



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE
MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**Impacto do estresse térmico testicular na cinética e na resistência dos
espermatozoides ovinos armazenados a 5 °C**

EDUARDO DOS SANTOS ROSSI

Botucatu, São Paulo

Maio/2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE
MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**Impacto do estresse térmico testicular na cinética e na resistência dos
espermatozoides ovinos armazenados a 5 °C**

EDUARDO DOS SANTOS ROSSI

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro
Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. John Patric Kastelic

Botucatu, São Paulo
Maio/2022

R831i

Rossi, Eduardo dos Santos

Impacto do estresse térmico testicular na cinética e na resistência dos espermatozoides ovinos armazenados a 5 °C / Eduardo dos Santos

Rossi. -- Botucatu, 2022

62 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientadora: João Carlos Pinheiro Ferreira

Coorientadora: John Patric Kastelic

1. Hipertermia testicular. 2. criopreservação de espermatozoides. 3.
CASA. 4. viabilidade espermática. 5. carneiros. I. Título.

Nome do autor: Eduardo dos Santos Rossi

Data da defesa da Dissertação: 16 de maio de 2022.

Título: Impacto do estresse térmico testicular na cinética e na resistência dos espermatozoides ovinos armazenados a 5 °C.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP,
Botucatu, SP, Brasil

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Membro

Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, Pirassununga, SP, Brasil

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

Membro

Universidade Santo Amaro (UNISA, São Paulo/SP)

Impacto Potencial da Pesquisa

A presente pesquisa apresenta contribuições relevantes para a área da biotecnologia reprodutiva animal, ao investigar de forma pioneira os efeitos do estresse térmico testicular agudo sobre a cinética e a resistência de espermatozoides ovinos submetidos ao armazenamento refrigerado a 5 °C. Considerando o contexto atual de intensificação dos sistemas de produção e das mudanças climáticas globais, que favorecem a ocorrência de episódios frequentes de estresse térmico em animais domésticos, os resultados deste estudo têm implicações práticas e científicas importantes para a reprodução de pequenos ruminantes, especialmente em regiões tropicais e subtropicais.

A demonstração de que a hipertermia escrotal compromete significativamente a cinética espermática e a morfologia seminal, ainda que não afete de forma imediata a resistência ao armazenamento refrigerado, amplia o entendimento sobre a fisiopatologia do estresse térmico reprodutivo e seus reflexos na fertilidade. Além disso, a validação da termografia infravermelha como ferramenta auxiliar no diagnóstico precoce de alterações testiculares representa um avanço na adoção de técnicas não invasivas, rápidas e economicamente viáveis para a avaliação da função testicular em reprodutores.

Do ponto de vista aplicado, os achados podem subsidiar estratégias de manejo e seleção de animais mais adaptados ao estresse térmico, promovendo melhorias nos índices reprodutivos da ovinocultura e contribuindo para o uso mais eficiente das biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial com sêmen refrigerado. No campo científico, a pesquisa abre novas perspectivas para estudos futuros sobre os mecanismos moleculares envolvidos na recuperação testicular pós-insulto térmico, bem como sobre o desenvolvimento de protocolos mais eficazes de conservação e utilização do sêmen em programas de melhoramento genético animal.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE EDUARDO DOS SANTOS ROSSI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CÂMPUS DE BOTUCATU

Aos 16 dias do mês de maio do ano de 2022, às 14:30 horas, no(a) no Anfiteatro do Serviço de Reprodução Animal, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de EDUARDO DOS SANTOS ROSSI intitulada ' IMPACTO DO ESTRESSO TÉRMICO

TESTICULAR NA CINÉTICA E NA RESISTÊNCIA DOS
ESPERMATÓZÓIDES QUINHOS ARMAZENADOS A
5°C. ' . A Comissão

Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. JOAO CARLOS PINHEIRO FERREIRA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ - Unesp - Botucatu, Prof. Dr. RUBENS PAES DE ARRUDA (Participação Presencial) do(a) Depto de Reprodução Animal / FMVZ-USp, Prof. Dr. ANDRÉ MACIEL CRESPILO (Participação Presencial) do(a) Universidade Santo Amaro-UNISA / São Paulo/SP. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. JOAO CARLOS PINHEIRO FERREIRA




DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria do Carmo e Vanderley Rossi, minha irmã Bianca, por todo amor, carinho e apoio durante todos esses anos e, por terem me ensinado a maior riqueza do mundo, lutar pelos meus sonhos!

Aos meus avós Ana Maria e Emanuel Nobre, José Rossi (in memoriam) e Lozandina, meu alicerce. Essa conquista é nossa pois sou o primeiro de muitos da nossa família a conquistar. Amo vocês!!!

Em especial, minha noiva, Vanessa, companheira e amiga que Deus me presenteou. Te amo.

Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade.

Yoko Ono

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela proteção, saúde, sabedoria e por guiar-me sempre no caminho do bem.

A minha família e todos os familiares que estiveram sempre ao meu lado e deram todo apoio. Deus é bom o tempo todo, o tempo todo Deus é bom! Amo vocês!!!

A minha noiva Vanessa, pelo seu intenso apoio e companheirismo. Por toda paciência e cumplicidade durante esses anos. Você foi minha calma, meu amor e, minha maior conquista! Deus cuida de nós. Te amo!!!

A Dona Cidinha e Sr. Antônio, pelo carinho, apoio e incentivo em todos esses anos. O Sr. e a Sra. me deram o maior presente da minha vida e meu grande amor! Amo vocês!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, pela oportunidade e confiança para desempenhar esse projeto de mestrado. Agradeço a cumplicidade, incentivos e conhecimentos transmitidos nestes dois anos, fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal de forma substancial o qual me guia à conquista deste título de mestre. Muito obrigado! Que Deus o abençoe sempre!!!

A Profa. Eunice Oba, Profa. Cintya Martins e ao amigo João Ratti pela amizade, ensinamentos, conversas e colaboração.

Ao Prof. José Dell'Aqua pela amizade e pelos ensinamentos em cada oportunidade de conversa.

Aos meus amigos de longa data, em especial Gustavo Simonato, Patricia Zachêo e Pedro Yuri por se fazerem presentes em minha vida e serem bons amigos.

Aos amigos que fiz em Botucatu-SP, em especial Luiz Eduardo vulgo ancião e Evandro Listoni. Sou grato a vocês por serem amigos nos momentos bons e difíceis. Estamos juntos!!!

Aos demais Professores do Departamento de Reprodução Animal: Prof. Papa, Prof. Marco Alvarenga, Prof. Nereu, Prof. Meira, Prof. Daniel, Profa. Fabiana, Profa. Fernanda, Prof. Sony e Profa. Denise por todos os momentos compartilhados desde o estágio, residência e mestrado. Os qualifico como *sine qua non* no trajeto que tracei para atingir meus objetivos. Eternos em minha vida.

Ao Guilherme Rizzoto e Renan Denadai pela colaboração e fundamental contribuição para a realização deste projeto.

A todos os colegas desde a época do estágio, residência, pós-Graduação e, em especial, a equipe de orientados do Professor João (nosso orientador), por toda colaboração, troca de experiências e momentos compartilhados durante os experimentos. Muito obrigado e que Deus abençoe cada um.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução: Edvaldo, Felipe, Edilson, Dona Raquel e Dona Lurdinha, baianas e ao Paulo. Aos funcionários da manutenção e alimentação do hospital veterinário, vocês foram grandes amigos. Tenho um imenso carinho por cada um! Que Deus os abençoe sempre, meus amigos.

