

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 30/09/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

BIÓPSIAS TESTICULARES EM SÉRIE FREQUENTES COM AGULHA TRU-CUT
PERMITEM AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL SEM EFEITOS
ADVERSOS EM CARNEIROS.

ANTÔNIO GUILHERME RONCADA PUPULIM

Botucatu - SP

Setembro 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

BIÓPSIAS TESTICULARES EM SÉRIE FREQUENTES COM AGULHA TRU-CUT
PERMITEM AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL SEM EFEITOS
ADVERSOS EM CARNEIROS

ANTÔNIO GUILHERME RONCADA PUPULIM

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal, como pré-requisito para obtenção do título de doutor - Área de concentração de Reprodução Animal.

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Co-Orientador: John Patrick Kastelic

Botucatu - SP

Setembro 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pupulim, Antonio Guilherme Roncada.

Biópsias testiculares em série frequentes com agulha Tru-Cut permitem avaliação do perfil transcricional sem efeitos adversos em carneiros / Antonio Guilherme Roncada Pupulim. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Coorientador: John Patrick Kastelic

Capes: 50504037

1. Carneiros. 2. Expressão gênica. 3. Ultrassonografia veterinária. 4. Andrologia. 5. Gônadas. 6. Biópsia.

Palavras-chave: Andrologia; Desenvolvimento; Expressão gênica; Gônadas; Ultrassonografia.

Antônio Guilherme Roncada Pupulim

Data da defesa: 30/09/2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ- UNESP-Botucatu

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Membro titular

Departamento de Clínicas Veterinárias

UEL – Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Camila de Paula Freitas Dell’Aqua

Membro titular

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal

FMVZ-UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro Titular

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ- UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro

Membro Titular

Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte

IZ - Fazenda Experimental de Sertãozinho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais. Exemplo de bondade, família e apoio. Aos quais passaram os princípios e valores que regem a convivência entre as pessoas: verdade, vontade, justiça, amizade e vínculo.

A utopia está no horizonte. Aproximo me dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte se distancia dez passos mais além. Para que serve a utopia? Para isso; para caminhar.

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

Ao dom da vida concedida a mim.

A minha família mãe Soninha, irmã Dany, sobrinhos João, Lucas e Joaquim, cunhado Dinei, tios, tias, primos e Vó Geralda. A paciência prestada nos momentos de negação e ausência, reflete o carinho e amor desprendidos a mim. É reconhecido, admirado e recíproco.

Ao meu pai Antônio Roberto Pupulim, meus dois avôs Antônio Pupulim e Olgo Roncada, e minha vó Luiza Biasoli Roncada. A saudade é sempre substituída pela doce lembrança de todos os momentos compartilhados. Muito agradecido por dividir suas experiências de vidas para com a minha. Ao meu pai por ser meu exemplo de pessoa, amigo, trabalhador, honesto, agregador e familiar. Todo o seu amor desprendido a mim, é lembrado em todos os desafios.

Aos mestres que fizeram parte de todas as etapas da minha formação, em especial João Carlos Pinheiro Ferreira e John Patrick Kastelic, fundamentais e importantes para execução e superação dos projetos aos quais tive a honra de participar. Ao professor João Carlos, não somente como professor e orientador, em que as palavras são dispensadas tamanha didática, excelência, animação e fonte de inspiração. Sou muito grato por todas as conversas e ensinamentos, cresci muito.

Aos meus amigos de Botucatu e Maringá. Por graça, são muitos e não citarei todos, porém em especial ao Henry David, Gabriella Ribeiro, Jaqueline Carvalho, Renan Denadai, Paula Rattes e Julia (Vizinha). Colegas de trabalho que se tornaram amigos com discussões sérias, inúteis e agradáveis, como há em uma boa amizade. Aos amigos e colegas de trabalho de Maringá da família Francatto e família Rodrigues Ferreira, sempre presentes e importantes. Aos amigos de longa data, desde o mestrado, Ronaldo Ereno, Eduardo Razza e Marcelo Piagentini, bem como ao casal de amigos Isabele e Josmar Mazuchelli, amigos que foram essenciais para minha formação como pessoa e pesquisador, fazem parte da minha IC, Mestrado e Doutorado. A minha namorada Vanessa Barci, obrigado por todo carinho, amizade e momentos compartilhado, você torna a vida mais tranquila.

A todos os funcionários do Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal e da equipe de limpeza, em especial a professora Fabiana, Edilson, Edvaldo, Evandro e Felipe, sempre dispostos a auxiliar e a uma boa conversa.

Aos animais que foram a fonte de minha indagação e conhecimento. Meu profundo respeito e agradecimento. As fazendas da Unesp Edgárdia e São Manuel, AmeFarms (Mandaguaçu) e Capuava (Amaporã), por permitirem a realização de estudos e pesquisas. Vocês foram importantes para minha formação.

