine Costa Pinto; Thiago Bernardino de Almeida; Adroaldo Zanella; Sabrina Moraes dos Santos; Humberto Eustáquio Coelho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/12/2019.

We certify that the proposal "Biometric, histopathological and epididymal sperm quality alterations in boar submitted to different accommodations.", utilizing 25 Swines (25 males), protocol number CEUA 3829221019 (ID 007311), under the responsibility of **Enelva Carla Carvalho Celeghini and team; Gabriela Marques de Rezende; Laura Nataly Garcia Oliveros; Samara Cristine Costa Pinto; Thiago Bernardino de Almeida; Adroaldo Zanella; Sabrina Moraes dos Santos; Humberto Eustáquio Coelho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/17/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2019** a **10/2020** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Suínos**

sexo: **Machos**

idade: **535 a 549 dias**

N: **25**

Linhagem: **F1 (Large White x Landrace)**

Peso: **108 a 130 kg**

Local do experimento: As atividades de coleta e processamento das amostras serão desenvolvidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução Animal (LEEPaR) e as avaliações histopatológicas realizadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Uberaba (UNIUBE).

São Paulo, 17 de dezembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: REZENDE, Gabriela Marques de

Título: **Efeitos do alojamento de cachacos sobre a biometria e a histologia testiculares e epididimárias e a qualidade espermática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 17/12/2021

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Leonardo Batissaco

Instituição: Centro Universitário de Jaguariúna

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho

Instituição: Universidade de Uberaba

Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

Para que esse trabalho fosse realizado foi necessário o apoio e colaboração de pessoas essenciais para sua construção.

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado e abençoado esse caminho tão incrível que apareceu em minha jornada. À minha família, minha mãe *Mônica* e meu pai *Mauro*, meus irmãos *Gustavo* e *Daniel*, que sempre me apoiaram e impulsionaram para o melhor; por serem meu alicerce, principais incentivadores e sempre me dando suporte e aceitação nas escolhas em minha vida. Aos meus tios Fabiana, Bethânia, Eugênio e prima Livia que não só me acolheram para que eu pudesse realizá-lo, mas por sempre estarem ao meu lado querendo o melhor para mim e me apoiando, não tenho palavras para agradecer tudo que fizeram. Aos meus outros tios, tias, avó, avô, primas, primos e cunhadas agradeço por sempre me incentivarem e torcerem por mim. Também aos meus sobrinhos *Paulo Afonso* e *Valentina* que me mostraram o amor mais puro e verdadeiro.

À *Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini* por me incentivar a viver essa experiência tão enriquecedora. Agradeço por todo carinho, apoio, oportunidade, paciência e compreensão. Sempre dando tudo de si para conseguir resolver o que precisássemos, dona de um coração enorme e sempre preocupada com nosso bem-estar. Agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho, levarei para toda minha vida todos os ensinamentos que aprendi com você.

Ao querido amigo e parceiro de experimento *Thiago Bernardino* sem cujo o qual esse experimento não haveria sido realizado, além disso por toda colaboração, apoio e disponibilidade que teve. Também àqueles que não só auxiliaram durante esse estudo como estiveram comigo em todos os momentos dessa jornada, *Laura Nataly*, *Leonardo Batissaco*, *Sâmara Cristine*, *Luisa*, *Alexandre* e a todos os outros amigos que fiz no VRA. Obrigada pela convivência e aprendizado constante com cada um que fez parte dessa importante fase da minha vida, lembrarei com muito carinho, amizade e gratidão. Contem comigo, sempre, mesmo quando eu não estiver mais no nosso tão querido grupo de estudos LEPPaR.

Agradeço também a Universidade de São Paulo, em especial ao Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao *Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda*, o senhor é um ensinamento constante de vida e profissionalismo, dando seu apoio, conselhos, conversas, em especial pela oportunidade de acompanhar as atividades do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) que acabou mudando a minha vida e levando-me a enxergar um novo caminho. Além da colaboração que deu para os dados de morfologia espermática. Aos *Profs. Drs. Ed Hoffmman Madureira, Guilherme Pugliesi, Anneliese de Souza Traldi* pela convivência, conversas e troca de experiência.

Ao *Prof. Dr. Humberto Eustáquio* em especial ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Uberaba pela colaboração e disponibilidade em realizar as avaliações subjetivas de histologia, em especial a *Sabrine Moraes* que se disponibilizou pessoalmente a vir e realizar a coleta do material.

Ao *Prof. Dr. César* e *Prof. Dr. Adroaldo Zanela* pela disponibilidade do espaço físico para alojar e por ceder o uso dos animais utilizados neste experimento.

Me sentia sobre os ombros de gigantes. Foi um imenso prestígio ter convivido e receber o amparo de pessoas tão grandiosas.

Também aos colaboradores do VRA *Harumi* e *Clayton* por me auxiliarem sempre com tanto carinho e atenção em minhas dúvidas e suporte técnico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelos recursos de bolsa concedidos para condução desse experimento.

“A vida não é sobre alcançar objetivos. É o processo que importa. É sobre quem nos tornamos pelo caminho. É sobre se encontrar, se reconhecer, ser, se tornar e eventualmente como consequência, manifestar tudo aquilo que na alma já vibra abundantemente.”

Wandy Luz

RESUMO

REZENDE, G.M. **Efeitos do alojamento de cachaços sobre a biometria e a histologia testiculares e epididimárias e a qualidade espermática.** 2021. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

No Brasil predomina o sistema de confinamento intensivo para machos reprodutores suínos, sistema com restrição de espaço e sem interação ambiental, o qual ocasiona situações estressantes, que podem desencadear desequilíbrio sistêmico no animal e provocar queda no desempenho reprodutivo. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar se o alojamento dos cachaços com mais espaço e enriquecimento ambiental, comparado ao sistema intensivo, podem ter efeito na qualidade do sêmen, nas características biométricas e histológicas dos testículos e epidídimos e na qualidade espermática da cauda do epidídimo. Para isso, foram utilizados 25 machos híbridos (F1: Large White X Landrace) submetidos, aos 5 meses de idade, a um período de condicionamento de colheita de sêmen. Aos 10 meses de idade foram distribuídos em três tipos de alojamentos: animais em celas (1,61 m²; n=9), em baias individuais (4,62 m²; n=8) e em baias individuais com enriquecimento ambiental (4,62 m²), recebendo escovação, banho e feno (n=8) duas vezes ao dia, a fim de minimizar o estresse e promover maior bem-estar. O sêmen dos cachaços foi colhido e avaliado (volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia) imediatamente antes da distribuição nos tratamentos (controle) e após 9 semanas do início do tratamento. Foram mantidos nestas condições por 30 semanas e, ao término deste período, submetidos à eutanásia e remoção dos testículos e epidídimos. Foram realizadas biometrias testiculares e epididimárias por paquímetro (comprimento, largura e espessura) e o volume testicular foi determinado. Foram dissecados testículos e epidídimos e colhidas amostras para exame histopatológico. As lâminas histológicas foram avaliadas e classificadas em escores considerando os aspectos de degeneração tissular do parênquima testicular (0 a 5) e do epidídimo (0 ou 1); também foram avaliadas por sistema computadorizado utilizando o *software* image J. Nos testículos foram consideradas: área do túbulo seminífero (µm²), epitélio seminífero (µm²), área do lúmen (µm²) e a relação epitélio/túbulo seminífero e nos epidídimos: área total do ducto epididimário (µm²), epitélio epididimário (µm²), área do lúmen (µm²) e a relação epitélio/ducto epididimário. Amostras de espermatozoides da cauda do epidídimo foram colhidas, pela técnica de squeeze, e avaliadas quanto ao

volume (μL), concentração (n. spz/mL), motilidade (%), vigor (escore 1 a 5) e morfologia (%). Os dados foram analisados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi realizada ANOVA e utilizado o teste Tukey-Kramer como posthoc. O nível de significância adotado foi de 5%. Verificou-se que os animais mantidos em baia apresentaram maior área do epitélio epididimário ($p=0,01$) do que os outros grupos. Em adição, os animais mantidos em cela apresentaram maior lúmen do ducto epididimário ($p=0,05$) do que os animais mantidos em baia enriquecida. Também foi observado menor percentual de defeitos espermáticos totais, excluindo-se gotas protoplasmáticas distais, dos espermatozoides epididimários, para os cachos em baia enriquecida ($P=0,03$) do que para aqueles mantidos em cela. Pode-se concluir que melhorias nas condições de alojamento dos reprodutores suínos, durante 30 semanas, apresenta poucos efeitos benéficos sobre as características reprodutivas; no entanto, este trabalho contribuiu com análises exploratórias e iniciais em uma área de pesquisa cujas informações são escassas.

Palavras-chaves: Suínos. Epidídimos. Testículos. Bem-estar. Alocação.

ABSTRACT

REZENDE, G.M. **Effects of boars housing on testicular and epididymal biometrics histology and sperm quality**. 2021. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

In Brazil, the intensive confinement system prevails for male breeding pigs, causing stressful situations which can trigger systemic imbalance in the animal and cause a drop in reproductive performance. In this sense, this study aimed to evaluate whether housing boars with greater spatial and environmental enrichment, compared to the intensive system, can have an effect on semen quality, on the biometric and histological characteristics of the testes and epididymis, and on sperm quality. of the boar's tail. epididymis. For this, 25 hybrid males (F1: Large White X Landrace) were submitted, at 5 months of age, to a conditioning period for semen collection. At 10 months of age, they were divided into three types of housing: animals in pens (1.61 m²; n=9), in individual pens (4.62 m²; n=8) and in individual pens with environmental enrichment (4.62 m²), receiving brushing, bathing and hay (n=8) twice a day, in order to minimize stress and promote greater well-being. The boar semen was collected and evaluated (volume, concentration, motility, vigor and morphology) immediately before distribution in the treatments (control) and 9 weeks after the beginning of the treatment. They were kept under these conditions for 30 weeks and, at the end of this period, they were euthanized and the testes and epididymis removed. Testicular and epididymal biometries were performed using a caliper (length, width and thickness) and testicular volume was determined. Testicles and epididymis were dissected and samples were collected for histopathological examination. The histological slides were evaluated and classified into scores considering the aspects of tissue degeneration of the testicular parenchyma (0 to 5) and of the epididymis (0 or 1); were also evaluated by a computer system using the image J software. In the testes were considered: seminiferous tubule area (µm²), seminiferous epithelium (µm²), lumen area (µm²) and the epithelium/seminiferous tubule ratio and in the epididymis: total area of the epididymal duct (µm²), epididymal epithelium (µm²), lumen area (µm²) and the epithelium/epididymal duct ratio. Sperm samples from the tail of the epididymis were collected using the squeeze technique and evaluated for volume (µL), concentration (n. spztz/mL), motility (%), vigor (score 1 to 5) and morphology (%) . Data were analyzed for residual normality using the Shapiro-Wilk test. ANOVA was performed and the Tukey-

Kramer test was used as posthoc. The significance level adopted was 5%. It was found that the animals kept in the pen had a greater area of epididymal epithelium ($p=0.01$) than the other groups. In addition, the animals kept in the cage had greater epididymal duct lumen ($p=0.05$) than the animals kept in the enriched pen. A lower percentage of total sperm defects was also observed, excluding distal protoplasmic drops of epididymal sperm, for boars in an enriched stall ($P=0.03$) than for those kept in a cage. It can be concluded that improvements in housing conditions for swine breeders, during 30 weeks, have few beneficial effects on reproductive traits; however, this work contributed exploratory and initial analyzes in an area of research for which information is scarce.