Ao Gamero, Ricardo e Santucci, pela amizade e boas risadas! Vocês ajudaram essa caminhada ser mais leve! Muito obrigado!!

A todos os funcionários do H.V. por todo apoio no trabalho dia a dia, risadas, cafezinhos e pela amizade sincera de muitos! Com certeza vocês foram uma peça fundamental nessa jornada! Que Deus abençoe cada um!!!

Aos funcionários do Gado de Corte: Sr. João e Antônio. Muito obrigado por toda ajuda e amizade. Que Deus os abençoe!!

A todos os residentes e estagiários que auxiliaram durante esta pesquisa. Muito obrigado!

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu/SP por todo suporte para meu crescimento profissional e pessoal. Sou e serei eternamente grato!!!

A Botupharma[®], empresa sempre parceira que auxiliou no patrocínio importante para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!!!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização deste projeto de pesquisa.

Muito obrigado!

“Quando todos derem sinal de que estão adaptados ao que você se tornou, desinstale-os com uma nova versão de si. Para que não alimentem a pretensão de que você se limitará a ser o que eles esperam que você seja”.

Pe. Fábio de Melo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL - microlitro

μm - micrometros

ALH - amplitude de deslocamento lateral da cabeça

BCF - frequência de movimento cruzado

BCF - frequência de movimento

CASA - Análise Computadorizada da Célula Espermática

cm - centímetro

CO - controle

D - dias

DCL - deslocamento lateral de cabeça

DIC - contraste de Interferência Diferencial

DNA - ácido desoxirribonucleico

ELON – alongamento

EPM - erro padrão da média

ET - estresse térmico

Fig - figura

h - hora

Hz - hertz

IE - insulação escrotal

ITU - índice temperatura umidade

Kg - quilogramas

LIN - linearidade

M0 - momento zero

mg - miligrama

min - minuto

mL - mililitro

MP - motilidade progressiva

MT - motilidade total

P - probabilidade

PI - membrana plasmática integra

s - segundos

STR - retilinearidade

Tab - tabela

UR - umidade relativa

VAP - velocidade de percurso

VCL - velocidade curvilínea

VSL - velocidade progressiva

LISTA DE SIMBOLOS

- menos

% por cento

/ por

: para (1:1)

< menor

> maior

$\geq$ maior ou igual

$\leq$ menor ou igual

= igual

$\pm$ mais ou menos

® marca registrada

° C graus Celsius

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Média ($\pm$ EPM) da cinética espermática do sêmen armazenado a 5 °C por 72 horas em diferentes períodos e momentos de carneiros submetidos ao estresse térmico testicular (ETS). Efeito do tratamento e efeito do tempo de armazenamento foram considerados quando ($P < 0,05$) representado por letras diferentes e *	51
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema representativo do desenho experimental com 8 carneiros mestiços (Santa Inês vs. Dorper). Para cada dia (controle, CO pré-HS e D 7, 14, 21, 28, 35, 47 e 62 dias pós-HS) os ejaculados foram avaliados subjetivamente (julgamento preliminar), diluídos (BotuBov[®], concentração final 400×10^6 espermatozoides). /ml); refrigerado a 5 °C e avaliado nos tempos (0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de refrigeração) por Análise Computadorizada de Espermatozoides (CASA). Nos mesmos dias da avaliação seminal, foi retirada uma alíquota da amostra para avaliação da integridade da membrana plasmática e outra alíquota para análise morfológica..... 44

FIGURA 2 - Média ($\pm$ EPM) do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) do ambiente durante o período experimental em carneiros mestiços (Santa Inês vs. Dorper) submetidos a insulação testicular (barra vertical cinza = 51 horas). O registro dos dados iniciou dois dias (D) antes da insulação (D-2), seguido de medidas a cada 30 minutos durante a insulação (D0) e D7, 14, 21, 28, 35, 47 e 62 dias pós-ET..... 48

FIGURA 3 - Média ($\pm$ EPM) da (A) temperatura da superfície escrotal analisada por termografia no pré- e pós-estresse térmico testicular (ETT) e por Data logger durante o período de ETT (51 horas). As médias de temperatura analisadas pela termografia foram divididas em regiões superior, média e inferior de cada lado escrotal; (B) integridade da membrana plasmática de carneiros submetidos ao ETT pré (controle, CO) e D7, 14, 21, 28, 35, 47 e 62 dias pós-ETT; (C) parâmetros de qualidade espermática (concentração, motilidade total e progressiva (%) e defeitos morfológicos totais) de 8 carneiros mestiços (Santa Inês vs. Dorper) pré- (controle, CO) e pós-THS (D7, 14, 21, 28, 35, 47 e 62 dias, e (D) parâmetros de cinética espermática em carneiros (n = 8) submetidos a THS por 51 h, letras diferentes indicam significância estatística (P < 0,05)..... 50

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	19
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
2. Revisão de literatura.....	21
2.1. Aspectos anatômicos importantes para a termorregulação testicular	21
2.2. Modelos experimentais de degeneração testicular	23
2.3. Degeneração testicular.....	23
2.4. Métodos de diagnóstico da degeneração testicular.....	24
2.4.1. Avaliação espermática para diagnóstico da degeneração testicular	25
2.5. Exame complementar para auxílio diagnóstico de degeneração testicular	26
2.5.1. Termografia infravermelha.....	26
2.6. Refrigeração.....	27
3. REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO 2.....	41
Introdução.....	44
Material e métodos	45
Resultados	48
Discussão.....	53
Referências	58

ROSSI, E.S. IMPACTO DO ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR NA CINÉTICA E NA RESISTÊNCIA DO SÊMEN ARMAZENADO A 5 °C EM CARNEIROS (*OVIS ARIES*). Botucatu – SP. 2022. 62p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

RESUMO

Eduardo dos Santos Rossi. **Impacto do estresse térmico testicular na cinética e na resistência dos espermatozoides ovinos armazenados a 5 °C** [Impact of testicular heat stress on the kinetics and resistance of ovine sperm stored at 5 °C]. Botucatu-SP. 2022. 42f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – FMVZ, Botucatu, São Paulo, Brasil).

Objetivo: Este estudo avalia o efeito do estresse térmico testicular agudo na resistência do sêmen refrigerado de ovinos. Além disso, utilizou-se a termografia infravermelha como ferramenta no auxílio diagnóstico dos efeitos do estresse térmico testicular. **Metodologia:** Oito carneiros mestiços aprovados em exame andrológico foram usados. A temperatura testicular foi aumentada por insulação escrotal (fraldas descartáveis) por 51 h, aumentando a temperatura da superfície escrotal ~3 - 5°C, mas não afetando a temperatura retal. O sêmen foi coletado por vagina artificial antes (Controle; CO) e nos dias (D) 7, 14, 21, 28, 35, 47 e 62 após a insulação. A termografia infravermelha do escroto e área do globo ocular foi aplicada momentos antes da insulação e imediatamente após a retirada. Além disso, a temperatura retal foi monitorada por termômetro digital nos mesmos momentos da termografia. O sêmen foi avaliado via Análise Computadorizada da Célula Espermática (CASA) imediatamente após a coleta (M0), retirou-se uma fração para morfologia e, na sequência, foi diluído com BotuBOV® (400 x 10⁶ espermatozoide/mL), resfriado a 4°C e avaliado em 0, 12, 24, 36, 48 e 72 h. Os dados do estudo foram considerados normais e foram analisados por medidas repetidas da ANOVA usando GraphPad Prism® considerando dias de

coleta ou tempo de armazenamento de resfriamento. A diferença estatística foi considerada quando $P < 0,05$ e os resultados são apresentados como Média $\pm$ SEM. **Resultados:** Houve redução nos parâmetros de cinética espermática e aumento de morfologia anormal já nos primeiros 7 dias após insulação, no entanto a resistência foi preservada. Os piores momentos de cinética e morfologia foram nos dias 14, 21 e 28 e, começaram a melhorar em D35, mas ainda com impacto na resistência espermática. Em D47 houve uma melhora importante na cinética, morfologia e integridade de membrana plasmática, além disso, a resistência se manteve. A recuperação completa de todos os parâmetros avaliados foi feita aos 62 dias após a pós insulação. Ademais, uma grande diferença estatística foi observada entre o momento pré e pós-HS com a termografia. **Conclusão:** O estresse térmico testicular agudo prejudicou a cinética do sêmen refrigerado levando a necropermia. Contudo, a resistência do sêmen refrigerado a 5 °C por 72 h não foi comprometida. Além disso, a termografia infravermelha foi uma ferramenta valiosa no auxílio diagnóstico de alterações no testículo associadas a baixa qualidade seminal.