A FAPESP (2020/15556-8) e CNPQ (2021/3845-4). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

À faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu. Existe uma energia retumbante em meu peito por ser formado aqui.

SUMÁRIO	
RESUMO	8
ABSTRACT	9
CAPÍTULO 1	10
2. Objetivos	12
2.1 Geral	12
2.2 Específico	12
3. Hipótese	12
4 Revisão de literatura	13
4.1 Desenvolvimento e Anatomia testicular	13
4.2 Histologia testicular	17
4.3 Avaliação andrológica	19
4.4 Mediadores inflamatórios e função testicular	23
5 Considerações finais	24
4 Referências	26
CAPÍTULO 2	39

Pupulim, A.G.P. **BIÓPSIAS TESTICULARES EM SÉRIE FREQUENTES COM AGULHA TRU-CUT PERMITEM AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL SEM EFEITOS ADVERSOS EM CARNEIROS.** Botucatu 2022. XXp. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os testículos são os órgãos responsáveis pela produção e secreção de esteroides sexuais masculinos e espermatozoides. As gônadas, localizadas na bolsa escrotal, são ligadas ao corpo pelo funículo espermático. Os mecanismos de termorregulação, são controlados pelo sistema nervoso autônomo, que atua sobre as glândulas sudoríparas e túnica dartos na bolsa escrotal, cone vascular e músculo cremaster. Internamente à bolsa escrotal, encontra-se a túnica vaginal parietal, que reveste o escroto, e a visceral, revestindo os testículos e epidídimos. Envolvendo completamente os testículos, a túnica albugínea invade o parênquima gonadal e o divide em lóbulos, onde encontramos os túbulos seminíferos, local de produção dos espermatozoides, que são conduzidos e armazenados no epidídimo, sofrendo o processo de maturação. Na maturidade sexual, os túbulos seminíferos correspondem a 84% do peso testicular, sendo esse representado pela circunferência escrotal, critério utilizado para a seleção de reprodutores. Nos carneiros, a espermatogênese, evento cíclico que culmina na formação dos espermatozoides, dura aproximadamente 47 dias. Histologicamente, os túbulos seminíferos são divididos em compartimento tubular, composto pelas células germinativas e as de Sertoli, além do compartimento intersticial, onde são encontradas as células de Leydig, produtoras de testosterona. A avaliação andrológica afere o potencial reprodutivo masculino e avalia a condição física, qualidade espermática, libido e as características morfológicas do sistema reprodutor. Por permitir a análise ultrassonográfica da histomorfologia testicular, a ultrassonografia tem sido usada como ferramenta complementar ao exame andrológico. O uso da biópsia testicular fornece informações as quais auxilia no prognóstico das funções reprodutivas. Entretanto, são poucos os estudos que detalharam os procedimentos pré- e pós-biópsia voltados a garantir a integridade funcional testicular. Além disso, não há relatos da realização de biópsias sequenciais em pequeno intervalo de tempo. O objetivo deste trabalho foi apresentar as alterações testiculares ao longo do desenvolvimento, principais métodos de avaliação andrológica e testicular, bem como avaliar os efeitos de biópsias sequenciais na qualidade espermática, ultrassonografia e análise dos transcritos. Foram realizadas biopsias testiculares com agulha 16 G Tru-cut em seis carneiros Santa Ines x Dorper, nos momentos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 h. Antes do primeiro procedimento os carneiros receberam uma aplicação de benzilpenicilina benzatina (30,000 IU/kg IM) e flunixin meglumine (1.1 mg/kg, uma aplicação ao dia por 3 d). Antes de cada biópsia, realizava aplicação de botão anestésico com 1 ml de lidocaína 2% e antisepsia da pele da bolsa escrotal. Imediatamente após cada biópsia, foi aplicado pressão digital (> 5 min) seguido de compressa de gelo (10 min). As amostras testiculares foram analisadas pelo RT-q PCR para quantificação de transcritos envolvidos na inflamação aguda (*TNF α* , *IL-1*), estresse oxidativo (*GPX1*, *SOD2*, *HSP70*) e esteroidogênese (*STAR*). A coleta de sêmen foi realizada 3 dias antes e 28 dias após a primeira biópsia. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas 5 dias após a primeira biópsia e a cada 4 dias até completar 21 dias. Não houve diferença ($P > 0,05$) nas características do perfil transcricional, seminais e ultrassonográficas. Além disso, não foram encontrados sinais de dor, aumento da temperatura, inchaço ou sangramento até 28 dias. Portanto, biopsias testiculares não causaram alterações inflamatórias macroscópicas na bolsa escrotal e testículos, não afetaram as características seminais e ultrassonográficas do parênquima testicular e não alteram o perfil testicular transcricional de genes envolvidos na inflamação, estresse oxidativo e esteroidogênese.