Keywords: Swine. Epididymis. Testicles. Welfare. Allocation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Locais em que foram desenvolvidas as atividades experimentais.....	27
Figura 2- Local de alojamento dos animais durante o experimento.....	28
Figura 3- Imagem dos diferentes alojamentos (tratamentos) em que os animais foram divididos.....	29
Figura 4- Imagens antes do processamento das amostras logo após a coleta, seguida do escroto para o início do processamento.....	30
Figura 5- Retirada de amostras dos testículos e epidídimos para avaliação histopatológica.....	31
Figura 6- Retirada de amostras da cauda do epidídimo para avaliação convencional ...	35
Figura 7- Fotomicrografia de cortes histopatológicos do parênquima testicular de cachacos com diferentes graus de degeneração, vistos nos aumentos de 100x e 400x, coloração Eosina e Nigrosina.....	33
Figura 8- Cortes histopatológicos do parênquima epididimário de cachacos diferentes vistos no aumento de 40x. Coloração Eosina e Nigrosina.....	33
Figura 9- Avaliação histopatológica de testículos e epidídimos de cachacos diferentes pelo programa ImageJ.....	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação histopatológica dos testículos de acordo com o grau de degeneração testicular	32
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela 1- Média \pm desvio padrão das características seminais dos cachaaos previamente à distribuição nos diferentes alojamentos (tratamentos).	37
Tabela 2- Média \pm desvio padrão da média das características seminais dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida após 9 semanas de tratamento.	37
Tabela 3- Média \pm erro padrão da média da biometria dos testículos dos cachaaos alojados em cela baia e baia enriquecida.	38
Tabela 4- Média \pm erro padrão da média da biometria dos epidídimos dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida.	38
Tabela 5- Média \pm erro padrão da média do escore (0-3) da degeneração hidrópica do testículos e epidídimos (0-1) dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida. .	39
Tabela 6- Média \pm erro padrão da média das características histopatológica dos testículos e epidídimos realizado por sistema computadorizado (image J) dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida.	39
Tabela 7- Média \pm erro padrão da média das características de volume, motilidade, vigor e concentração do sêmen da cauda do epidídimo dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida.	39
Tabela 8- Média \pm erro padrão da porcentagem de defeitos espermáticos do sêmen de epidídimo em defeitos espermáticos maiores (DEFMAIOR), menores com gota protoplasmática distal (DEFMENORcGPD) e sem gota distal (DEFMENORsGPD) e totais considerando a presença (DEF DEFTOTALcGPD) ou não (DEFTOTALsGPD) de gota protoplasmática distal.	40
Tabela 9- Média \pm erro padrão da média dos defeitos espermáticos de epidídimo de defeitos espermáticos individuais dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

F1	Filhos da primeira geração
n	Número amostral
LH	Hormônio luteinizante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
cm	centímetros
<i>g</i>	Força gravitacional
SP	São Paulo
MG	Minas Gerais
kg	Quilogramas
NRC	Nutrient Requirements of Council
<i>ad libitum</i>	À vontade
h	Hora
mL	Mililitro
μL	Microlitro
<i>bmp</i>	Bitmap
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
PROC	Procedimento
ANOVA	Análise de variância
Cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbico
μm ²	Mícron

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	Porcentagem
:	Para (1:100)
x	Vezes (aumento)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVOS.....	20
3.	HIPÓTESES.....	21
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	Sistemas de criação de suínos	22
3.2	Relação entre os sistemas de criação e a reprodução.....	23
3.3	Avaliação histológica e novas formas de análise	25
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1	Local e Período Experimental	27
4.2	Animais e divisão dos grupos experimentais	28
4.3	Colheita e análise do sêmen.....	29
4.4	Avaliação da biometria testicular e epididimária	30
4.5	Avaliações histopatológicas dos testículos e epidídimos	31
4.5.1	Avaliações histopatológicas subjetivas	32
4.5.2	Avaliação histopatológica computadorizada	33
4.6	Colheita e Avaliação do sêmen da cauda do epidídimo.....	34
4.7	Análise Estatística	35
5.	RESULTADOS.....	37
5.	DISCUSSÃO	41
6.	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido observado aumento na demanda de carne suína (O'CONNOR et al., 2021), e uma crescente exigência na produção de forma sustentável e incorporada à saúde e ao bem-estar animal (GUY et al., 2012; MCGLONE, 2013; O'CONNOR, et al., 2021). Este panorama vem ganhando atenção dos produtores que visam otimizar sua produção e ampliar a comercialização com mercados externos mais exigentes (BROOM; MOLENTO, 2004), os quais dependem da capacidade da granja em manter e evitar o sofrimento por meio de um bom sistema de criação (WEBSTER, 2001).

O ambiente em que os animais estão alojados durante a vida produtiva impacta tanto na saúde, por afetar os principais sistemas que compõem o organismo animal, quanto na rentabilidade da cadeia produtiva. O impacto financeiro é devido ao fato do estresse desencadear alterações significativas na imunologia, fisiologia e comportamento, acarretando prejuízos nos sistemas de produção (BAPTISTA et al., 2011; GUY et al., 2012; RAUW et al., 1998). Animais em desconforto, podem reduzir seu desempenho reprodutivo (MESQUITA et al., 2011; FOPPA et al., 2014), resultando em alterações no comportamento sexual (ZANELLA, 1996; HODEL et al., 2021), qualidade espermática, tamanho testicular e epididimário (HODEL et al., 2021; ELOY, 2007) e, por consequência, reduzir a qualidade da formação e armazenamento da célula espermática.

A restrição de movimentação e interação social, decorrentes dos sistemas de alojamentos mais usados para cachaços no Brasil (BENNEMANN et al., 2020; FLOWERS, 2015), alteram os receptores de opioides no cérebro (BROOM et al., 1995). Além disso, uma vez que o estresse inibe a secreção de GnRH, que por sua vez diminui as concentrações de LH plasmático, gera redução na secreção de testosterona, influenciando a espermatogênese e a maturação espermática, refletido na queda da concentração e qualidade dos espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo (ALMEIDA et al. 1998).

O processo de maturação espermática ainda não é totalmente conhecido, sendo a produção e o armazenamento dos espermatozoides um processo complexo, que reflete na fertilidade da célula e pode impactar diretamente no processo de capacitação espermática. Ainda é escasso o número de publicações quando o

assunto é avaliar as características reprodutivas de machos suínos (KEMPINA E KLINEFELTER, 2014), devendo ainda, levar em consideração o que pode alterar todo esse mecanismo.

2. OBJETIVOS

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar se o alojamento de cachacos em condições ambientais com mais espaço (baia) e enriquecimento em seu ambiente (baia + enriquecimento ambiental), apresenta melhores características reprodutivas enfatizadas por efeitos na biometria e histologia testiculares e epididimárias e na qualidade do sêmen.

3. HIPÓTESES

Com base nos objetivos e na literatura, a hipótese deste trabalho é que cachacos mantidos em ambientes com mais espaço e enriquecimento ambiental apresentam maior bem-estar, o que pode melhorar o desempenho reprodutivo caracterizado por:

1. Sêmen com maior volume, concentração, motilidade e vigor, e menor porcentagem de defeitos espermáticos dos animais alojados em sistemas de baia quando comparados com a cela, e valores ainda melhores nos sistemas de baia enriquecida comparado à baia. Estes efeitos devem ser notados tanto para o sêmen colhido *in vivo* (ejaculado) quanto *in vitro* (cauda do epidídimo).
2. Maior biometria testicular e epididimária dos animais em sistemas de baia comparados com a cela, sendo ainda maiores nos sistemas de baia enriquecida comparados à baia;
3. Melhor integridade dos epitélios seminífero e epididimário em sistemas de baia quando comparados com a cela, e nos sistemas de baia enriquecida comparado à baia;

3. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura serão abordadas informações sobre os principais sistemas de criação e alojamentos utilizados para cachaços no Brasil e como estes podem afetar o desempenho reprodutivo, enfatizando as características de biometria e histologia testiculares e epididimárias de suínos.

3.1 SISTEMAS DE CRIAÇÃO DE SUÍNOS

A suinocultura pode ser considerada uma das formas mais efetivas de criação, predominando ainda sistemas de confinamento intensivo no Brasil para otimizar espaço e desempenho econômico e produtivo (BAPTISTA et al., 2011). Sendo comum encontrar machos reprodutores em sistema de gaiolas, o que facilita as práticas de manejo (MESQUITA et al., 2011).

Já é bem descrito que sistemas de confinamento intensivo tem influência sobre a expressão do comportamento natural de suínos, podendo comprometer sua saúde (ALMEIDA, 2021; TELES, et al., 2017; BAPTISTA et al., 2011; GUY et al., 2012; RAUW et al., 1998); porém, não há informações na literatura sobre a influência de condições de alojamento para cachaços (ALMEIDA, 2021), embora já tenha sido relatado em porcas (SCHWARZ et al., 2021). Além disso, fatores como a temperatura, o fotoperíodo e a nutrição podem impactar negativamente na qualidade de vida, levando a um desajuste na homeostase que pode refletir na reprodução destes (ALMEIDA, 2021; FLOWERS, 2015).