Palavras-chave: Hipertermia testicular, criopreservação de sêmen, CASA, viabilidade espermática, termografia, carneiros.

ROSSI, E.S. IMPACT OF TESTICULAR HEAT STRESS ON THE KINETICS AND RESISTANCE OF OVINE SPERM STORED AT 5 °C. Botucatu – SP, Brasil. 42p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – FMVZ, Botucatu, São Paulo, Brasil).

ABSTRACT

Objective: This study evaluates the effect of acute testicular heat stress on the strength of refrigerated semen in rams. Furthermore, infrared thermography was used as a tool to aid in the diagnosis of the effects of testicular heat stress. **Methodology:** Eight crossbred rams that passed an andrological examination were used. Testicular temperature was increased by scrotal insulation (disposable nappies) for 51 h, increasing scrotal surface temperature ~3 - 5°C, but not affecting rectal temperature. Semen was collected through an artificial vagina before (Control; CO) and on days (D) 7, 14, 21, 28, 35, 47 and 62 after insulation. Infrared thermography of the scrotum and eyeball area was applied moments before insulation and immediately after withdrawal. In addition, rectal temperature was monitored by a digital thermometer at the same times as thermography. The semen was evaluated via Computerized Sperm Cell Analysis (CASA) immediately after collection (M0), a fraction was removed for morphology and, subsequently, it was diluted with BotuBOV® (400 x 10⁶ sperm/mL), cooled to 4°C and evaluated at 0, 12, 24, 36, 48 and 72h. Study data were considered normal and were analyzed by repeated measures ANOVA using GraphPad Prism® considering days of collection or cooling storage time. The statistical difference was considered when $P < 0,05$ and the results are presented as Mean $\pm$ SEM. **Results:** There was a reduction in sperm kinetic parameters and an increase in abnormal morphology within the first 7 days after insulation, however resistance was maintained. The worst moments of kinetics and morphology were on days 14, 21 and 28, and they started to improve in D35, but still with impact on sperm resistance. On D47 there was an important improvement in plasma membrane kinetics, morphology and integrity, furthermore, resistance was maintained. Complete recovery of all evaluated parameters was performed 62 days after post-insulation.

Furthermore, a large statistical difference was observed between pre- and post-HS time with thermography. **Conclusion:** Acute testicular heat stress impaired the kinetics of refrigerated semen leading to necrospermia. However, the resistance of semen cooled at 5 °C for 72 h was not compromised. In addition, infrared thermography was a valuable tool in aiding the diagnosis of alterations in the testis associated with poor seminal quality.

Keywords: Testicular hyperthermia, semen cryopreservation, CASA, sperm viability, thermography, rams.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

É esperado que a população mundial aumente de 7,2 para 9,6 bilhões até o ano de 2050 (FAO, 2009), um aumento da ordem de 33%. Atrelado ao crescimento populacional está o aumento da demanda de produtos de origem animal em cerca de 70% para o mesmo período (Marin et al., 2016).

A produção animal é muito importante para a segurança alimentar global, pois provê 17% do consumo global de quilocalorias e 33% do consumo global de proteínas (Rosegrant et al., 2009). Em aspectos gerais, o setor pecuário emprega cerca de 1,1 bilhões de pessoas no mundo (Aguiar e Hurst et al., 2005) e, tendo em vista a crescente demanda de produtos de origem animal e o rápido crescimento dos países em desenvolvimento, foi considerado a “revolução pecuária” (Thornton 2010).

No Brasil, país de pecuária forte, a crescente demanda na produção de ovinos tem chamado a atenção nos últimos anos (Magalhães et al., 2018), contudo, este setor enfrenta algumas dificuldades como baixas taxas de concepção, principalmente com a inseminação artificial cervical (Kumar et al., 2014), onde parte dos baixos índices de fertilidade são atribuídos ao uso de sêmen congelado (O'Meara et al., 2008; Maia 2015).

O uso de biotecnologias a campo ainda é pouco difundido na ovinocultura, comparados às outras espécies. Este cenário torna esta área muito promissora e, portanto, implica na necessidade de estudos, especialmente sobre a qualidade e longevidade do sêmen pós-criopreservação (Cseh et al., 2012; Paul et al., 2020).

O clima, principalmente quando se considera o estresse térmico (ET), exerce grande influência sobre a saúde e a reprodução animal (Rojas-Downing et al., 2017). Em condições fisiológicas a maioria dos mamíferos, incluindo os ovinos, mantém a temperatura testicular 3 e 5 °C inferior a corporal (Kastelic et al., 1995), condição essencial para a adequada espermatogênese (Kim et al., 2013; Abi Saab et al., 2011).

É possível dizer que a elevação da temperatura ambiente contribui para a seleção de animais mais resistentes às mudanças climáticas e, conseqüentemente, irá reduzir o número de animais menos adaptados (Parmesan et al., 2006). Entretanto, considerando que a tendência é de aumento na temperatura, sabe-se que existem variações regionais, principalmente em regiões tropicais e subtropicais que são associadas a quadros de subfertilidade em ruminantes (Takahashi et al., 2012).

Apesar dos vários estudos dos efeitos do estresse térmico sobre a qualidade e a congelabilidade seminal (Kastelic et al., 1999; Alves et al., 2016; Armengol et al., 2018), não há relatos descrevendo os impactos do ET na resistência do sêmen ao processo de refrigeração.

Portanto, a partir da hipótese em que carneiros, submetidos à insulação escrotal terão reduzida a qualidade e resistência das amostras seminais refrigeradas ao longo do processo de recuperação do insulto resultante do estresse térmico testicular agudo o presente estudo teve como objetivo avaliar em os efeitos do ET testicular agudo na qualidade, cinética e viabilidade espermática durante o armazenamento a 5 °C por 72 horas ao longo do processo de recuperação do estresse térmico.

2. Revisão de literatura

2.1. Aspectos anatômicos importantes para a termorregulação testicular

Na maioria dos mamíferos domésticos, os testículos estão localizados fora da cavidade abdominal, alojados dentro do escroto (Hansen, 2009), apesar de haver algumas particularidades, como a dos elefantes, que tem os testículos dentro da cavidade abdominal (Gaeth et al., 1999).

A origem do escroto é amplamente debatida (Kleisner et al., 2010). A hipótese mais aceita baseia-se na “*cooling hypothesis*”, que postula que para a espermatogênese fisiológica ocorrer, os testículos precisam obrigatoriamente estar a uma temperatura inferior a corporal. Para tanto, é importante que os testículos fiquem externamente à cavidade abdominal (Moore 1926). Contudo, algumas espécies têm os testículos dentro da cavidade abdominal e apresentam espermatogênese normal (Glover e Sellars 1973).