Palavras chaves: Desenvolvimento, gônadas, andrologia, ultrassonografia, expressão gênica.

Pupulim, A.G.P. **SERIAL FREQUENT TRU-CUT TESTICULAR BIOPSIES IN RAMS ENABLE ASSESSMENT OF TRANSCRIPTIONAL PROFILE WITHOUT ADVERSE EFFECTS.** Botucatu 2022. XXp. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The testes are responsible for the production and secretion of male sex steroids and sperm. The gonads, located in the scrotum, are connected to the body by the spermatic cord. The autonomic nervous system controls the thermoregulation mechanisms, which act on the sweat glands and dartos tunic in the scrotum, vascular cone, and cremaster muscle in the spermatic cord. Internally to the scrotum is the parietal vaginalis tunic, which covers the scrotum, and the visceral vaginal tunic, which covers the testes and epididymis. Completely enveloping the testes, the tunica albuginea invades the gonadal parenchyma and divides it into lobules, where we find the seminiferous tubules, site of sperm production, which are carried and stored in the epididymis, undergoing the maturation process. In an adult ram, the seminiferous tubules correspond to 84% of the testicular weight and the spermatogenesis lasts approximately 47 days. Histologically, the seminiferous tubules are divided into a tubular compartment, composed of the germ and Sertoli cells, and an interstitial compartment, where the Leydig cells, which produce testosterone, are found. Andrological evaluations are performed to determine the male reproductive potential. They consist of a general physical examination and assessment of sperm quality, libido, and morphological characteristics of the reproductive system. This evaluation can be complemented by the ultrasound analysis of testicular parenchyma and testicular biopsies. Despite their use, there are few studies detailing the safety strategies pre and post biopsies and the effects of sequential testicular biopsies performed in a short time interval. This study aimed to review the main testicular developmental changes and methods of assessment of testicular function and the effects of sequential biopsies on sperm quality and testicular ultrasound appearance, and testicular transcripts. Testicular biopsies were performed with a 16 G Tru-cut needle in six Santa Ines x Dorper rams at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h. Before the first procedure, rams received benzathine benzylpenicillin (30,000 IU/kg IM) and flunixin meglumine (1.1 mg/kg, daily for 3 d). Before each biopsy, antisepsis of the skin of the scrotum was performed and an anesthetic button was applied with 1 ml of 2% lidocaine. Immediately after each biopsy, digital pressure was applied (> 5 min), followed by an ice pack (10 min). Testicular tissues samples were analyzed by RT-q PCR to quantify transcripts related to acute inflammation (TNF α , IL-1), oxidative stress (GPX1, SOD2, HSP70), and steroidogenesis (STAR). Semen collection was performed 3 days before and 28 days after the first biopsy. Ultrasound evaluations were performed 5 days after the first biopsy and then every 4 days until 21 days. There was no difference ($P > 0.05$) in transcriptional, seminal and ultrasonographic profile characteristics. In addition, no signs of pain, increased temperature, swelling or bleeding were found for up to 28 days. Therefore, sequential testicular biopsies did not cause macroscopic inflammatory changes in the scrotum and testes, no affected seminal and ultrasound characteristics and not altered the testicular transcriptional profile of genes involved in inflammation, oxidative stress, and steroidogenesis.

Keywords: Development, gonads, andrology, ultrasound, gene expression

CAPÍTULO 1

1. Introdução

Os testículos, órgãos pares com função endócrina e exócrina, são responsáveis pela produção e secreção dos esteroides sexuais e pela produção dos espermatozoides (1). Diversas alterações congênitas, processos infecciosos, estresse térmico e traumas, afetam a saúde e o desenvolvimento testicular (2). Alterações como orquite, degeneração e hipoplasia testicular, hidrocele, hematocele e epididimite são comumente identificadas em exames do aparelho reprodutor (3,4)

A avaliação andrológica envolve os exames físico geral e específico do aparelho reprodutor, e as avaliações da qualidade espermática e da libido. Em conjunto, esses exames permitem identificar o potencial reprodutivo masculino e investigar possíveis causas de alterações patológicas (5). A ultrassonografia e as biópsias testiculares são empregadas como exames auxiliares (6–8).

A ultrassonografia é um método seguro e não invasivo para avaliar o parênquima testicular, possibilitando a identificação das alterações gonadais (9). Análises computacionais das imagens ultrassonográficas podem auxiliar nos diagnósticos clínicos (10). A determinação dos valores numéricos de pixels e o desvio padrão de pixels, permitem a caracterização da aparência ultrassonográfica do tecido avaliado (4,10). Avaliações ultrassonográficas vêm sendo estudadas como possíveis indicadores da área seminífera testicular (11,12) desenvolvimento sexual (6,13) e qualidade seminal (14).