As instalações para a criação de suínos para a produção de carne industrializada tendem a depreciar em um período de 20 a 30 anos, sendo então substituídas no final de um ciclo por instalações novas e aprimoradas. Assim, nas próximas décadas, não apenas as instalações aumentarão de tamanho, como serão substituídas. Espera-se que os sistemas passem de pastoreio e misto para o modelo industrializado sustentável (MCGLONE, 2013). Sendo assim, os sistemas de cela tendem a ser substituídos por baias.

A cela é um sistema que utiliza de pisos concretados e jaulas de ferro, fornecendo um ambiente inadequado e forçando o animal a ter interação somente com as barras de ferro que o compõe, comida, água e suas fezes (ALMEIDA, 2021).

Tudo isso leva a uma influência negativa em conforto e bem-estar (MCGLONE, 2013; MESQUITA et al., 2011), gerando dificuldade na manutenção da homeostase (MESQUITA et al., 2011) e causando assim um desequilíbrio em vários sistemas do organismo animal (WEBSTER, 2001).

A fim de minimizar esses efeitos os produtores buscam novas formas de evitar esse sofrimento utilizados sistemas que promovam maior bem-estar (BAPTISTA et al., 2011; FOPPA et al., 2014; WEBSTER, 2001). Sendo assim, novas metodologias utilizando espaços com dimensões maiores (por sistemas de baias) e o enriquecimento ambiental têm sido empregadas (FOPPA et al., 2014).

O enriquecimento ambiental tem sido utilizado em diversas espécies e em diversas formas, uma vez que busca diminuir a falta de interação do animal e trazer o mais próximo de seu comportamento natural (FOPPA et al., 2014; MORGAN et al., 2019). Todavia, para ser eficiente deve respeitar o comportamento específico da espécie, manter ou melhorar os níveis de saúde além de ser economicamente viável e prático de empregar (WEERD; EL DIA, 2009).

Suínos são animais que estão sempre em busca de explorar o ambiente, para satisfazer sua intensa necessidade de mastigar e fuçar. Pensando nisto, vários itens já foram utilizados para enriquecer o ambiente como aparas de palha ou madeira bolas, brinquedos de plástico, tapetes, itens pendurados em correntes, escova de nylon ou uma cabeça de vassoura, sendo excelentes, pois permitem que os suínos se envolvam em suas atividades naturais (SMITH; SWINDLE, 2006; WEERD; EL DIA, 2009).

3.2 RELAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE CRIAÇÃO E A REPRODUÇÃO

Fisiologicamente o estresse é desencadeado por uma resposta no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumentando a concentração do cortisol sérico, um glicocorticoide produzido pelo córtex da adrenal em resposta à secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), sendo considerado um indicador das respostas hormonais do corpo ao estresse (MORGAN et al., 2019).

A secreção do ACTH resulta na liberação dos glicocorticoides e de substâncias, como os opioides endógenos, podendo produzir beta-endorfinas pelas adrenais, que por sua vez, levam a alterações nos sistemas imunológico, reprodutivo,

digestivo, entre outros. As beta-endorfinas uma vez aumentadas bloqueiam as corticotrofinas e a secreção do hormônio luteinizante (LH) (ELOY, 2007).

A secreção de hormônios opioides endógenos agem nas gônadas e estão envolvidos em mecanismos como o controle do apetite, esteroidogênese, espermatogênese, termorregulação e comportamento sexual, levando a alterações das características seminais e até mesmo nas variáveis biométricas de testículos e epidídimos (ELOY, 2007).

Em estudo realizado com ratos, Almeida et al. (1998) demonstraram que estímulos estressantes inibem a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), diminuindo significativamente a concentração do LH plasmático, o que gera redução na secreção de testosterona, na produção de espermátides em maturação e na concentração de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo.

Para entender qual a influência do ambiente nas características reprodutivas é necessário o estudo dos principais órgãos que compõem o sistema reprodutor masculino, sendo o testículo e o epidídimo fundamentais para se entender como funciona a fisiologia masculina podendo até mesmo ajudar a prever o potencial reprodutivo de um indivíduo (AISSANOU; AYAD, 2020).

Os testículos são responsáveis pelas funções exócrina, de produção dos gametas masculinos pelos túbulos seminíferos e a função endócrina responsável pela liberação de hormônios sexuais, como, a testosterona produzida pelas células de Leydig. Outro mecanismo muito importante realizado por esse órgão é a termorregulação, uma vez que a temperatura testicular precisa estar abaixo da corporal para que a espermatogênese ocorra de forma eficiente. Esse processo se dá pela própria posição anatômica que favorece a troca de calor com o ambiente e algumas estruturas como a túnica dartos e o músculo cremáster, que são responsáveis por aproximar ou distanciar estes do corpo, e o plexo pampiniforme, que favorece a troca de calor entre o sangue arterial e o sangue venoso (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

O epitélio seminífero é composto pelas células de sustentação que são as células de Sertoli e as espermatogênicas que são estágios sucessivos do processo de diferenciação que se inicia com as espermatogônias, seguidos dos espermátocitos primários e secundários, espermátides e por fim, os espermatozoides (NASCIMENTO; SANTOS, 2003; FRANÇA et al., 2005). A espermatogênese, por sua vez é o processo

pelo qual uma célula germinativa passará por divisões mitóticas e meióticas resultando na formação dos espermatozoides (KIM et al., 2013).

Todo ciclo do processo espermatogênico em suínos leva em torno de 38,7 dias sendo contínuo ao longo de sua vida (KIM, et al., 2013; GARCIA-GIL et al., 2002; FRANÇA et al., 2005). Depois de formado, o espermatozoide sai do testículo ainda imaturo, e precisa passar pelo epidídimo para se tornar progressivamente móvel e capaz de fertilizar o oócito, esse processo leva em torno de 9 a 14 dias (Pruneda, et al., 2005; FRANÇA et al., 2005). Sendo assim, cada ciclo de renovação do epitélio seminífero em suínos dura em torno de 48,7 dias em média, sendo assim os animais ficaram nos tratamentos o suficiente para que tenham passado por mais de um ciclo (KIM, et al., 2013; GARCIA-GIL et al., 2002; FRANÇA et al., 2005).

Durante o transito epididimário ocorre um importante processo que é a transição da gota protoplasmática, sendo esta, ainda formada durante a diferenciação da espermatogênese em processo denominado espermiogênese. Durante o qual a medida que as espermátides alongadas seguem em direção à luz do túbulo seminífero a membrana vesicular e tubular formam uma aglomeração, e as células de Sertoli realizam um processo de fagocitose denominado de extrusão citoplasmática e o remanescente de citoplasma se tora a gota citoplasmática (GARCIA-GIL et al., 2002; FRANÇA et al., 2005).

Durante todo este desenvolvimento, se for exposto ao estresse, poderá ocorrer alterações que diminuem a eficiência reprodutiva, resultante na redução no volume seminal, motilidade, do número total de espermatozoides por ejaculado e aumento de anormalidades na morfologia espermática (WETTEMANN et al., 1976).

3.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E NOVAS FORMAS DE ANÁLISE

A biometria testicular é um importante indicador e sua caracterização de volume, comprimento e largura é descrita em vários animais domésticos (AISSANOU; AYAD, 2020); porém, em suínos ainda é pouco abordada. Vários fatores como idade, raça, bem como fatores fisiológicos ou causas patológicas podem alterar sua caracterização (AISSANOU e AYAD, 2020; PERUMAL, 2014).

A histologia é realizada de forma subjetiva, sendo ainda muito dependente da experiência do analista. Uma forma atual que vem sendo utilizada é através de análises computadorizadas, retirando assim a subjetividade, como feito através do

Software Image J. Esse programa é capaz de trazer novas informações permitindo fazer medidas de áreas, comprimentos e intensidade de cores, sendo possível analisar, editar e processar imagens de diversas áreas e em vários formatos (CELEGHINI et al., 2017). Além de fácil acesso, sendo possível baixar online de forma gratuita feito em formato Java, não sendo necessário um treinamento específico, uma vez que acompanha um manual de auxílio ao usuário garantindo assim a reprodutibilidade das condições de medida (FERREIRA; RASBAND 2012).

A avaliação dos epidídimos ainda é pouco usada como análise de eficiência reprodutiva, porém deve se levar em consideração que é uma parte importante principalmente no processo de armazenamento e capacitação espermática. Contudo, sabe-se que esta estrutura é responsável por levar a modificações espermáticas como a fagocitose de gotículas citoplasmáticas e outros resíduos luminais, também é encarregado da secreção de proteínas, além da diferenciação final, sendo assim o principal agente na alteração da programação espermática para que este seja capaz de fertilizar o oócito (FRANÇA et al., 2005; ALMEIDA, 2021; KEMPINAS; KLINEFELTER, 2014)

Técnicas extremamente interessantes para a conservação da biodiversidade estão sendo desenvolvidas, destacando-se a recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos; esses gametas, assim recolhidos são capazes de resistir após diferentes períodos. A obtenção de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo consiste em uma técnica para os propósitos de reprodução assistida. Em geral, é um recurso importante em casos de animais de alto valor genético, que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito. Tais espermatozoides obtidos por esta técnica são morfológicamente viáveis e mantêm a capacidade de sofrer capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fecundar o oócito (MOTA FILHO; SILVA, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR) e no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, ambos do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), Campus “Fernando Costa”, Pirassununga–SP (Figura 1 A e B, respectivamente). O processamento e preparo das amostras para o histopatológico foram realizadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Uberaba (UNIUBE), localizada na cidade de Uberaba-MG (Figura 1 C). Todos os animais foram alojados durante dezessete semanas no Laboratório de Pesquisa em Suínos do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, no Campus “Fernando Costa”, Pirassununga–SP (Figura 2).

Figura 1- Locais em que foram desenvolvidas as atividades experimentais



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: **A:** Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR), **B:** Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, ambos do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), *Campus* “Fernando Costa”, Pirassununga–SP. **C:** Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba-MG.

Figura 2- Local de alojamento dos animais durante o experimento



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: Laboratório de Pesquisa em Suínos do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, no *Campus* "Fernando Costa", Pirassununga-SP.

4.2 ANIMAIS E DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A realização deste experimento foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo CEUA nº 3612010616.

Foram utilizados 25 cachaços híbridos (F1: Large White X Landrace) com idade média de 5 meses, inicialmente alojados em baias individuais contendo dimensões de 3,85 x 1,2 metros (4,62 m²), até o término do condicionamento para colheita de sêmen.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 07h e às 13h, com a mesma quantidade oferecida para todos os animais de 2,8 kg de concentrado diariamente. O concentrado era constituído de milho, farelo de soja e premix mineral (3300 kcal por kg, de acordo com o NRC 2012). A água era fornecida *ad libitum* por meio de bebedouros individuais tipo chupeta.