Além disso, existe hipótese de que a bolsa testicular sofreu reduções ao longo da evolução em mamíferos, tendo em vista e associado ao alto gasto energético no processo de descida dos testículos (Werdelin e Nilsson 1999), assim como sugerem que haverá reduções adicionais, tendo em vista e, principalmente, a maior resistência adaptativa dos testículos a altas temperaturas.

Ainda, Kleisner (2010) afirmam que a pressão de seleção foi fundamental no processo de evolução resultando na heterogeneidade onde os testículos são alojados entre as espécies e, portanto, tornando possível o adequado desenvolvimento testicular com espermatogênese fisiológica, assim como proteção da gônada contra injúrias

internas e externas ao organismo e consequentemente preservação do DNA paterno (Kleisner et al., 2010), bem como modificações vasculares que possibilitaram melhor desenvolvimento metabólico das mitocôndrias, especialmente nos processos oxidativos dando maior suporte para metabolismo aeróbico e consequentemente maior atividade nos processos de divisão para as células germinativas (Setchell et al., 1998).

Embora existam inúmeras hipóteses sobre a origem e evolução anatômica dos testículos, na maioria dos mamíferos incluindo humanos a espermatogênese adequada ocorre quando a temperatura dos testículos está inferior a corporal (Hansen, 2009). Neste sentido, a localização dos testículos na maioria dos mamíferos incluindo ovinos é externa à cavidade abdominal o que permite a manutenção da temperatura inferior a corporal através do processo denominado termorregulação testicular (Kastelic et al., 1995).

Os mecanismos de termorregulação testicular possibilitam manter a temperatura dos testículos entre 3 e 5 °C inferior a corporal (Skinner e Louw, 1966). Para uma termorregulação testicular adequada a túnica muscular *dartus* e o músculo cremaster, plexo pampiniforme, superfície escrotal e glândulas sudoríparas do escroto são essenciais (Blazquez et al., 1988).

O plexo pampiniforme, presente no funículo espermático, por meio de um mecanismo de troca de calor artéria e as enoveladas veias testicular, diminui progressivamente a temperatura do sangue da artéria antes dele entrar no testículo (Kastelic et al., 1996; Barros et al., 2011). Da mesma forma, a túnica *dartus*, órgão formado por fibras musculares lisas e localizado logo abaixo da pele escrotal, auxilia na manutenção da temperatura testicular; neste, nervos sensoriais coordenam a contração ou relaxamento dependendo da temperatura escrotal (Senger 2003). Já o músculo cremaster localizado no cordão espermático cumpre também importante função regulatória do fluxo sanguíneo pelos movimentos de contração e relaxamento do cordão durante o processo de termorregulação (Senger 2003; Hansen 2009).

Outra estrutura fundamental é a superfície escrotal dada sua importância na troca de temperatura entre o ambiente interno e externo do escroto (Kastelic et al., 1997), principalmente pela presença das glândulas sudoríparas, muito importantes para a evapotranspiração e, consequente resfriamento escrotal/testicular (Moule e Waites, 1963; Pérez-Crespo et al., 2008). Do mesmo modo da túnica *dartus*, a taxa de sudorese é regulada por meio das informações colhidas pelas terminações nervosas termossensíveis distribuídas na superfície do escroto (Senger, 2003).

2.2. Modelos experimentais de insulação testicular

Há muitos anos se estuda os efeitos do ET na reprodução de carneiros (Waites et al., 1961). Além da ação testicular local, o ET também afeta a reprodução e o consumo alimentar, prejudicando o equilíbrio energético (Skinner e Louw, 1966; Hansen, 2009).

Inúmeros modelos experimentais de ET foram desenvolvidos, no entanto, existem duas formas mais comuns de promover o insulto térmico testicular, que é promovendo o aquecimento do corpo inteiro ou apenas da bolsa testicular. O modelo mais completo de ET é aquecer o corpo inteiro, assim é possível detectar os efeitos de todas as modificações fisiológicas, metabólicas e endócrinas e, além da resposta das glândulas sudoríparas escrotais (Setchell et al., 1998).

O outro modelo de promover o ET nos testículos é a insulação local (Setchell et al., 1998). Um dos métodos mais utilizados de insulação escrotal envolve o uso de fraldas infantis descartáveis e fita adesiva, sendo fácil de confeccionar, barato e, principalmente, eficaz em promover a hipertermia elevada (Rahman et al., 2018; Vieira-Neto et al., 2019). Contudo, a extensão dos efeitos deletérios da hipertermia testicular não está totalmente clara (Shahat et al., 2020) o que torna fundamental mensurar a extensão de calor promovido durante o insulto (Waites 1970; Brito et al., 2004).

2.3. Degeneração testicular

Considerando os estudos anteriores, o incremento calórico da gônada masculina, desencadeia um processo de degeneração da estrutura testicular (Kastelic et al., 1996) em consequência de vários fatores, mas principalmente pela hipertermia e / ou perda da capacidade de termorregulação dos testículos (Moule e Waites, 1963). Esse quadro é um dos mais incriminado nos casos de subfertilidade e até mesmo infertilidade em espécies domésticas e de produção (Rahmam et al., 2018).

A elevação da temperatura ambiental por mudanças climáticas, hipertermia sistêmica decorrente de processos inflamatórios, infecciosos e tóxicos; as dermatites escrotais, edema, hidrocele e excesso de gordura escrotal têm potencial de causar degeneração testicular (Setchell et al., 1998; Alvarenga e Papa, 2009; Hansen 2009; Shahat et al., 2020). Além disso, outros fatores como deficiência nutricional, especialmente de vitamina A e outras, assim como lesões vasculares e consequente

perda de termorregulação também podem levar à degeneração testicular (Zervos et al., 2005).

Ademais, considerando a degeneração testicular uma doença multifatorial, vale lembrar os fatores físicos e químicos que podem causar lesão da barreira hematotesticular, assim a aplicação de fármacos esteróides e anabolizantes podem comprometer severamente os testículos levando a degeneração testicular (Nascimento e Santos 2003; Alvarenga e Papa, 2009; Almasiova et al., 2012).

O impacto da degeneração testicular na libido não está totalmente esclarecido, contudo os prejuízos sobre a qualidade espermática são bem conhecidos (Péres-Crespo et al., 2008; Kastelic et al., 2017), portanto, o comprometimento da qualidade espermática de forma transitória ou até mesmo irreversível representa um distúrbio reprodutivo classificado como impotência *generandi*, um importante problema do ponto de vista reprodutivo (Lagerlof 1938), pois causa enormes prejuízos econômicos (Alvarenga e Papa, 2009).

Outros fatores importantes que podem influenciar direta ou indiretamente os impactos da hipertermia testicular são: raça, aptidão, cor do pelame e até mesmo presença ou ausência de lâ (Armengol et al., 2015). Cada um deles tem potencial negativo distinto sobre o tecido testicular, que pode variar de modificações microscópicas à totalmente perceptível ao exame clínico visual (Cavalcante et al., 2014; Garcia 2017).

É possível graduar a DT em leve, moderada ou grave, de acordo com a intensidade da lesão e qualidade espermática (Lagerlof 1938; Bicudo et al., 2007).