Por permitir a obtenção de amostras de tecido testicular para a avaliação microscópica (15) e a classificação histológica do parênquima testicular (16), a biópsia é uma importante ferramenta na determinação da severidade, etiologia e prognóstico das funções reprodutivas em homens (17). Em carneiro pré-púberes a utilização dessa técnica não comprometeu o desenvolvimento testicular e corporal (6), bem como o perfil endócrino (7). Embora a técnica de biópsia testicular seja simples e com inúmeras aplicações, os relatos da ocorrência de fibrose (18), reações auto imunes anti-esperma (19) e o risco de deficiência de androgênio (20), colocam em dúvida sua aplicação (6). No entanto, poucos estudos descrevem as metodologias utilizadas antes e após o procedimento de biópsia, a fim de garantir a integridade funcional da gônada. Ademais, não há estudos que descrevam a realização de biópsias sequenciais em intervalo de

poucas horas e suas consequências no padrão molecular, histológico, ultrassonográfico e nos parâmetros seminais.

Além das infecções e inflamações do aparelho reprodutivo masculino terem efeito direto na reprodução, o comprometimento sistêmico também pode afetar os tecidos reprodutivos (21). A apoptose, lesões vasculares, fibrose e remodelação tecidual são os principais resultados de uma inflamação local, as quais são manifestadas com a redução da produção de andrógenos, baixa contagem de espermatozoides, perda temporária da fertilidade, além de desconforto e dor (22). Os mediadores inflamatórios têm importante papel na gravidade e evolução dos processos reparativos teciduais. Contudo, muitos destes também estão envolvidos em diversas etapas da espermatogênese (23,24), bem como na modulação local das respostas ao FSH (23,25,26) e produção de andrógenos (27–29). Embora a compreensão destas funções ainda seja incompleta, o estudos dos mediadores inflamatórios pode vir a fornecer importantes dados para se explicar as relações infecção/inflamação e a disfunção testicular (30).

4 Referências

1. Senger PL. Pathways to pregnancy and parurition. 2003. p. 214–39.
2. Barth A, Kastelic JP. Testicular degeneration. In: Bovine reproduction [Internet]. Wiley; 2021. p. 144–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119602484.ch13>
3. Gnemmi G, Lefebvre RC. Ultrasound imaging of the bull reproductive tract: An important field of expertise for veterinarians. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 2009;25(3):767–79.
4. Kastelic JP, Brito LFC. Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reprod Domest Anim.* 2012;47(SUPPL.3):45–51.
5. Kastelic JP, Thundathil JC. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim.* 2008;43(SUPPL.2):368–73.
6. Giffin JL, Bartlewski PM, Hahnel AC. Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes. *Exp Biol Med.* 2014;239(12):1606–18.
7. Bartlewski PM, Giffin JL, Oluwole OA, Hahnel AC. Prospective ultrasonographic and endocrine predictors of spermatogenic onset in ram lambs. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2017;179:44–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.015>
8. Sartori R, Prestes NC, Canavessi AMO, Curi PR, Bergfelt DR. Testicular biopsy with Tru-Cut needle in conjunction with fibrin adhesive or nylon suture: Assessment of post-biopsy testicular function in rams. *Small Rumin Res.* 2002;45(1):25–31.
9. Coulter GH, Senger PL, Bailey DRC. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. *J Reprod Fertil.* 1988;84(2):417–23.
10. Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality,

sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls.

Theriogenology [Internet]. 2012;78(1):69–76. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.022>

11. Chandolia RK, Bartlewski PM, Omeke BC, Beard AP, Rawlings NC, Pierson RA. Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: Effects of a GnRH agonist. *Theriogenology* [Internet]. 1997 Jul;48(1):99–117. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X97001945>
12. Giffin JL, Franks SE, Rodriguez-Sosa JR, Hahnel A, Bartlewski PM. A study of morphological and haemodynamic determinants of testicular echotexture characteristics in the ram. *Exp Biol Med*. 2009;234(7):794–801.
13. Evans ACO, Pierson RA, Garcia A, McDougall LM, Hrudka F, Rawlings NC. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology*. 1996;46(2):345–57.
14. Arteaga AA, Barth AD, Brito LFC. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology*. 2005;64(2):408–15.
15. Belker AM, Sherins RJ, Dennison-Lagos L. Simple, rapid staining method for immediate intraoperative examination of testicular biopsies. *J Androl*. 1996;17(4):420–6.
16. Dohle GR, Elzanaty S, Van Casteren NJ. Testicular biopsy: Clinical practice and interpretation. *Asian J Androl*. 2012;14(1):88–93.
17. Larsen RE. Testicular biopsy in the dog. *Vet Clin North Am* [Internet]. 1977;7(4):747–55. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-0279\(77\)50087-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-0279(77)50087-1)
18. Amin A, Gad A, Salilew-Wondim D, Prastowo S, Held E, Hoelker M, et al. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. *Mol Reprod*

Dev. 2014;81(6):497–513.