Após condicionados, com 10 meses, os animais foram distribuídos em três tipos de alojamentos (Figura 3): Cella (Figura 3 A), geralmente utilizada para machos reprodutores, medindo 2,3 x 0,7 metros (n=9), Baia, medindo 3,85 x 1,2 metros (n=8) (Figura 3 B) e Baia Enriquecida, medindo 3,85 x 1,2 metros, com acréscimo de enriquecimento ambiental (n=8) (Figura 3 C).

Para o enriquecimento ambiental os animais foram escovados, por 2 minutos ininterruptos, receberam feno e ducha de água por 30 segundos. Estes procedimentos de enriquecimento ambiental foram fornecidos duas vezes ao dia, uma hora após a alimentação matutina e vespertina.

Figura 3- Imagem dos diferentes alojamentos (tratamentos) em que os animais foram distribuídos e mantidos



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: **A:** animais alojados em cela (2,3 x 0,7 m), **B:** animais alojados em baia (3,85 x 1,2 m) e **C:** animal alojado em baia (3,85 x 1,2 m) com enriquecimento ambiental: feno, banho e escovação.

4.3 COLHEITA E ANÁLISE DO SÊMEN

Os animais foram submetidos à colheita de sêmen, pela técnica da mão enluvada, em dois momentos: previamente à distribuição nos tratamentos, período considerado como controle, e nove semanas após o início do tratamento. Após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia.

O volume do sêmen foi definido em mililitro (mL). A concentração foi determinada pela contagem de uma amostra em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica com aumento de 400x, após ser diluído em formol salino tamponado na diluição 1:100.

Para a avaliação da motilidade e do vigor foi adicionada uma gota da amostra do sêmen entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de contraste de fase em aumento de 100x. A motilidade foi definida pela porcentagem de espermatozoides que apresentavam movimento e o vigor era relacionado a velocidade progressiva das células em movimento, classificado em escore de 1 a 5, sendo o escore 1 referente ao espermatozoide menos progressivo, aumentando gradativamente até o escore 5 referente ao movimento mais progressivo.

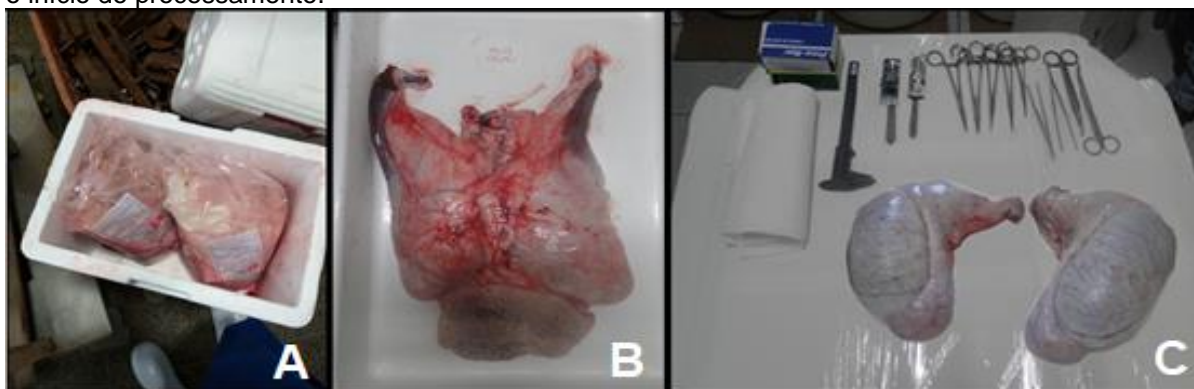
Para avaliação da morfologia, uma amostra de sêmen foi diluída em formol salino e mantidos sob refrigeração até análise. A avaliação morfológica espermática foi realizada pela técnica da câmara úmida, sendo uma alíquota inserida entre lâmina e lamínula e observada em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x, com óleo de imersão. Foram avaliadas 200 células por amostra e as alterações classificadas em defeitos maiores e menores (ARRUDA et al., 2011).

4.4 AVALIAÇÃO DA BIOMETRIA TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIA

Após trinta semanas do início do tratamento, os animais foram eutanasiados, para isso foram insensibilizados utilizando eletronarcolese seguido pelo uso de pistola de dardo cativo penetrativo (Accles & Shelvoke, Dispatch Kit. 25) e posteriormente realizada a exsanguinação. Esse método descrito é aceito com restrição em suínos e outras espécies pelo documento “Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, 2013” e também na resolução do CFMV número 1000, definido como eficaz nos documentos listados: AVMA Guidelines for Humane Slaughter of Animals: 2016. Edition, page 28; American Meat Institute Guidelines 2013, página 19-20.

Após eutanásia, foi realizada a remoção dos testículos e epidídimos recobertos pelo escroto, para manter a integridade das estruturas, os quais foram imediatamente enviados ao laboratório para processamento sob refrigeração (15° C) (Figura 4 A e B). No laboratório, a pele do escroto foi retirada, sendo exposto o complexo testículo-epidídimo-ducto deferente (Figura 4 C).

Figura 4- Imagens antes do processamento das amostras logo após a coleta, seguida do escroto para o início do processamento.



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: **A:** condicionamento das estruturas contendo testículos, epidídimos e escroto para transporte do abatedouro ao laboratório imediatamente após a colheita, **B:** Estrutura recebida no laboratório para as análises iniciais, e **C:** estrutura após remoção do escroto e exposição do complexo testículo-epidídimo-ducto deferente para posterior processamento.

Em seguida, foram realizadas as mensurações biométricas dos testículos e epidídimos com o auxílio de um paquímetro, sendo considerados: comprimento, largura e espessura em centímetros (PEIXOTO et al., 2012).

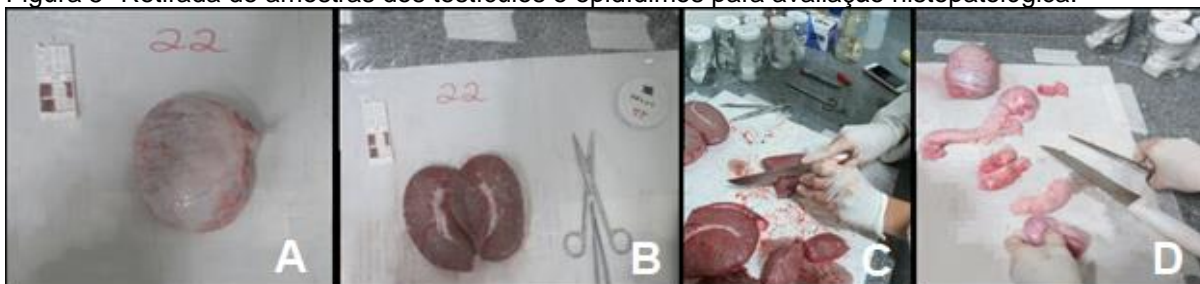
O comprimento testicular foi medido colocando o braço fixo do paquímetro na extremidade proximal e o braço deslizante na extremidade distal. A espessura ou

profundidade foi medida colocando o braço fixo na face anterior e o braço deslizante na face posterior, no ponto de profundidade máxima. A largura foi medida colocando um braço do compasso na face medial e o outro na face lateral, no ponto de largura máxima. O volume dos testículos foi calculado pela fórmula descrita por Perumal (2014): $Volume\ testicular = \frac{4}{3}\pi \cdot \left(\frac{espessura}{2}\right) \cdot \left(\frac{largura}{2}\right) \cdot \left(\frac{comprimento}{2}\right)$.

O comprimento epididimário foi mensurado colocando o braço fixo do paquímetro na extremidade proximal da cabeça e o braço deslizante na extremidade distal da cauda. A espessura ou profundidade foi medida colocando o braço fixo na face anterior e o braço deslizante na face posterior, no ponto de profundidade máxima. A largura foi medida colocando um braço do compasso na face medial e o outro na face lateral, no ponto de largura máxima (PERUMAL, 2014).

Após mensurados, foi realizada dissecação e separação dos testículos e epidídimos e imediatamente retiradas amostras das porções cranial, média e ventral de cada testículo (direito e esquerdo) para análise histopatológica (PEIXOTO et al., 2012). Dos epidídimos foram coletadas amostras correspondentes às porções da cabeça, corpo e cauda para exame histopatológico (PRUNEDA et al., 2005), como demonstrado na Figura 5 A a C.

Figura 5- Retirada de amostras dos testículos e epidídimos para avaliação histopatológica.



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: **A**, **B** e **C**: mostram a retirada de amostras dos testículos e **D**: retirada de amostras dos epidídimos para realização da avaliação histopatológica e colheita do sêmen da cauda do epidídimo pela técnica de *squeeze*.

4.5 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS

Para avaliação histopatológica, as amostras obtidas dos testículos e epidídimos foram mantidas em formol salino 10% até o momento do processamento. As amostras de testículos foram retiradas das porções dorsal, média e ventral (PEIXOTO et al., 2012) e dos epidídimos foram correspondente à cabeça, ao corpo e

à cauda (PRUNEDA et al., 2005). Os fragmentos foram submetidos à desidratação, emblocamento em parafina, laminação e coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para posterior leitura. As lâminas histológicas foram avaliadas de forma subjetiva por microscopia óptica em aumento de 100x e por sistema computadorizado utilizando o *software* Image J.