Nas condições leve ou moderada, normalmente há redução de fertilidade com morfologia prejudicada discretamente ou de forma importante no caso do 2º grau, contudo, em ambas as situações células da linhagem germinativa: espermatogônias, Leydig e Sertoli permanecem, na maioria dos casos com suas funções preservadas sendo fundamental a remoção do agente causal (Moule e Waites 1963; Bicudo et al., 2007). Em condições graves onde o diagnóstico da DT não foi possível nos estágios iniciais, achados clínicos severos podem ser encontrados e em muitos casos potencialmente irreversível, como impactos negativos sobre a qualidade do ejaculado, morfologia e concentração espermática (Lagerlof 1938; Bicudo et al., 2007).

2.4. Métodos de diagnóstico da degeneração testicular

Os métodos de diagnóstico da DT envolvem um detalhado exame clínico andrológico, sendo fundamental a colheita e avaliação espermática. O uso do ultrassom e da termografia infravermelha podem auxiliar no diagnóstico (Lagerlof 1938; Bicudo et al., 2007; Hansen 2009).

2.4.1. Avaliação espermática para diagnóstico da degeneração testicular

Os achados seminais mais característicos da DT relacionam-se à diminuição da motilidade espermática e ao aumento de espermatozoides com danos morfológicos (Kastelic et al., 1995). Esse quadro seminal impacta severamente a fertilidade (Garcia 2017). Os defeitos morfológicos mais comuns relacionados à DT são os de cabeça e cauda, cabeça isolada e gotas citoplasmáticas proximais (Lagerlof 1938; Bicudo et al., 2007; Hansen 2009).

A avaliação da cinética espermática é uma ferramenta indispensável para diagnóstico de baixa qualidade seminal, uma vez que possibilita detectar alterações iniciais nos ejaculados sob efeito do estresse térmico agudo e/ou crônicos (Moreira et al., 2001; Vieira et al., 2008).

Há particularidades entre as espécies, por exemplo em touros *Bos taurus* são altamente sensíveis aos efeitos negativos do estresse térmico sobre a qualidade, morfologia e fertilidade do sêmen (Kastelic et al., 2001; Brito et al., 2003). No entanto, a espécie caprina, cujo escroto bipartido possui maior superfície de área escrotal e maior distribuição de glândulas sudoríparas, é menos sensível aos efeitos do estresse térmico. Contudo, quando existem condições severas de ET e perda de homeostase metabólica e deficiência dos mecanismos de termorregulação ocorre a perda de qualidade seminal, queda da concentração espermática, prejuízos nos padrões de cinética e diminuição no volume do ejaculado (Coelho et al., 2008; Archbald et al., 1990).

Além disso, é fundamental conhecer as particularidades de cada espécie incluindo o ciclo do epitélio seminífero, pois dessa forma será possível compreender a extensão e possivelmente a cronologia da DT (Swierstra 1968; Rahman et al., 2011; Garcia-Oliveros et al., 2020). Ademais, métodos de avaliação subjetiva (motilidade, concentração e morfologia espermática) nem sempre fornecem informações realísticas e, portanto, o uso de métodos menos subjetivos nestas condições como por exemplo a análise computadorizada da célula espermática avaliando parâmetros de cinética e a avaliação da integridade de membrana, aumentam a confiabilidade no diagnóstico

(Ericsson et al., 1993; Arruda et al., 2011), visto a importância desta última nos processos relacionados a viabilidade espermática (Borges et al., 2011).

Por fim, ressaltando a dificuldade de traçar um prognóstico para a DT tendo em vista os distúrbios multifatoriais e suas consequências, a realização de exames clínicos andrológicos em curtos intervalos e de exames complementares é fundamental para compreender a extensão dos efeitos (Coulter et al., 1988; Arteaga et al., 2005; Alvarenga e Papa, 2009).

2.5. Exame complementar para auxílio diagnóstico de degeneração testicular

O uso de ferramentas que auxiliem na avaliação clínica andrológica de DT, como a termografia infravermelha e a ultrassonografia testicular tem se tornado cada vez mais frequente e, esses exames têm a capacidade de complementar os achados clínicos e seminais na busca de um diagnóstico (Coulter et al., 1988; Brito et al., 2004; Alves et al., 2014; Junior et al., 2017), assim como outros métodos como ultrassom Doppler (Hedia et al., 2019), biópsia testicular (Sartori et al., 2002), proteômica do sêmen (Abdelnour et al., 2019), sondas fluorescentes (Gillan et al., 2005) e expressão gênica (Collier et al., 2008; Rizzoto et al., 2020)

2.5.1. Termografia infravermelha na superfície escrotal

A termografia infravermelha capta o calor emitido pela superfície corporal e representa o seu gradiente com diferentes cores, permitindo o seu uso como método diagnóstico especialmente no sistema reprodutor masculino (Coulter et al., 1988; Brito et al., 2004).

Apesar de ser um método rápido, fácil e eficaz no diagnóstico de alteração de temperatura (Coulter et al., 1988), a termografia tem várias limitações como presença de pelo, umidade e sujidades que podem prejudicar a confiabilidade dos resultados (Basile 2012; Damacena et al., 2019). Neste sentido, é fundamental o conhecimento técnico na utilização da termografia especialmente por ser uma técnica amplamente utilizada nas espécies domésticas e de produção (Gazvani et al., 2000; Capraro et al., 2008; Alvarenga e Papa, 2009).

Sabe-se que a extensão dos danos causados pelo estresse térmico nos testículos está relacionada ao tempo e intensidade da sua duração, que influenciará o grau de DT

(Brito et al., 2003; Fernandes et al., 2008). Dessa forma, considerando a importância da termografia no auxílio diagnóstico de alterações reprodutivas em machos, é fundamental a realização de estudos que associam a funcionalidade da técnica na prática clínica de distúrbios testiculares em consequência do estresse térmico (Alves et al., 2014; Gonzaga et al., 2017).

2.5.2. Ultrassonografia testicular em ovinos

O exame de ultrassom bidimensional utilizando a escala de cinza permite interpretar a funcionalidade da estrutura/órgão avaliado e é amplamente utilizado (Ginther 1995) principalmente por auxílio precoce no diagnóstico de patologias testiculares complementando o exame clínico andrológico (Nepomuceno et al., 2013) e além disso, este método permite a diferenciação de alterações extratesticulares e intratesticulares, com sensibilidade de 98% a 100% Siegel (2003).

As avaliações da degeneração testicular utilizando o ultrassom bidimensional analisando as escalas de cinza são descritas a mais tempo, contudo, novos desafios estão sendo lançados explorando outras ferramentas ultrassonográficas como Doppler colorido, Power e Espectral, mostrando-se importante para a avaliação da integridade vascular e fisiológica no testículo (Ginther 2007; NEPOMUCENO et al., 2013).

2.6. Refrigeração do sêmen ovino

O sêmen ovino colhido pode ser usado diluído à fresco, congelado ou refrigerado (Maia et al., 2010). A refrigeração tem como vantagens principais o armazenamento barato e otimização do uso de reprodutores (Vishwanath e Shannon, 2000). Além disso, redução de motilidade e morfologia normal são menos pronunciadas no sêmen refrigerado comparado ao congelado-descongelado (revisado por Salamon e Maxwell, 1979).

Em linhas gerais, a refrigeração consiste em reduzir a temperatura do ejaculado diluído para estabilização à 5 °C e, conseqüentemente, adaptação devido redução do

metabolismo espermático (Mazur, 1984). A adaptação do sêmen diluído é também popularmente conhecida como fase de equilíbrio, caracterizada pelo tempo em que os espermatozoides permanecem em contato com o glicerol e outros componentes do diluente o que resulta em interação do meio intra e extracelular pré congelamento (Salamon e Maxwell, 2000). Após diluição completa para refrigeração, a interação entre o glicerol e a célula espermática tem início aos 30°C e é recomendada pelo menos cerca de 90 a 120 min de refrigeração a 5°C, se a intenção for a congelamento (Evans e Maxwell, 1987).