19. Harrington TG, Schauer D, Gilbert BR. Percutaneous testis biopsy: an alternative to open testicular biopsy in the evaluation of the subfertile man. *J Urol* [Internet]. 1996 Nov;156(5):1647–51. Available from: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2801%2965473-9>
20. Manning M, Jünemann KP, Alken P. Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Lancet*. 1998;352(9121):37.
21. Baker HWG. Reproductive effects of nontesticular illness. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998;27(4):831–50.
22. Nariculam J, Minhas S, Adeniyi A, Ralph DJ, Freeman A. A review of the efficacy of surgical treatment for and pathological changes in patients with chronic scrotal pain. *BJU Int* [Internet]. 2007 May;99(5):1091–3. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2006.06733.x>
23. Kazutaka S, Winnall WR, Muir JA, Hedger MP. Regulation of Sertoli cell activin A and inhibin B by tumour necrosis factor α and interleukin 1 α : Interaction with follicle-stimulating hormone/adenosine 3',5'-cyclic phosphate signalling. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2011;335(2):195–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.01.014>
24. Hakovirta H, Syed V, Jégou B, Parvinen M. Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 1995 Feb;108(1–2):193–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030372079503475M>
25. Khan SA, Nieschlag E. Interleukin-1 inhibits follitropin-induced aromatase activity in immature rat Sertoli cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;75(1):1–7.
26. Huleihel M, Zeyse D, Huleihel M, Zeyse D, Lunenfeld E, Zeyse M, et al. Induction of transferrin secretion in murine sertoli cells by FSH and IL-1: The

- possibility of different mechanism(s) of regulation. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(2):112–7.
27. Delfino FJ, Boustead JN, Fix C, Walker WH. NF- κ B and TNF- α stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;201(1–2):1–12.
 28. Wang X, Dyson MT, Jo Y, Stocco DM. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory gene expression in MA-10 mouse Leydig cells. *Endocrinology.* 2003;144(8):3368–75.
 29. Wang XJ, Shen CL, Dyson MT, Eimerl S, Orly J, Hutson JC, et al. Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in testosterone biosynthesis. *Endocrinology.* 2005;146(10):4202–8.
 30. Hedger MP. Toll-like receptors and signalling in spermatogenesis and testicular responses to inflammation-a perspective. *J Reprod Immunol.* 2011;88(2):130–41.
 31. König HE, Liebich H-G. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. *Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido.* 2016. 824 p.
 32. O'Shaughnessy PJ, Fowler PA. Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction.* 2011;141(1):37–46.
 33. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 2007;87(1):1–28.
 34. Skinner JD, Booth WD, Rowson LE, Karg H. The post-natal development of the reproductive tract of the Suffolk ram, and changes in the gonadotrophin content of the pituitary. *J Reprod Fertil.* 1968;16(3):463–77.
 35. Mcgeady TA. *Veterinary Embriology.* 2017. 251–273 p.
 36. Rey RA, Musse M, Venara M, Chemes HE. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: Its relevance on sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech.* 2009;72(11):787–95.
 37. Hochereau-de-Reviers MT, Perreau C, Pisselet C, Locatelli A, Bosc M.

- Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. *J Reprod Fertil.* 1995;103(1):41–6.
38. Kotsampasi B, Balaskas C, Papadomichelakis G, Chadio SE. Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim Reprod Sci.* 2009;114(1–3):135–47.
 39. Kastelic JP. Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology.* 2014;81(1):18–23.
 40. Kastelic JP. Thermoregulation of the Testes. *Bov Reprod.* 2014;26–9.
 41. Rizzoto G, Hall C, Tyberg J V., Thundathil JC, Caulkett NA, Kastelic JP. Testicular hyperthermia increases blood flow that maintains aerobic metabolism in rams. *Reprod Fertil Dev.* 2019;31(4):683–8.
 42. Moule GR, Waites GM. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. *J Reprod Fertil.* 1963;5:433–46.
 43. Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Anim Reprod Sci.* 1997;45(4):255–61.
 44. Noordhuizen-Stassen EN, Charbon GA, de Jong FH, Wensing CJG. Functional arterio-venous anastomoses between the testicular artery and the pampiniform plexus in the spermatic cord of rams. *Reproduction* [Internet]. 1985 Sep 1;75(1):193–201. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/doi/10.1530/jrf.0.0750193>
 45. Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, de Kretser DM. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. *Knobil Neill's Physiol Reprod.* 2006;(7):827–947.
 46. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003;125(6):769–84.
 47. Bagu ET, Cook S, Gratton CL, Rawlings NC. Postnatal changes in testicular

- gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. *Reproduction*. 2006;132(3):403–11.
48. Herrera-Alarcón J, Villagómez-Amezcu E, González-Padilla E, Jiménez-Severiano H. Stereological study of postnatal testicular development in Blackbelly sheep. *Theriogenology*. 2007;68(4):582–91.
 49. Yarney TA, Sanford LM. Pubertal development of ram lambs: Reproductive hormone concentrations as indices of postpubertal reproductive function. *Can J Anim Sci [Internet]*. 1990 Mar 1;70(1):149–57. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.4141/cjas90-017>
 50. Oluwole OA, Bartlewski PM, Hahnel A. Relationships of serum thyroid hormones and follicle-stimulating hormone concentrations to Sertoli cell differentiation during the first wave of spermatogenesis in euthyroid ram lambs. *Reprod Biol [Internet]*. 2013;13(2):150–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2013.04.001>
 51. Monet Kuntz C, Hochereau de Reviers MT, Terqui M. Variations in testicular androgen receptors and histology of the lamb testis from birth to puberty. *J Reprod Fertil*. 1984;70(1):203–10.
 52. Steger K, Wrobel KH. Postnatal development of ovine seminiferous tubules: An electron microscopical and morphometric study. *Ann Anat [Internet]*. 1996;178(3):201–13. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0940-9602\(96\)80048-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0940-9602(96)80048-3)
 53. Pelletier RM, Byers SW. The bloodtestis barrier and sertoli cell junctions: Structural considerations. *Microsc Res Tech*. 1992;20(1):3–33.
 54. Alves MG, Rato L, Carvalho RA, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(5):777–93.
 55. Ribeiro M da S, Quirino CR, Junior AB, Pacheco A. Biometry and ultrasound evaluation of testicles and accessory glands in Santa Ines rams. *Rev Bras Zootec*.

2017;46(4):317–23.

56. Emsen E. Testicular development and body weight gain from birth to 1 year of age of Awassi and Redkaraman sheep and their reciprocal crosses. *Small Rumin Res.* 2005;59(1):79–82.
57. Wrobel KH, Reichold J, Schimmel M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. *Ann Anat.* 1995;177(1):19–32.
58. Louvandini H, McManus C, Martins RD, Lucci CM, Corrêa PS. Características biométricas testiculares em carneiros Santa Inês submetidos a diferentes regimes de suplementação protéica e tratamentos anti-helmínticos. *Ciência Anim Bras.* 2008;9:638–47.
59. Azevedo CE, Souza. Avaliação de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida. Universidade Federal do Ceará; 2003.
60. Unanian MM, Silva AEDF, McManus C, Cardoso EP. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça nelore. *Rev Bras Zootec.* 2000;29(1):136–44.
61. Bailey T, Hudson R, Powe T, Riddell M, Wolfe D, Carson R. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. *Theriogenology* [Internet]. 1998 Feb;49(3):581–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X98000090>
62. Andrade A, Soares A, Freitas F, Silva S, Peña-Alfaro C, Batista A, et al. Testicular and epididymal ultrasonography in Santa Inês lambs raised in Brazil. *Anim Reprod.* 2014;11(2):110–8.
63. Pacheco A, Quirino CR, Oliveira ADFM. Avaliação do comportamento sexual de ovinos jovens da raça Santa Inês , com e sem experiência prévia com fêmeas. *Arch Latinoam Prod Anim.* 2008;17(1):15–24.
64. Cardoso FM, Queiroz GF. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. *Anim Reprod Sci.*

1988;17(1–2):77–84.

65. Kolasa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M, Wiszniewska B. The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reprod Biol* [Internet]. 2012 Mar;12(1):5–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1642431X12600746>
66. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3º edição. Belo Horizonte; 2013. 104 p.
67. Sluka P, O'Donnell L, Bartles JR, Stanton PG. FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo. *J Endocrinol*. 2006;189(2):381–95.
68. Bielli A, Katz H, Pedrana G, Gastel MT, Moraña A, Castrillejo A, et al. Nutritional management during fetal and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale ram lambs. *Small Rumin Res*. 2001;40(1):63–71.
69. Wayne Vogl A, Vaid KS, Guttman JA. The Sertoli cell cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol*. 2008;636:186–211.
70. Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*. 1973;9(5):500–32.
71. DAWSON RM. The labelling of ram semen in vivo with radioactive phosphate and. *Biochem J*. 1958;68(3):512–9.
72. Carvalho Júnior CA, Moustacas VS, Xavier MN, Costa EA, Costa LF, Silva TMA, et al. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rumin Res* [Internet]. 2012;102(2–3):213–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.08.004>
73. Puggioni G, Pintus D, Melzi E, Meloni G, Rocchigiani AM, Maestrone C, et al.