4.5.1 Avaliações histopatológicas subjetivas

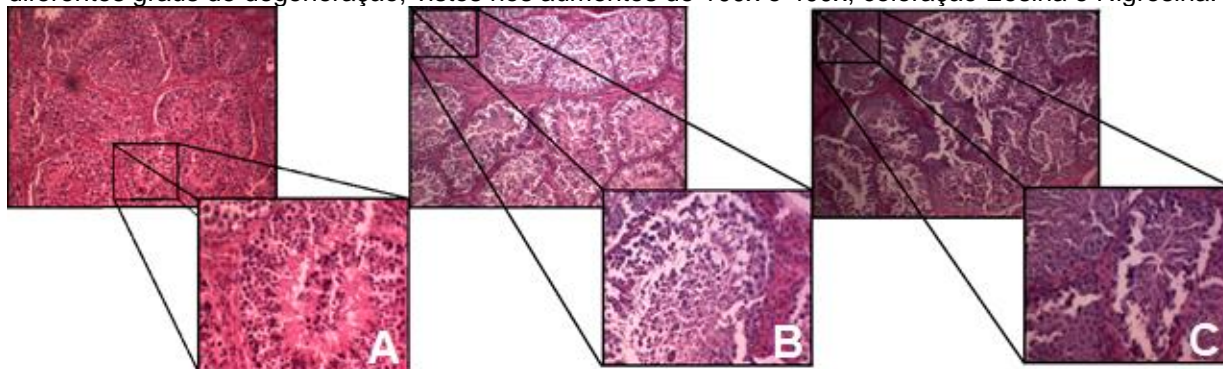
Para a avaliação histopatológica subjetiva dos testículos foram consideradas as alterações do parênquima testicular, classificadas em graus de 0 a 3, considerando as características tissulares de degeneração testicular conforme descrito no Quadro 1 (SANTOS; NASCIMENTO, 2016) e ilustrado na Figura 7. Já o parênquima epididimário foi classificado em ausência (score 0) (Figura 8 A) ou presença de degeneração (score 1) (Figura 8 B).

Quadro 1- Classificação histopatológica dos testículos de acordo com o grau de degeneração testicular

Classificação	Intensidade da Degeneração	Descrição
Grau 0	Ausente	Células germinativas íntegras sem presença de vacúolos no epitélio seminífero.
Grau 1	Discreta	Presença de células germinativas degeneradas; Desprendimento destas células para o lúmen tubular. Presença de vacúolos no epitélio seminífero.
Grau 2	Moderada	Acentuada perda de células germinativas, apresentando as remanescentes degeneradas. Vacuolização acentuada no epitélio seminífero e diminuição da altura deste.
Grau 3	Acentuada	Acentuada perda do epitélio seminífero e exacerbada presença de vacúolos. Epitélio germinativo composto quase exclusivamente por células de Sertoli e substituição por tecido conjuntivo fibroso.

Fonte: SANTOS e NASCIMENTO (2016).

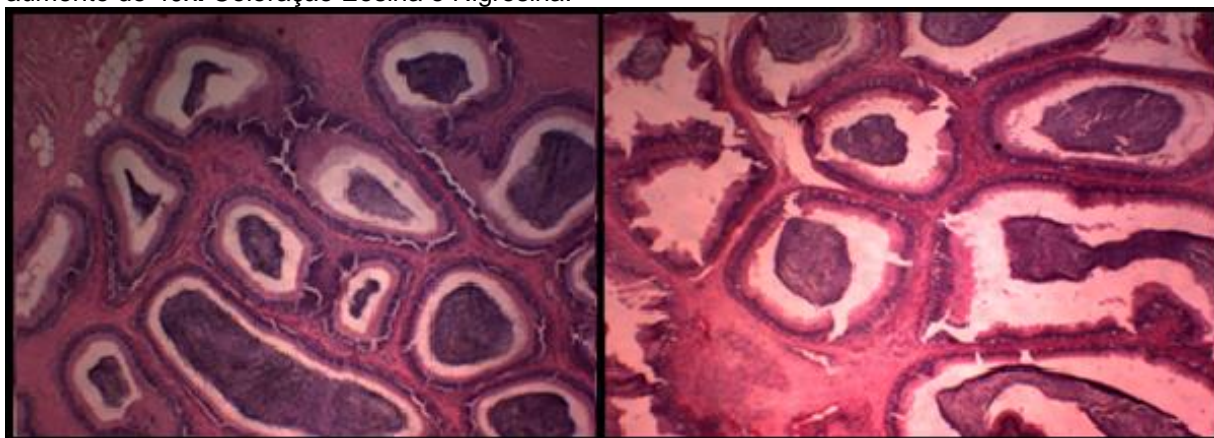
Figura 6- Fotomicrografia de cortes histopatológicos do parênquima testicular de cachaaos com diferentes graus de degeneraação, vistos nos aumentos de 100x e 400x, coloraação Eosina e Nigrosina.



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: Nessas imagem estão representados campos de diferentes lâminas e animais em aumento de 100 e 400x com degeneraação hidrópica do epitélio testicular, sendo em **A**: grau 1, **B**: grau 2 e **C**: grau 3.

Figura 7- Cortes histopatológicos do parênquima epididimário de cachaaos diferentes vistos no aumento de 40x. Coloraação Eosina e Nigrosina.



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: **A**: epidídimo sem degeneraação hidrópica do epitélio e **B**: epidídimo com degeneraação hidrópica.

4.5.2 Avaliaaação histopatológica computadorizada

Em microscópio de contraste de fase (Modelo Eclipse E200, Nikon) foi acoplada uma câmara de vídeo digital (Modelo Eureka 5.0, USB 5M USB 2,0 2592 X 1944 pixel) conectada ao computador para armazenamento das imagens em formato “bmp”, para avaliaaação pelo *software* Image J (*National Institutes of Health- NIH*) (HAGAN et al., 2015).

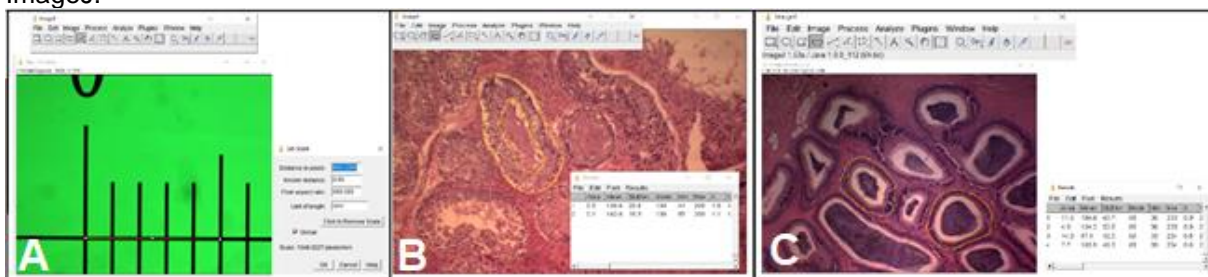
Dos testículos, em aumentos de 100x, foram realizadas imagens de cinco diferentes campos aleatários da lâmina, sendo mensurados três diferentes túbulos por animal e considerada a média dos três para a avaliaaação da área total do túbulo seminífero (μm^2), área do epitélio seminífero (μm^2) e área do lúmen (μm^2). A partir

desta análise foi calculada a relação entre a área do epitélio e a área total do túbulo seminífero (epitélio/túbulo seminífero) (ALVES, 2014).

Para os epidídimos, a mesma técnica foi utilizada, porém, avaliando as imagens em aumentos de 40x. Foram digitalizados cinco campos aleatórios da lâmina e mensurados três diferentes cortes transversais do ducto epididimário por animal. Foi considerada a média dos três cortes para a avaliação da área total do ducto epididimário (μm^2), área do epitélio epididimário (μm^2), área do lúmen (μm^2) e a relação entre a área do epitélio e a área total do ducto epididimário (epitélio/ducto epididimário) (ALVES, 2014).

No *software* Image J foi utilizada a ferramenta “*Straight*” para calibrar uma distância conhecida convertida de pixels para mm por meio da régua graduada fotografada separadamente de cada imagem (FIGURA 9 A). Para as avaliações de área total do túbulo seminífero e ducto epididimário, área do epitélio seminífero e epididimário e área do lúmen foi utilizada a ferramenta “*Freehand selections*” e os resultados para serem apresentados fazia-se necessário apertar a letra M do teclado e estes eram copiados e salvos em Planilha em Excel (FIGURA 9 B e C).

Figura 8- Avaliação histopatológica de testículos e epidídimos de cachaaos diferentes pelo programa ImageJ.



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: **A**: régua graduada para calibração do software usando a ferramenta “*Straight*”, **B**: mensuração dos túbulos seminíferos, evidenciando o epitélio e o lúmen **C**: mensuração do ducto epididimário, em ambas (B e C) usando a ferramenta “*Freehand selections*”.

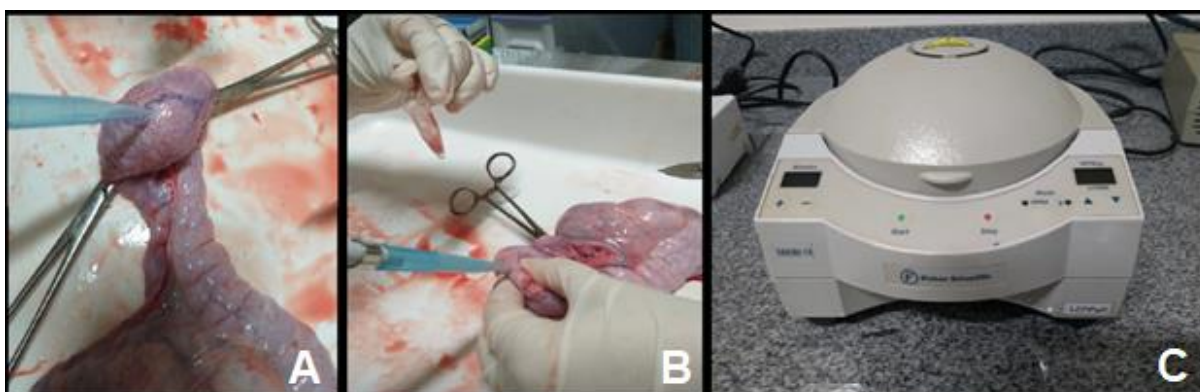
4.6 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

Os epidídimos foram submetidos à colheita de espermatozoides da porção da cauda pela técnica de *squeeze* (Figura 5D), que consiste na compressão e impulsão dos espermatozoides do ducto deferente e cabeça do epidídimo em direção à cauda do epidídimo, a qual foi seccionada em diferentes segmentos (MOTA FILHO; SILVA, 2012), sendo retiradas amostras espermática. Este procedimento foi realizado

nos dois epidídimos (direito e esquerdo) para o processamento de uma amostra por animal.

Os espermatozoides foram colhidos utilizando-se pipeta graduada (Figura 6 A), colocados em microtubos (Figura 6 B), diluído em meio sintético de longa duração (Androstar Plus[®]) e submetidos à centrifugação em 700 x g durante 10 minutos (MELO et al., 2010; CHATTARAJ et al., 2018) (Figura 6 C). Após, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensionado novamente em diluidor (Androstar Plus[®]). Após um período de 30 minutos de interação com o diluidor, a amostra foi avaliada quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática, como descrito anteriormente para o sêmen colhido com animal vivo.