Há alguns estudos que empregam diferentes taxas de refrigeração na espécie ovina, uma hora e meia (Gonzalez 1996), quatro horas (Mathur 1991), de vinte e quatro à setenta e quatro horas (Câmara et al., 2011) sendo, contudo, imprescindível a atenção quanto a taxa de refrigeração, intervalo de temperatura e o limite de temperatura, tendo em vista a alta vulnerabilidade da célula espermática ao choque térmico, inferindo queda de motilidade e capacidade de fertilização de forma irreversível (Watson 2000). Assim sendo, o processo de refrigeração obrigatoriamente precisa seguir uma constante, o suficiente, que torne possível os espermatozoides reduzirem a quantidade de água intracelular, no entanto, sem excesso e adequado para que a motilidade e as funções celulares não sejam comprometidas (Mazur 1984; Watson 2000).

É importante considerar também que durante a refrigeração ocorre uma reação das cadeias hidrocarbonadas, conhecida como fase de transição dos lipídeos de membrana que resulta na modificação da membrana do seu estado líquido-cristalino para gel, passo limitante devido ao aumento da peroxidação lipídica podendo levar a lesões celulares e consequentemente perda de motilidade e da capacidade fertilizante do sêmen, além de aumento da permeabilidade celular (Parks 1997).

A ausência de equilíbrio da permeabilidade celular em função da má organização das proteínas integrais, tem como consequência o transporte facilitado de inúmeras substâncias e perda de ATP, ácidos nucleicos, fosfolipídios, enzimas, potássio e magnésio componentes fundamentais de membrana intracelulares além da redução na manutenção de cálcio intracelular; atrelado a isto está o choque térmico que prejudica a glicólise anaeróbica e o metabolismo aeróbico, restringindo a produção de ATP pela célula espermática prejudicando suas funções celulares (Watson 1995; Parks 1997).

3. REFERÊNCIAS

ABDELNOUR, S. A.; ABD EL-HACK, M. E.; KHAFAGA, A. F.; ARIF, M.; TAHA, A. E.; NORELDIN, A. E. Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. **Journal of Thermal Biology**, v. 79, p. 120-134, 2019.

ABI SAAB, S.; DARWISH, W. Y.; AAD, P.; SLEIMAN, F. T.; KALLASSY, N.; AAD, Y. Effect of adaptation and heat stress on reproductive performances of fat tail Awassi rams in Eastern Mediterranean. **Lebanese Science Journal**, p. 31-44, 2011.

AGUIAR, M.; HURST, E. Consumption versus expenditure. **Journal of Political Economy**, v. 113, n. 5, p. 919-948, 2005.

ALMASIOVA, V.; HOLOVSKA, K.; TARABOVA, L.; CIGANKOVA, V.; LUKACINOVA, A.; NISTIAR, F. Structural and ultrastructural study of the rabbit testes exposed to carbamate insecticide. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 47, n. 9, p. 1319-1328, 2012.

ALVARENGA, M. A., & PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil **Brasileira de Reprodução Animal**, p. 204-209, 2009.

ALVES, M. B. R. **Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-18092014-112108/pt-br.php>

ALVES, M. B. R.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; OLIVEIRA, B. M. M.; TORRES, M. A.; LANÇONI, R.; RAVAGNANI, G. M.; PRADO FILHO, R. R.; VELLONE, V. S.; LOSANO, J. D.; FRANCI, C. R.; NICHI, M.; CELEGHINI, E. C. C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 795-805. e2, 2016.

ARCHBALD, L.; GRONWALL, R. R.; PRITCHARD, E. L.; TRAN, T. Acrosome reaction and concentration of prostaglandin E2 in semen of rams treated with flunixin meglumine (Banamine). **Theriogenology**, v. 33, n. 2, p. 373-383, 1990.

ARMENGOL, M. F. L.; RUBIO, N.; SABINO, G. A.; BÉRGAMO, N. S.; PELUFO, V. Microscopic sperm head damage and abnormalities as heat stress indicators in Australian Merino rams (*Ovis aries*) in Northern Patagonia, Argentina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 1, p. 1-11, 2018.

ARMENGOL, M.F.L.; SABINO, G.A.; FORQUERA, J.C.; CASA, A.D.L.; AISEN, E.G. Sperm head ellipticity as a heat stress indicator in Australian Merino rams (*Ovis aries*) in Northern Patagonia, Argentina. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 553-559. e2, 2015.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. D. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

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

BARROS, M. B. D. A.; FRANCISCO, P. M. S. B.; ZANCHETTA, L. M.; CÉSAR, C. L. G. Tendências das desigualdades sociais e demográficas na prevalência de doenças crônicas no Brasil, PNAD: 2003-2008. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 3755-3768, 2011.

BASILE, R. C. **Metodologia de avaliação e análise de termografia em equinos**. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/118231>>.

BICUDO, S. D.; SIQUEIRA, J. B.; MEIRA, C. Patologias do sistema reprodutor de touros. **Biológico, São Paulo**, v. 69, n. 2, p. 43-48, 2007.

BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. J.; WEDD, S. R. Sweat glands of the scrotum of the bull. **Reproduction**, v. 83, n. 2, p. 673-677, 1988.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de

metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-14, 2011.

BRITO, L. F.; SILVA, A. E.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 511-528, 2004.

BRITO, L. F.; SILVA, A. E.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 1-2, p. 1-15, 2003.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.

CAPRARO, G. A.; COUGHLIN, B. F.; MADER, T. J.; SMITHLINE, H. A. Testicular cooling associated with testicular torsion and its detection by infrared thermography: an experimental study in sheep. **The Journal of Urology**, v. 180, n. 6, p. 2688-2693, 2008.

CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; OLIVEIRA, R. V.; PESSOA, A. W. P.; ARAÚJO, A. A.; NUNES, J. F. Ultrassonografia testicular em caprino com degeneração testicular associado a lesões escrotais: Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 1, p. 54-72, 2014.

COELHO, L. D. A.; SASA, A.; BICUDO, S. D.; BALIEIRO, J. C. C. Concentrações plasmáticas de testosterona, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) em bodes submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1338-1345, 2008.

COLLIER, R. J.; COLLIER, J. L.; RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H. Invited Review: genes involved in the bovine heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 445-454, 2008.

COULTER, G. H.; SENGER, P. L.; BAILEY, D. R. C. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. **Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 417-423, 1988.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G. S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 187-192, 2012.

DAMACENA, G. H. S.; DE SOUZA, D. G.; BACH, R. A.; MARCHIORI, L. M. Associação da termografia e ultrassonografia testicular no exame andrológico de touros. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 26, n. SI, p. 22-23, 2019.

ERICSSON, S. A.; GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; DOWNING, T. W.; MARSHALL, C. E. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, n. 5, p. 1009-1024, 1993.

EVANS, G. & Maxwell, W. C. **Salamons' artificial insemination of sheep and goats**. Butterworths, 1987.

FAO. **How to feed the world in 2050**. p. 1-50, 2009.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1560-1568, 2008.

GAETH, A. P.; SHORT, R. V.; RENFREE, M. B. The developing renal, reproductive, and respiratory systems of the African elephant suggest an aquatic ancestry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5555-5558, 1999.

GARCIA, A. R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

GARCIA-OLIVEROS, L. N.; DE ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L. Efeitos do estresse térmico nas células espermáticas bovinas: uma abordagem cronológica para os

primeiros achados. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, p. 1367–1378, 2020.