- Testicular Degeneration and Infertility following Arbovirus Infection. *J Virol.* 2018;92(19).
74. Laufs S, Schumacher J, Allgayer H. Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle.* 2006;5(16):1760–71.
 75. Kanter M, Aktas C, Erboga M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: An immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicol Ind Health [Internet].* 2011;29(2):99–113. Available from: <https://doi.org/10.1177/0748233711425082>
 76. Belkadi S, Safsaf B, Heleili N, Tlidi M, Belkacem L, Oucheriah Y. Seasonal influence on sperm parameters, scrotal measurements, and serum testosterone in Ouled Djellal breed rams in Algeria. *Vet World.* 2017;10(12):1486–92.
 77. Camela ESC, Nociti RP, Santos VJC, Macente BI, Murawski M, Vicente WRR, et al. Changes in testicular size, echotexture, and arterial blood flow associated with the attainment of puberty in Dorper rams raised in a subtropical climate. *Reprod Domest Anim.* 2019;54(2):131–7.
 78. Ülker H, Kanter M, Gökdağ Ö, Aygün T, Karakuş F, Sakarya ME, et al. Testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in ram lambs immunized against recombinant LHRH fusion proteins. *Anim Reprod Sci.* 2005;86(3–4):205–19.
 79. Gouletsou PG, Amiridis GS, Cripps PJ, Lainas T, Deligiannis K, Saratsis P, et al. Ultrasonographic appearance of clinically healthy testicles and epididymides of rams. *Theriogenology.* 2003;59(9):1959–72.
 80. Barth AD, Alisio L, Avilés M, Arteaga AA, Campbell JR, Hendrick SH. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. *Anim Reprod Sci.* 2008;106(3–4):274–88.
 81. JUCÁ, A.F.; ANDRADE MOURA, J.C.; GUSMÃO AL et al A. Avaliação

ultrassonográfica dos testículos e das glândulas sexuais anexas de carneiros santa inês ultrasonographic evaluation of testicles and annexes sex glands of Santa Ines rams. *Ciência Anim Bras.* 2009;10(2):650–9.

82. Ahmadi B, Mirshahi A, Giffin J, Oliveira MEF, Gao L, Hahnel A, et al. Preliminary assessment of the quantitative relationships between testicular tissue composition and ultrasonographic image attributes in the ram. *Vet J* [Internet]. 2013;198(1):282–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.06.001>
83. Ahmadi B, Lau CPS, Giffin J, Santos N, Hahnel A, Raeside J, et al. Suitability of epididymal and testicular ultrasonography and computerized image analysis for assessment of current and future semen quality in the ram. *Exp Biol Med.* 2012;237(2):186–93.
84. Kastelic JP, Cook RB, Pierson RA, Coulter GH. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. *Can J Vet Res.* 2001;65(2):111–5.
85. Kahwage PR, Esteves SN, Jacinto MAC, Barioni Junior W, Machado R, Romanello N, et al. Assessment of body and scrotal thermoregulation and semen quality of hair sheep rams throughout the year in a tropical environment. *Small Rumin Res* [Internet]. 2018;160(October 2016):72–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.01.015>
86. Sidibé M, Franco LA, Fredriksson G, Madej A, Malmgren L. Effects on Testosterone, LH and Cortisol Concentrations, and on Testicular Ultrasonographic Appearance of Induced Testicular Degeneration in Bulls. *Acta Vet Scand.* 1992;33(3):191–6.
87. Ahmad N, Noakes DE. Ultrasound imaging in determining the presence of testicular degeneration in two male goats. *Br Vet J.* 1995;151(1):101–10.
88. Li Z, Tian J, Cui G, Wang M, Yu D. Effects of local testicular heat treatment on Leydig cell hyperplasia and testosterone biosynthesis in rat testes. *Reprod Fertil Dev.* 2016;28(9):1424–32.

89. Rizzoto G, Ferreira JCP, Codognoto VM, Oliveira KC, Mogollón García HD, Pupulim AGR, et al. Testicular hyperthermia reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls. *Theriogenology*. 2020;152.
90. Li Y, Zhou Q, Hively R, Yang L, Small C, Griswold MD. Differential gene expression in the testes of different murine strains under normal and hyperthermic conditions. *J Androl*. 2009;30(3):325–37.
91. Rizzoto G, Ferreira JCP, Codognoto VM, Oliveira KC, Mogollón García HD, Pupulim AGR, et al. Testicular hyperthermia reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls. *Theriogenology* [Internet]. 2020;152:64–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.029>
92. Meyers-Wallen VN. Clinical approach to infertile male dogs with sperm in the ejaculate. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* [Internet]. 1991;21(3):609–33. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50063-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50063-2)
93. Tuuri T, Moilanen J, Kaukoranta S, Makinen S, Kotola S, Hovatta O. Testicular biopsy gun needle biopsy in collecting spermatozoa for intracytoplasmic injection, cryopreservation and histology. *Hum Reprod*. 1999;14(5):1274–8.
94. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol*. 2005;48(5):703–11.
95. Carpi A, Menchini Fabris FG, Palego P, Di Coscio G, Romani R, Nardini V, et al. Fine-needle and large-needle percutaneous aspiration biopsy of testicles in men with nonobstructive azoospermia: Safety and diagnostic performance. *Fertil Steril*. 2005;83(4):1029–33.
96. Faure A, Bouty A, O'Brien M, Thorup J, Hutson J, Heloury Y. Testicular biopsy in prepubertal boys: A worthwhile minor surgical procedure? *Nat Rev Urol* [Internet]. 2016;13(3):141–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2015.312>
97. Elzanaty S. Varicocele repair in non-obstructive azoospermic men: Diagnostic