Figura 9- Retirada de amostras da cauda do epidídimo dos cachaços para avaliação espermática.



Fonte: REZENDE (2021)

Legenda: **A:** dissecação do epidídimo para colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo. **B:** retirada de espermatozoides da cauda do epidídimo por pipetagem. **C:** microcentrífuga utilizada para separar os espermatozoides para realizar as avaliações.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram avaliados utilizando o programa *Statistical Analyses Systems* (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Os mesmos foram previamente verificados quanto a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não respeitaram a normalidade foram transformados e/ou feita a retirada de *outliers*. Os dados que mesmo após transformação e/ou retirada dos *outliers* não respeitaram as premissas, foram analisados por estatística não paramétrica de ordem, sendo feita a análise pelo teste de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY). Os dados normais ou transformados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido da observação de diferenças entre os grupos

(cela, baia e baia enriquecida), quando significativa pelo teste de Tukey-Kramer (PROC GLIMMIX). Os dados foram apresentados em forma de média e erro padrão da média. Para todas as comparações foi considerado o nível de significância estatística de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

Previamente ao início da distribuição dos animais nos diferentes alojamentos os três grupos apresentavam características seminais semelhantes (Tabela 1).

Tabela 1- Média \pm desvio padrão das características seminais dos cachaaos previamente à distribuição nos diferentes alojamentos (tratamentos).

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENRIQUECIDA
Volume (mL)	370 \pm 83,927	430 \pm 166,3	334,3 \pm 117,3
Concentração ($\times 10^6$ sptz/mL)	236,1 \pm 72,7	290,9 \pm 216	240,8 \pm 99,1
Motilidade (%)	65 \pm 12,9	57,5 \pm 16,2	62,5 \pm 21,3
Vigor (1-5)	3,17 \pm 0,79	2,81 \pm 0,8	3,25 \pm 1,12
Defeitos Menores (%)	8,4 \pm 13,1	5 \pm 5,4	6,2 \pm 4,7
Defeitos Maiores (%)	10,3 \pm 13,9	9,1 \pm 13,8	6,5 \pm 4,8
Defeitos Totais (%)	18,7 \pm 26,8	13,1 \pm 18,6	12,7 \pm 8,4

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Não houve diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p > 0.05$).

Após 9 semanas dos animais mantidos nos diferentes alojamentos também não foram observados efeitos do alojamento sobre as características seminais (Tabela 2).

Tabela 2- Média \pm desvio padrão da média das características seminais dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida após 9 semanas de tratamento.

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENRIQUECIDA
Volume (mL)	427,8 \pm 103,7	469,3 \pm 148,7	398,1 \pm 129,8
Concentração ($\times 10^6$ sptz/mL)	257,5 \pm 85,9	277,8 \pm 184,3	306,5 \pm 93,0
Motilidade (%)	68,3 \pm 10,8	59,4 \pm 23,8	71,9 \pm 22,9
Vigor (1-5)	2,8 \pm 1,0	3,2 \pm 0,7	3,7 \pm 1,1
Defeitos Menores (%)	7,7 \pm 4,3	11,3 \pm 11,3	6,8 \pm 3,4
Defeitos Maiores (%)	14,9 \pm 24,5	10,5 \pm 12,3	9,7 \pm 7,0
Defeitos Totais (%)	22,69 \pm 27,7	21,1 \pm 20,4	16,2 \pm 9,0

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Não houve diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p > 0.05$).

Após 30 semanas da distribuição dos animais nos tratamentos, não foram notadas diferenças estatísticas quanto às características biométricas dos testículos (Tabela 3) e epidídimos (Tabela 4) nos diferentes alojamentos.

Tabela 3- Média \pm erro padrão da média da biometria dos testículos dos cachaços alojados em cela baia e baia enriquecida.

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENR.	Valor de p
Largura Testículo Direito (cm)	8,56 \pm 0,35	8,09 \pm 0,18	7,96 \pm 0,26	0,3
Largura Testículo Esquerdo (cm)	8,68 \pm 0,29	8,29 \pm 0,22	8,04 \pm 0,16	0,2
<i>Média Largura Testicular (cm)</i>	<i>8,62 \pm0,31</i>	<i>8,19 \pm0,17</i>	<i>8 \pm0,17</i>	<i>0,2</i>
Comprimento Testículo Direito (cm)	14,03 \pm 0,5	13,08 \pm 0,48	12,6 \pm 0,43	0,1
Comprimento Testículo Esquerdo (cm)	13,7 \pm 0,41	12,68 \pm 0,47	12,66 \pm 0,43	0,2
<i>Média do Comprimento Testicular (cm)</i>	<i>13,87 \pm0,41</i>	<i>12,88 \pm0,46</i>	<i>12,63 \pm0,41</i>	<i>0,1</i>
Espessura Testículo Direito (cm)	5,19 \pm 0,29	4,89 \pm 0,27	5,25 \pm 0,24	0,6
Espessura Testículo Esquerdo (cm)	5,39 \pm 0,16	5,33 \pm 0,29	5,51 \pm 0,24	0,8
<i>Média da Espessura Testicular (cm)</i>	<i>5,29 \pm0,21</i>	<i>5,11 \pm0,24</i>	<i>5,38 \pm0,21</i>	<i>0,7</i>
Volume Testículo Direito (cm ³)	335,14 \pm 37,88	268,29 \pm 13,19	274,26 \pm 14,4	0,2
Volume Testículo Esquerdo (cm ³)	341,83 \pm 30,56	291,25 \pm 17,76	291,76 \pm 11,44	0,2
<i>Média do Volume Testicular (cm³)</i>	<i>338,49 \pm33</i>	<i>279,77 \pm13</i>	<i>283,01 \pm10,76</i>	<i>0,15</i>

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Não houve diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 4- Média \pm erro padrão da média da biometria dos epidídimos dos cachaços alojados em cela, baia e baia enriquecida.

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENR.	Valor de p
Largura Epidídimo Direito (cm)	3,83 \pm 0,38	4,3 \pm 0,41	4,05 \pm 0,29	0,7
Largura Epidídimo Esquerdo (cm)	3,9 \pm 0,29	4,21 \pm 0,45	4,3 \pm 0,48	0,8
<i>Média da Largura dos Epidídimos (cm)</i>	<i>3,87 \pm0,91</i>	<i>4,26 \pm1,12</i>	<i>4,18 \pm0,98</i>	<i>0,5</i>
Comprimento Epidídimo Direito (cm)	4,28 \pm 0,33	4,31 \pm 0,2	3,86 \pm 0,17	0,4
Comprimento Epidídimo Esquerdo (cm)	4,03 \pm 0,13	4,14 \pm 0,19	4,09 \pm 0,16	0,9
<i>Média do Comprimento Epididimário (cm)</i>	<i>4,16 \pm0,22</i>	<i>4,23 \pm0,16</i>	<i>3,98 \pm0,16</i>	<i>0,6</i>
Espessura Epidídimo Direito (cm)	3,04 \pm 0,38	2,26 \pm 0,13	2,61 \pm 0,11	0,1
Espessura Epidídimo Esquerdo (cm)	3 \pm 0,31	2,81 \pm 0,28	2,63 \pm 0,16	0,6
<i>Média da Espessura Epididimária (cm)</i>	<i>3,02 \pm0,31</i>	<i>2,54 \pm0,19</i>	<i>2,62 \pm0,12</i>	<i>0,3</i>

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Não houve diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p > 0,05$).

Também não houve diferença estatística entre os diferentes alojamentos em relação à presença de degeneração hidrópica dos testículos e epidídimos avaliada de forma subjetiva (Tabela 5). Entretanto, quando avaliado pelo sistema computadorizado (*software Image J*), foi verificado que os animais alojados na baia apresentaram maior ($p=0,01$) área do epitélio epididimário do que os animais de cela e baia enriquecida (Tabela 6). Em adição, foi notado menor ($p=0,05$) lúmen do ducto epididimário para o grupo alojado em baia enriquecida do que para o grupo alojado em cela (Tabela 6).

Tabela 5- Média \pm erro padrão da média do escore (0-3) da degeneração hidrópica dos testículos e epidídimos (0-1) dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida.

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENR.	Valor de p
Degeneração hidrópica testicular (0-3)	2,11 \pm 0,31	1,75 \pm 0,31	1,63 \pm 0,32	0,5
Degeneração hidrópica epididimária (0-1)	0 \pm 0	0,13 \pm 0,35	0,13 \pm 0,35	0,5

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Não houve diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 6- Média \pm erro padrão da média das características histopatológicas dos testículos e epidídimos realizado por sistema computadorizado (image J) dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida.

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENR.	Valor de p
Área total do túbulo seminífero (μm^2)	71.85 \pm 7.68	69.18 \pm 8.84	63.27 \pm 8.31	0.7
Área do epitélio seminífero (μm^2)	54.01 \pm 5.47	51.92 \pm 6.28	48.06 \pm 6.39	0.8
Área do lúmen do túbulo seminífero (μm^2)	17.84 \pm 2.26	17.26 \pm 2.7	15.21 \pm 2.3	0.7
Relação área do epitélio/túbulo seminífero	0.75 \pm 0.01	0.76 \pm 0.01	0.76 \pm 0.02	0.9
Área total do ducto epididimário (μm^2)	261.15 \pm 29.61	235.65 \pm 33.11	167.6 \pm 21.57	0.09
Área do epitélio epididimário (μm^2)	120.93 \pm 8.35 ^b	167.24 \pm 20.94 ^a	112.63 \pm 7.43 ^b	0.01
Área do lúmen epididimário (μm^2)	139.24 \pm 28.89 ^a	86.76 \pm 16.75 ^{ab}	64.39 \pm 11.94 ^b	0.05
Relação área do epitélio/ducto epididimário	0,49 \pm 0,06	0,62 \pm 0,05	0,6 \pm 0,06	0,2

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Letras diferentes sobrescritas nas linhas representam diferença estatística segundo o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Quanto às características de volume, motilidade, vigor e concentração dos espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 7). Para morfologia espermática somente notou-se maior percentual de defeitos totais sem gota citoplasmática distal para o grupo cela em relação ao grupo baia enriquecida ($p=0,03$) (Tabelas 8 e 9).