GAZVANI, M. R.; WOOD, S. J.; THOMSON, A. J.; KINGSLAND, C. R.; LEWIS-JONES, D. I. Assessment of testicular core temperatures using microwave thermography. **Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 1723-1726, 2000.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445-457, 2005.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: book 1, fundamentals. **Cross Plains**, WI: Equiservices Publishing, 94-95, 1995.

GINTHER, O. J. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography. Book 4. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 2007.

GLOVER, G.; SELLARS, C. M. Recovery and recrystallization during high temperature deformation of α -iron. **Metallurgical Transactions**, v. 4, n. 3, p. 765-775, 1973.

GONZAGA, V. H. G. **Degeneração testicular em touros: alterações espermáticas e sua relação com a termodinâmica e hemodinâmica testicular**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-20022018-123207/pt-br.php>

GONZALEZ, C. I. M. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” de sêmen ovino (Ovis aries) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes diluidores**. Tese de doutorado. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1996.

HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341-3350, 2009.

HEDIA, M. G.; EL-BELELY, M. S.; ISMAIL, S. T.; & EL-MAATY, A. M. A. Monthly changes in testicular blood flow dynamics and their association with testicular

volume, plasma steroid hormones profile and semen characteristics in rams. **Theriogenology**, v. 123, p. 68-73, 2019.

JUNIOR, F. A. B. Termografia infravermelha e ultrassonografia Doppler na avaliação dos efeitos da insulação escrotal sobre a dinâmica do fluxo sanguíneo escrotal em touros. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 15, n. Supl 2, p. 329, 2017.

KASTELIC, J. P. Scrotal/testicular thermoregulation in the bull. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 1, p. 87-101, 1999.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; SAACKE, R. G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 935-942, 1996.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; PIERSON, R. A.; COULTER, G. H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 2, p. 111, 2001.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. Byrne; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, n. 4, p. 255-261, 1997.

KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H.; COOK, R. B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. **Theriogenology**, v. 44, n. 1, p. 147-152, 1995.

KASTELIC, J. P.; WILDE, R. E.; RIZZOTO, G.; THUNDATHIL, J. C. Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. **Veterinárni Medicína**, v. 62, n. 8, p. 437-442, 2017.

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.

KLEISNER, K.; IVELL, R.; FLEGR, J. The evolutionary history of testicular externalization and the origin of the scrotum. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 1, p. 27-37, 2010.

KUMAR, D.; NAQVI, S. M. K. Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 1-6, 2014.

LAGERLOF, N. Infertility in male domestic animals. **Veterinary Medicine**, v. 33, p. 550-561, 1938.

MAGALHÃES, K. A.; MARTINS, E. C.; DE LUCENA, C. C.; HOLANDA FILHO, Z. F. Panorama da ovinocultura e da caprinocultura a partir do Censo Agropecuário 2017. **Sobral, CE: Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2018.

MAIA, M. D. S.; BICUDO, S. D.; SICHERLE, C. C.; RODELLO, L.; GALLEGOS, I. C. S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1-2, p. 118-123, 2010.

MAIA, M. da S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária. 6. Seminário nordestino de caprino-ovino-cultura, 7. Recife. Saúde animal e produção sustentável no Nordeste: desafios e inovações tecnológicas. Recife: CRMV-PE: SPEMVE, 2015.

MARIN, F. R.; PILAU, F. G.; SPOLADOR, H. F.; OTTO, R.; PEDREIRA, C. G. Intensificação sustentável da agricultura brasileira: cenários para 2050. **Política Agrícola**, v. 25, n. 3, p. 108-124, 2016.

MATHUR, A. K. Effect of extension rate on the cryosurvival of ram spermatozoa. **International Journal of Animal Research**, v. 6, n. 1, p. 82-83, 1991.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

Moore, C. R. The biology of the mammalian testis and scrotum. **The Quarterly Review of Biology**, v. 1, n. 1, p. 4-50, 1926.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. D. A. A.; ARAÚJO, A. A. D. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa

Inês criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1704-1711, 2001.

MOULE, G. R.; WAITES, G. M. H. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Reproduction**, v. 5, n. 3, p. 433-446, 1963.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da bolsa escrotal e dos testículos. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**, v. 3, p. 87-97, 2003.

NEPOMUCENO, A. C.; CANOLA, J. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; AVANTE, M. L. Princípios físicos da ultrassonografia e aplicações na reprodução animal. In: FELICIANO, M. A. R.; OLIVEIRA, M. E. F.; VICENTE, W. R. R. **Ultrassonografia na Reprodução Animal**, 2013.

O'MEARA, C. M.; HANRAHAN, J. P.; PRATHALINGAM, N. S.; OWEN, J. S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; LONERGAN, P. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 513-522, 2008.

PARKS, J. E. Hypothermia and mammalian gametes. In: KAROW, A. M.; CRISTSER, J. K. (Eds.). **Reproductive tissue banking, scientific principles**. London: Academic, p.229-261, 1997.

PARMESAN, C. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, p. 637-669, 2006.

PAUL, R. K.; BALAGANUR, K.; KUMAR, D.; SINGH, R. Pre-freezing equilibration for 22 h improves post-thaw sperm functions in cryopreserved ram semen by reducing cholesterol efflux. **Cryobiology**, v. 96, p. 76-84, 2020.

PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 75, n. 1, p. 40-47, 2008.

RAHMAN, M. B.; SCHELLANDER, K.; LUCEÑO, N. L.; VAN SOOM, A. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. **Theriogenology**, v. 113, p. 102-112, 2018.

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1246-1257, 2011.

RIZZOTO, G.; BOE-HANSEN, G.; KLEIN, C.; THUNDATHIL, J. C.; & KASTELIC, J. P. Acute mild heat stress alters gene expression in testes and reduces sperm quality in mice. **Theriogenology**, v. 158, p. 375-381, 2020.

ROJAS-DOWNING, M. M.; NEJADHASHEMI, A. P.; HARRIGAN, T.; WOZNICKI, S. A. Climate change and livestock: impacts, adaptation, and mitigation. **Climate Risk Management**, v. 16, p. 145-163, 2017.

ROSEGRANT, M. W.; RINGLER, C.; ZHU, T. Water for agriculture: maintaining food security under growing scarcity. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 205-222, 2009.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C.; FIRTH, J. H. Fertility of ram semen after storage at 5 C. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 4, p. 373-385, 1979.

SARTORI, R.; PRESTES, N. C.; CANAVESSI, A. M. O.; KEMPINAS, W. G.; & ROSA, G. J. M. Assessment of ultrasonographic images and gross and microscopic lesions of the testicular biopsy in sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 233-241, 2002.

SENGER, P. L. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions. **Inc. Pullman, WA**, p. 144, 2003.

SETCHELL, B. P. The parkes lecture heat and the testis. **Reproduction**, v. 114, n. 2, p. 179-194, 1998.

SHAHAT, A. M.; RIZZOTO, G.; KASTELIC, J. P. Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality. **Theriogenology**, 2020.

SIEGEL, C. Tumors and tumorlike lesions of the testis: radiologic-pathologic correlation. **The Journal of Urology**, v. 169, n. 4, p. 1599-1599, 2003.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, n. 6, p. 1784-1790, 1966.

SWIERSTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. **The Anatomical Record**, v. 161, n. 2, p. 171-185, 1968.

TAKAHASHI, M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2012.

THORNTON, P. K. Livestock production: recent trends, future prospects. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2853-2867, 2010.