- value of testicular biopsy-A meta-analysis. *Scand J Urol*. 2014;48(6):494–8.
98. Ramanathan S, Dogra V. Current status of percutaneous testicular biopsy for focal lesions. *Abdom Radiol [Internet]*. 2018;43(11):3125–31. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00261-018-1560-x>
 99. Welsh M, Sharpe RM, Moffat L, Atanassova N, Saunders PTK, Kilter S, et al. Androgen action via testicular arteriole smooth muscle cells is important for leydig cell function, vasomotion and testicular fluid dynamics. *PLoS One*. 2010;5(10).
 100. Lewin A, Reubinoff B, Porat-Katz A, Weiss D, Eisenberg V, Arbel R, et al. Testicular fine needle aspiration: The alternative method for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1999;14(7):1785–90.
 101. Giffin JL. Determinants of Testicular Echotexture in the Sexually Immature Ram Lamb by. 2014;
 102. Heath AM, Pugh DG, Sartin EA, Navarre B, Purohit RC. Evaluation of the safety and efficacy of testicular biopsies in llamas. *Theriogenology*. 2002;58(6):1125–30.
 103. Lunstra DD, Echternkamp SE. Repetitive testicular biopsy in the ram during pubertal development. *Theriogenology*. 1988;29(4):803–10.
 104. Fedder J, Marcussen N, Fedder MDK, Engvad B. Testicular Damage following Testicular Sperm Retrieval: A Ram Model Study. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
 105. O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, De Kretser DM, Hedger MP. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology*. 2000;141(1):238–46.
 106. Hedger MP. The Immunophysiology of Male Reproduction. Vol. 1, Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set. 2015. 805–892 p.
 107. O'Bryan MK, Hedger MP. Inflammatory networks in the control of spermatogenesis: Chronic inflammation in an immunologically privileged tissue?

- Adv Exp Med Biol. 2008;636:92–114.
108. Riccioli A, Starace D, Galli R, Fuso A, Scarpa S, Palombi F, et al. Sertoli Cells Initiate Testicular Innate Immune Responses through TLR Activation. *J Immunol*. 2006;177(10):7122–30.
 109. Hertzog PJ, O'Neill LA, Hamilton JA. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol* [Internet]. 2003 Oct;24(10):534–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490603002680>
 110. Nehar D, Mauduit C, Boussouar F, Benahmed M. Tumor necrosis factor- α -stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. *Endocrinology*. 1997;138(5):1964–71.
 111. Nehar D, Mauduit C, Boussouar F, Benahmed M. Interleukin 1 α stimulates lactate dehydrogenase A expression and lactate production in cultured porcine sertoli cells. *Biol Reprod*. 1998;59(6):1425–32.
 112. Hoebe E, Wuyts A, Proost P, Van Damme J, Verhoeven G. Identification of IL-6 as one of the important cytokines responsible for the ability of mononuclear cells to stimulate Sertoli cell functions. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;132(1–2):149–60.
 113. Hakovirta H, Kaipia A, Söder O, Parvinen M. Effects of activin-A, inhibin-A, and transforming growth factor-beta 1 on stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis during rat seminiferous epithelial cycle. *Endocrinology* [Internet]. 1993 Oct;133(4):1664–8. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.133.4.8404607>
 114. Syed V, Stephan JP, Gerard N, Legrand A, Parvinen M, Bardin CW, et al. Residual bodies activate sertoli cell interleukin-1 α (il-1 α) release, which triggers il-6 production by an autocrine mechanism, through the lipoxigenase pathway. *Endocrinology*. 1995;136(7):3070–8.
 115. Siu MKY, Lee WM, Cheng CY. The interplay of collagen IV, tumor necrosis

- factor- α , gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology*. 2003;144(1):371–87.
116. Li MWM, Xia W, Mruk DD, Wang CQF, Yan HHN, Siu MKY, et al. Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J Endocrinol*. 2006;190(2):313–29.
 117. Sarkar O, Mathur PP, Cheng CY, Mruk DD. Interleukin 1 Alpha (IL1A) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat. *Biol Reprod* [Internet]. 2008 Mar 1;78(3):445–54. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.107.064501>

CAPÍTULO 2

O artigo foi redigido nas normas da revista Livestock Science.

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/706547?generatepdf=true