Tabela 7- Média \pm erro padrão da média das características de volume, motilidade, vigor e concentração dos espermatozoides da cauda do epidídimo dos cachaaos alojados em cela, baia e baia enriquecida.

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENRIQUECIDA	Valor de p
Volume (μL)	594,44 \pm 155,01	551,25 \pm 115,94	581,25 \pm 157,97	0,9
Motilidade (%)	38,89 \pm 4,06	28,13 \pm 3,53	37,5 \pm 2,99	0,09
Vigor (1-5)	2,17 \pm 0,56	1,88 \pm 0,35	2,0 \pm 0,27	0,2
Concentração (sptz x $10^6/\text{mL}$)	527,22 \pm 40,35	581,88 \pm 36,72	589,38 \pm 57,82	0,6

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Não houve diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p > 0.05$).

Tabela 8- Média \pm erro padrão da porcentagem de defeitos espermáticos do sêmen de epidídimo em defeitos espermáticos maiores (DEFMAIOR), menores com gota protoplasmática distal (DEFMENORcGPD) e sem gota distal (DEFMENORsGPD) e totais considerando a presença (DEFDEFTOTALcGPD) ou não (DEFDEFTOTALsGPD) de gota protoplasmática distal.

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENRIQUECIDA	Valor de p
DEFMAIOR	12,17 \pm 1,38	10,06 \pm 1,93	9,5 \pm 1,48	0,4
DEFMENORcGPD	34,67 \pm 6,1	27,81 \pm 2,19	24,44 \pm 3,74	0,3
DEFMENORsGPD	8,89 \pm 3,87	6,06 \pm 1,22	3,31 \pm 0,91	0,2
DEFDEFTOTALcGPD	86,94 \pm 16,81	67,38 \pm 5,47	56,69 \pm 8,15	0,2
DEFDEFTOTALsGPD	29,94 \pm 8,08 ^a	22,19 \pm 3,47 ^{ab}	16,13 \pm 2,88 ^b	0,03

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Letras minúsculas diferentes sobrescritas nas linhas representam diferença estatística segundo o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Tabela 9- Média \pm erro padrão da média dos defeitos espermáticos de epidídimo de defeitos espermáticos individuais dos cachachos alojados em cela, baia e baia enriquecida.

Variável	CELA	BAIA	BAIA ENRIQUECIDA	Valor de p
Defeito em Acrossoma	4,17 \pm 0,99	3,69 \pm 0,74	3,94 \pm 1,23	0,9
Gota Protoplasmática Proximal	3,78 \pm 0,96	2,25 \pm 0,76	3 \pm 0,63	0,3
Cabeça Subdesenvolvida	0,28 \pm 0,17	0,13 \pm 0,08	0,25 \pm 0,19	0,7
Cauda Enrolada na Cabeça	0,11 \pm 0,22	0 \pm 0	0 \pm 0	0,2
Cabeça Isolada Patológica	0,06 \pm 0,17	0,13 \pm 0,23	0 \pm 0	0,3
Cabeça Estreita na Base	0,06 \pm 0,17	0,31 \pm 0,46	0,06 \pm 0,18	0,3
Cabeça Piriforme	0,11 \pm 0,22	0,06 \pm 0,18	0,13 \pm 0,23	0,8
Cabeça Pequena Anormal	-	-	-	-
Cabeça com Contorno Anormal	0,11 \pm 0,22	0,13 \pm 0,23	0,06 \pm 0,18	0,8
“Pouch Formation”	-	-	-	-
Teratológica	-	-	-	-
Alterações de peça intermediária: fibrilação/fratura e edema	2,78 \pm 0,51	2,63 \pm 0,58	1,56 \pm 0,27	0,2
Cauda Fortemente Dobrada ou Enrolada	0,78 \pm 1,97	0,44 \pm 0,56	0,25 \pm 0,38	0,7
Cauda Dobrada Com Gota Distal	0,11 \pm 0,22	0,31 \pm 0,46	0,31 \pm 0,46	0,6
Cabeça Delgada	-	-	-	-
Cabeça Gigante/Curta/Larga	0 \pm 0	0,19 \pm 0,37	0,06 \pm 0,18	0,3
Cabeça isolada Normal	0,22 \pm 0,51	0,13 \pm 0,23	0,13 \pm 0,23	0,9
Inserção Abaxial/Retroaxial	1,67 \pm 0,45	1,06 \pm 0,2	1,75 \pm 0,68	0,7
Cauda Dobrada ou Enrolada	7 \pm 3,79	4,13 \pm 1,35	1,38 \pm 0,4	0,2
Gota Protoplasmática Distal	25,22 \pm 5,98	22,38 \pm 2,1	21,19 \pm 3,51	0,8

Fonte: Rezende (2021)

Legenda: Não houve diferença estatística segundo o teste de Tukey ($p > 0.05$).

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para avaliar se a melhora nas condições de alojamento de cachaços, seja proporcionando maior espaço para movimentação e adicionando enriquecimento ambiental, por reduzirem o estresse dos animais, refletem sobre a morfofisiologia dos testículos e epidídimos, melhorando a biometria e as características histológicas destes órgãos, bem como resultam em melhor qualidade espermática. Apesar desse experimento ter apresentado pouca diferença estatística entre os grupos de animais submetidos aos diferentes alojamentos (cela, baia e baia enriquecida), é necessário levar em consideração que ainda há pouca literatura que apresentem valores com parâmetros normais e que demonstrem quais fatores podem interferir no sistema reprodutivo de cachaços. Além disso, quais são as consequências de alojamentos que causam maior estresse comparados aos que promovem maior bem-estar a curto e a longo prazo, sendo assim este trabalho pioneiro servirá de base para a realização de outros estudos.

As características seminais similares durante o período que antecedeu a distribuição dos animais nos diferentes alojamentos, ou seja, pré-tratamento comprovam que os grupos eram homogêneos e os animais eram hígdidos do ponto de vista reprodutivo. Após nove semanas dos animais alojados nos diferentes tratamentos, o sêmen dos cachaços foi novamente colhido e avaliado quanto às mesmas características e, nenhum efeito foi notado sobre a qualidade espermática. Esta segunda avaliação do sêmen, que ocorreu 63 dias depois da mudança no alojamento dos animais, foi suficiente para que no ejaculado fossem encontradas células espermáticas produzidas durante o período de tratamento, já que de acordo com França et al. (2005) o tempo de duração total da espermatogênese no suíno é de 38,7 dias; além disso, o tempo de trânsito epididimário é de 9 a 11 dias. Esperávamos encontrar melhora na qualidade espermática dos cachaços alojados em condições com maior bem-estar, uma vez que já é descrito que o desconforto pode levar a uma alteração na qualidade espermática (HODEL et al., 2021; ELOY, 2007), podendo ser afetada pela genética ou pelo ambiente (ALM et al., 2006; CHENOWETH; 2005). Porém, quando foram avaliados os espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo, 30 semanas após a manutenção dos cachaços nestes alojamentos, foi observada

redução da porcentagem de defeitos totais espermáticos nos animais mantidos em baias com enriquecimento ambiental quando comparados àqueles mantidos em celas. Este achado neste período pode ser um indício inicial de que pode se esperar melhora na qualidade espermática em função do bem-estar animal, mas que este efeito poderá ser notado somente após um período mais longo, fato que ainda precisa ser provado em outro estudo com a manutenção dos animais por mais tempo nestas condições.

Neste estudo, a biometria testicular dos animais não foi afetada pela condição de alojamento, o que contradiz o descrito na literatura, em que o estresse afetou esta característica (HODEL et al., 2021). Vários trabalhos demonstraram haver uma relação entre a biometria e a produção espermática, concentração, total de células viáveis, motilidade e a fertilidade dos animais (PERUMAL, 2014; GAGGINI et al., 2018; INDRIASTUTI et al., 2020). O que foi corroborado pelos resultados similares da qualidade dos espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo. Entretanto, deve se considerar o tempo que os animais foram mantidos nestes alojamentos (212 dias) e a idade que foram distribuídos neles. Os cachacos foram submetidos a estes diferentes alojamento com 10 meses de idade, ou seja, após atingirem a maturidade sexual, fica aqui a dúvida para um próximo estudo se o alojamento destes animais fosse mais precoce, ainda antes ou no tempo da puberdade, poderia se esperar mais efeitos sobre o desenvolvimento testicular como efeito do ambiente de criação.

A biometria epididimária ainda é pouco realizada na maioria das espécies, e pelo conhecimento dos autores ainda não foi realizada em suínos machos, faltando estudos que a utilizem e a descrevam como forma de avaliação reprodutiva, e demonstrem se há uma relação positiva entre seu aumento em relação a fertilidade animal. Porém, assim como o testículo a extensão do epidídimo influencia diretamente no amadurecimento, modificação da membrana espermática e fagocitose de resquícios luminais, uma vez que cada compartimento exerce uma função específica junto ao espermatozoide (KEMPINA E KLINEFELTER, 2014; ROBAIRE et al., 2006). Também não foram notados efeitos do ambiente de alojamento sobre esta característica epididimária neste estudo.

Intrigantemente, todos os animais apresentaram algum grau de degeneração testicular, o que pode ter sido causado por não terem sido mantidos em ambiente com temperatura controlada, uma vez que essa espécie sofre com o clima tropical, afetando a homeostasia térmica sistêmica do animal, levando à perda na termorregulação testicular (ALVES, 2014), uma vez que a temperatura testicular

precisa estar abaixo da corporal para que a espermatogênese ocorra de forma eficiente (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Talvez, tanto a degeneração testicular como a epididimária poderia ter demonstrado efeito do alojamento se fossem mantidos por mais tempo, esperando alterações mais severas para o grupo cela, já que o estresse seria mais prolongado e poderia culminar com insultos testiculares. O trabalho de Almeida (2021) demonstrou que a temperatura superficial escrotal foi superior nos animais alojados em cela do que aqueles mantidos em baias, além de apresentarem maior perfusão sanguínea no parênquima testicular. Estas características podem estar relacionadas à alteração na homeostase, ou mesmo, seja reflexo do estresse experimentado pelos animais alojados em cela.

Um resultado observado nos animais alojados em baia enriquecida foi o menor lúmen do ducto epididimário quando comparado à cela, o que pode corroborar o fato de ter apresentado menor número de defeitos totais sem a gota protoplasmática distal. Quanto maior o lúmen do ducto epididimário maior é a perda na quantidade de células que compõe o epitélio epididimário, o que poderia afetar assim o desenvolvimento da capacidade de fertilização do espermatozoide, uma vez que o epidídimo é responsável pela criação de um ambiente luminal especializado que conduza o processo de maturação por meio de atividades secretoras e absorptivas pelo epitélio epididimal (ROBAIRE et al., 2006), alterando assim o processo de fagocitose de resquícios de gotas citoplasmáticas e espermatozoides degenerados. Associado a isso, os animais alojados em baias com enriquecimento apresentaram maior epitélio epididimário que os animais que não receberam o enriquecimento ambiental, fato que deve ser considerado para estudos futuros.

Embora não foram encontradas alterações que confirmem as hipóteses iniciais, este estudo foi pioneiro na forma de condução e abriu novas perspectivas para se estudar os efeitos do bem-estar animal sobre as características reprodutivas em cachaços.

6. CONCLUSÃO

O alojamento de cachaços com maior bem-estar, proporcionado pelo alojamento dos animais em baias mais espaçosas e com o acréscimo de enriquecimento ambiental, durante 212 dias:

1. Não melhora a qualidade do sêmen colhido do animal vivo, pois não afeta o volume, a concentração, a motilidade, o vigor e a morfologia dos espermatozoides, após nove semanas do alojamento.
2. Não afeta a biometria testicular e nem epididimária.
3. Não afeta a integridade dos epitélios seminífero e epididimário.
4. Os animais alojados em baias enriquecidas apresentam menor lúmen do epitélio epididimário do que aqueles alojados em celas.
5. Não melhora a qualidade dos espermatozoides da cauda do epidídimo quanto ao volume, a concentração, a motilidade e o vigor, mas o alojamento dos animais em baias enriquecidas reduz o percentual total de defeitos espermáticos quando comparados aos animais alojados em celas.

Contudo, este trabalho trouxe uma contribuição a uma investigação científica histológica de uma fonte de estresse ainda pouco estudada em machos suínos; portanto, são necessários novos estudos para melhor esclarecer os resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

- AISSANO, S.; AYAD, A. Influence of age, body weight and season on testicular and epididymis biometric in Donkeys (*equus asinos*). **International Journal of Morphology**, v. 5, n. 38, p. 1434- 1443, 2020.
- ALM K.; PELTONIEMI O.A.T.; KOSKINEN E.; ANDERSSON M. Porcine Field Fertility with Two Different Insemination Doses and the Effect of Sperm Morphology. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 41, n. 3, 2006.
- ALMEIDA, S.A.; PETENUSCI, S.O.; ANCELMO-FRANCI, J.A.; ROSA-E-SILVA, A.A.M.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Diminuição das funções testiculares espermatogênicas e androgênicas em ratos adultos submetidos ao estresse induzido pela imobilização desde a pré-puberdade. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v. 31, n. 11, p. 1443-1448, 1998.
- ALMEIDA, T. B. Boar welfare influence the quality of the gametes. 2021. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.
- ALVES, M. B.R. Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade. 2014. 166 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2014.
- ARRUDA, R.P; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n. 2, p.145-151, 2011.
- BAPTISTA, R.I.A.A.; BERTANI, G.R.; BARBOSA, C.N. Indicadores do bem-estar em suínos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1-8, 2011.
- BROOM, D. M.; MENDEL, M. T.; ZANELLA, A. J. A comparison of the welfare of sows in different housing conditions. **Animal Science**, v. 61, n. 2, p. 369–385, 1995. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/article/div-class-title-a-comparison-of-the-welfare-of-sows-in-different-housing-conditions-div/FA72AA4582E7FD4E86147341736FBE7F>>.
- BROOM, D.M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v. 142, p.524-526, 1986.
- CARRAZZA, L.G.; CARRAZZA, T.G.; SANTA'ANA, D.S.; OLIVEIRA, M.T.; ALVES, L.R. Qualidade do suínos submetidos ao estresse pelo calor: Revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 23, Ed. 170, Art. 1146, 2011.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R. P. DE; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; SANTOS, F.B.; ALVES, M.B.R.; OLIVEIRA, B.M.M. Impact of semen quality on field fertility in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 40-45, 2017.

CHENOWETH P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 457-468, 2005.

ELOY, A.M.X. Estresse na produção animal. **Embrapa (Comunicado técnico)**. p. 1676-7675, Sobral-CE, Dezembro, 2007.

FILGUEIRA, K.D.; MOURA, C.E.B; BATISTA, J.S.; SILVA, S.M.M.S.; OLIVEIRA, M.F.; ALBUQUERQUE, J.F.G.; MIGLINO, M.A. Biometria e alterações histopatológicas em testículos de catetos (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro no semi-árido nordestino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 19-25, 2005.

FLOWERS, W. L. Factors Affecting the Efficient Production of Boar Sperm. **Reproduction in Domestic Animals Zuchthygiene**, v. 50, p. 25–30, 2015.

FOPPA, L.; CALDARA, F.R.; MACHADO, S.P.; MOURA, R.; SANTOS, R.K.S.; NÄÄS, I. A. E GARCIA, R. G. Environmental enrichment and behaviour of pigs: review. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 8, p. 1-7, 2014.

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.

GAGGINI, T.S.; PASCHOAL, A.F. L.; MELLAGI A. P. G. Métodos de avaliação de reprodutores em centrais de inseminação artificial de suínos: foco no exame clínico. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v. 42, n. 1, p. 22-29, 2018.

GARCIA-GIL, N.; PINART, E.; SANCHO, S.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; KÁDÁR, E.; BRIZ, M.; BONET, S. The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars. **Animal Reproduction Science**, v. 73, n. 3-4, p. 211- 225, 2002.

GUY, J. H. et al. Reducing post-mixing aggression and skin lesions in weaned pigs by application of a synthetic maternal pheromone. **Animal Welfare**, v. 18, n. 3, p. 249–255, 2009.

HAGAN, S.; KHURANA, N.; CHANDRA, S.; ABDEL-MAGEED, A.B.; MONDAL, D.; HELLSTROM, W.J.G.; SIKKA, S.C. Differential expression of novel biomarkers (tlr-2, tlr-4, cox-2, and nrf-2) of inflammation and oxidative stress in semen of leukocytospermia patients. **Andrology**, p. 848–855, 2015.

HODEL, C.; NATHUES, H.; GRAHOFER, A. Effect of housing conditions, management procedures and traits of the external male reproductive tract on the sexual behaviour of natural mating boars. **Theriogenology**, v. 167, p. 44–50, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.003>>.

INDRIASTUTI, R.; ULUM, M. F.; ARIFANTINI, R.I., MEMILI, E.; PURWANTARA B. Relationship among Body Weight, Scrotal Circumference and Sperm Quantity of Bali

Bulls in Baturiti Artificial Insemination Center. **Animal Production International Seminar**, 2020.

KEMPINAS, W. De G.; KLINEFELTER G. R. Interpreting histopathology in the epididymis. **Taylor & Francis**, v. 4, n. 2, 2014.

KIM, B.; PARK, K.; RHEE, K. Heat stress response of male germ cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n.15, p. 2623–2636, 2013.

MCGLONE, J.J. The Future of Pork Production in the World: Towards Sustainable, Welfare-Positive Systems. **Animals (Basel)**, n.3, p. 401–415, 2013.

MESQUITA, A.A.; GALDEANO, J.V.B.; LEÃO, K.M.; MARTINS, P.C.; DA SILVA, F.G.S.; DA SILVA, M.A.P. Influência de diferentes sistemas de alojamento sobre a qualidade do sêmen de varrões. **PUBVET**, v. 5, p. 1-17, 2011.

MORGAN, L.; ITIN-SHWARTZ, B.; KOREN, L.; MEYER, J.S.; MATAS, D.; YOUNIS, A.; NOVAK, S.; WEIZMANN, N.; RAPAIC, O.; AHMAD, W. A., KLEMENT, E.; RAZ, T. Physiological and economic benefits of abandoning invasive surgical procedures and enhancing animal welfare in swine production. **Scientific Reports**, 2019. DOI: 10.1038/S41598-019-52677-6.

MOTA FILHO, A.C.; SILVA, L.D.M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinaria Brasilian**, v. 6, p. 1-8, 2012.

NRC. **National Research Council (NRC)**. [s.l.] National Academy Press, 2012.

O'CONNOR R. E.; KIAZIM L.G.; RATHJE C.C.; JENNINGS R.L.; GRIFFIN D.K. Rapid multi-hybridisation fish screening for balanced porcine reciprocal translocations suggests a much higher abnormality rate than previously appreciated. **MDPI**. v.10, n.2, 2020.

PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, M.A.; CASTELO, T.S.; SILVA, A.M.; BEZERRA, J.A.B.; SOUZA, A.L.P.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 3-4, p. 191-196, 2012.

PERUMAL, P. Scrotal circumference and its relationship with testicular growth, age, and body weight in the *(bos indicus)* bulls. **International Scholarly Research Notices**. V. 2014, 2014.

PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M.D.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; KÁDÁR E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2219-223, 2005.

ROBAIRE, B.H., HINTON, B.T. ORGEBIN-CRIST M-C. The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

SANTOS, R.L.; NASCIMENTO, C.A. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Grupo Gen - Editora Roca Ltda. 2016.

- SCHWARZ, T. et al. Effects of individual versus group housing system during the weaning-to-estrus interval on reproductive performance of sows. **Animal**, v. 15, n. 2, 2021.
- SMITH, A.C.; SWINDLE, M.M. Preparation of swine for the laboratory. **ILAR JOURNAL**, V. 47, N. 4, P. 358–363, 2006.
- TELES, M. C. et al. Effects of coffee husk as floor covering on the behavior of boars. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 12, p. 883–889, 2017.
- WEBSTER, A.J.F. Farm Animal Welfare: the Five Freedoms and the Free Market. *The Veterinary Journal*, v. 161, n. 3, p. 229-237, 2001.
- WEERD H. A. Van de, EL DIA J. A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. **Applied Animal Behaviour Science**, p. 1-20, 2009.
- WETTEMANN, R.P.; WELLS, M.E.; OMTVEDT, I.T.; POPE, C.E.; TURMAN, E.J. Influence of elevated ambient temperature on reproductive performance of boars. **Journal of Animal Science**, v. 42, p. 664–669, 1976.
- ZANELLA, A. Brain opioid receptors in relation to stereotypies, inactivity, and housing in sows. **Physiology & Behavior**, v. 59, n. 4–5, p. 769–775, maio 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031938495021183>>.