VIEIRA, R. J.; CARDOSO, F. T.; DE AZEVEDO, L. M.; DA CUNHA, L. A.; SALVIANO, M. B. Influência da morfologia escrotal e da época do ano na qualidade do sêmen de caprinos criados no Estado do Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 376-380, 2008.

VIEIRA-NETO, M. F.; SOUZA, C. E. A.; SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. D. Consequências da degeneração testicular por estresse térmico sobre a qualidade do ejaculado de pequenos ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v.29, n.3, p.87-97, 2019.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.

WAITES, G. M. H. Temperature regulation and the testis. **Development, Anatomy, and Physiology**, p. 241-279, 1970.

WAITES, G. M. H.; MOULE, G. R. Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. **Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 213-224, 1961.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the preservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WERDELIN, L.; NILSSONNE, Å. The evolution of the scrotum and testicular descent in mammals: a phylogenetic view. **Journal of Theoretical Biology**, v. 196, n. 1, p. 61-72, 1999.

ZERVOS, I. A.; TSANTARLIOTOU, M. P.; VATZIAS, G.; GOULAS, P.; KOKOLIS, N. A.; TAITZOGLU, I. A. Effects of dietary vitamin A intake on acrosin-and plasminogen-activator activity of ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 129, n. 6, p. 707-715, 2005.

Trabalho científico

Este artigo será submetido à revista THERIOGENOLOGY e encontra-se de acordo com as normais de submissão exigidas (<http://www.elsevier.com/locate/theriogenology>), ISSN 0093-691X ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2020.

CAPÍTULO 2

Impact of testicular heat stress on the kinetics and resistance of ovine
sperm stored at 5 °C

E.S. Rossi¹, G. Rizzoto¹, A.G.R. Pupulim¹, J.C. Carvalho¹, M.B. Almeida¹, P.Z. Rattes¹,
M.B. Teixeira¹, R. Denadai¹, E. Oba¹, J. P. Kastelic², J.C.P. Ferreira^{1*}

¹ Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, FMVZ, UNESP, Rubião Jr. s/n, Botucatu, SP, Brazil 18618-000; ² Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, UCalgary, Calgary, Alb., Canada.

Autor correspondente:

*Departamento de Reprodução Animal e Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo (UNESP), Rua Prof. O Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n, Botucatu, SP, 18618-681, Brasil.

Endereço de e-mail: joao.cp.ferreira@unesp.br (J.C.P. Ferreira).

Abstract

Testicular thermoregulation in rams maintained between 3 and 5 °C lower than body temperature is essential to preserve sperm quality and morphology, enabling the use of semen in reproductive management. The use of biotechnologies, especially refrigerated semen (RS), has grown considerably due to the numerous advantages when compared to frozen semen. However, despite numerous studies with semen biotechnologies that investigate the effects of heat stress (HS) on semen in rams, there are no reports that accompany the post-HS sperm pathophysiology demonstrating the impacts on the quality and resistance of semen stored at 5 °C for 72 hours and, therefore, that justifies the use of RS post-HS. Eight rams approved in andrological examination were used. Pre-ET ejaculates constituted the control group (CO). Testicular temperature was increased by scrotal insulation using disposable diapers and duct tape for 51 h. The scrotal temperature was monitored by infrared thermography and Data logger, confirming the elevation of the scrotal surface temperature $\sim 5.2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ ($P < 0.05$), without affecting body temperature ($P > 0.05$). Ejaculates were collected using artificial vagina on days (D) 7, 14, 21, 28, 35, 47 and 62 post-HS and evaluated in the computerized sperm cell analysis system (CASA) immediately after collection, diluted with BotuBov[®] up to $(400 \times 10^6/\text{mL})$, refrigerated (5 °C) and then evaluated every 0, 12, 24, 36, 48 and 72h. There was an effect of insulation, time and the interaction of insulation vs. time for motile, morphologically normal sperm and refrigeration survival ($P < 0.05$ for each). The deleterious effects were seen between D7 and 47 post-ET, with the kinetic parameters; normal morphology and viability in refrigeration decreasing on average from 90 to 00%; 15 to 55%; 90 to 00% respectively and with plasma membrane defect increasing from 5 to 90% ($P < 0.05$). In conclusion, acute testicular heat stress resulted in irreversible damage to sperm kinetics leading to necropermia and making the use of chilled semen unfeasible. However, the resistance was not impaired, while in the recovery process it was established before the complete return of the parameters evaluated.

Keywords: Heat stress, refrigerated semen, kinetics, biotechnology, thermography, rams.

Introduction

The increases in ambient temperature due to climatic changes has led to worldwide impacts [1,2], being the cattle industry one of the most impacted sectors [3,4]. The main reason for this scenario is the heat stress (HS). An animal is considered to be under heat stress when the ambient temperature exceeds its physiological capability for thermoregulation. The HS, according to the duration of exposure, can be categorized as acute or chronic [5].

In males, HS impairs the testicular thermoregulatory capacity, increasing the testicular temperature that should be 3-5 °C below body core, which is of uttermost need for physiologic spermatogenesis [6,7]. The increase in testicular temperature causes the testicular degeneration, which is characterized by impairment on sperm quality and transient or irreversible infertility or subfertility [8-12]. In tropical or subtropical regions HS is a common cause of ruminant subfertility [13].

The study of the possible utilization of cooled sperm samples is a goal in several reproductive programs in domestic species [14-16]. More specifically in cattle, there are reports of higher conception rates when comparing cooled to frozen-thawed sperm, likely due the higher membrane integrity and cellular viability [17-19].

Compared to frozen-thawed semen operations, artificial insemination with 5 °C cooled semen is the most used biotechnology [20, 21] due to its greater sperm motility and viability [22]. However, several factors can impair the pregnancy rates in cervical AI programs using chilled semen, such as semen quality, management of sires and ewes, seasonality, estrous synchronization protocols, and technical skill of the inseminator [23-26].

Heat shock and structural damages inherent to cryopreservation processes can affect semen quality [27], decreasing its viability; however, such damages are less

severe in cooled than frozen-thawed semen [28]. Although there are studies regarding the impacts of HS on sperm quality and freeze ability in rams [29-31], there are no reports regarding the effects of HS on the viability of sperm undergoing cooled storage (5 °C). Therefore, our objective was to evaluate the impacts of acute HS on the viability of ram sperm stored at 5 °C for 72 h.

Material and methods

The experiment was performed during the sheep reproductive season (May - July) in South America. All the activities performed were approved by the local animal care committee (FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil – permit number 041/2021 - CEUA). Eight mix-bred rams (Santa Inês x Dorper), ~1 yo and 55 kg with body condition score ≥ 3.5 [32], were used.

All rams were allocated in stalls in groups of 2-3, and fed concentrated and hay, according to NRC (1998), with ad libitum access to during water. Immediately before the study, all rams were subjected to a standard breeding soundness evaluation and deemed acceptable according to the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA) [33].

The ambient temperature and relative humidity of air were monitored every 30 minutes throughout the experimental period by data collection systems OTT Hydromet (Lufft OPUS 20 THI – Alemanha, Germany), allocated the stalls. The temperature and humidity index (THI) was calculated using the following: $THI = (0.8 \times Tdb) + [(RH/100) \times (Tdb - 14.4)] + 46.4$; in which Tdb = dry bulb temperature and RH – relative humidity.

To increase the testicular temperature, scrotal insulation was performed [12, 34] (Fig. 1), for 51 h, using a double layer of disposable diapers, which were fixed in the

scrotum using simple skin sutures and covered with silver tape (Silver Taper, Scotch[®], São Paulo, Brasil).

The scrotal surface temperature was measured by a data recording device (HOBO[®], Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) placed between the scrotum and the diapers.

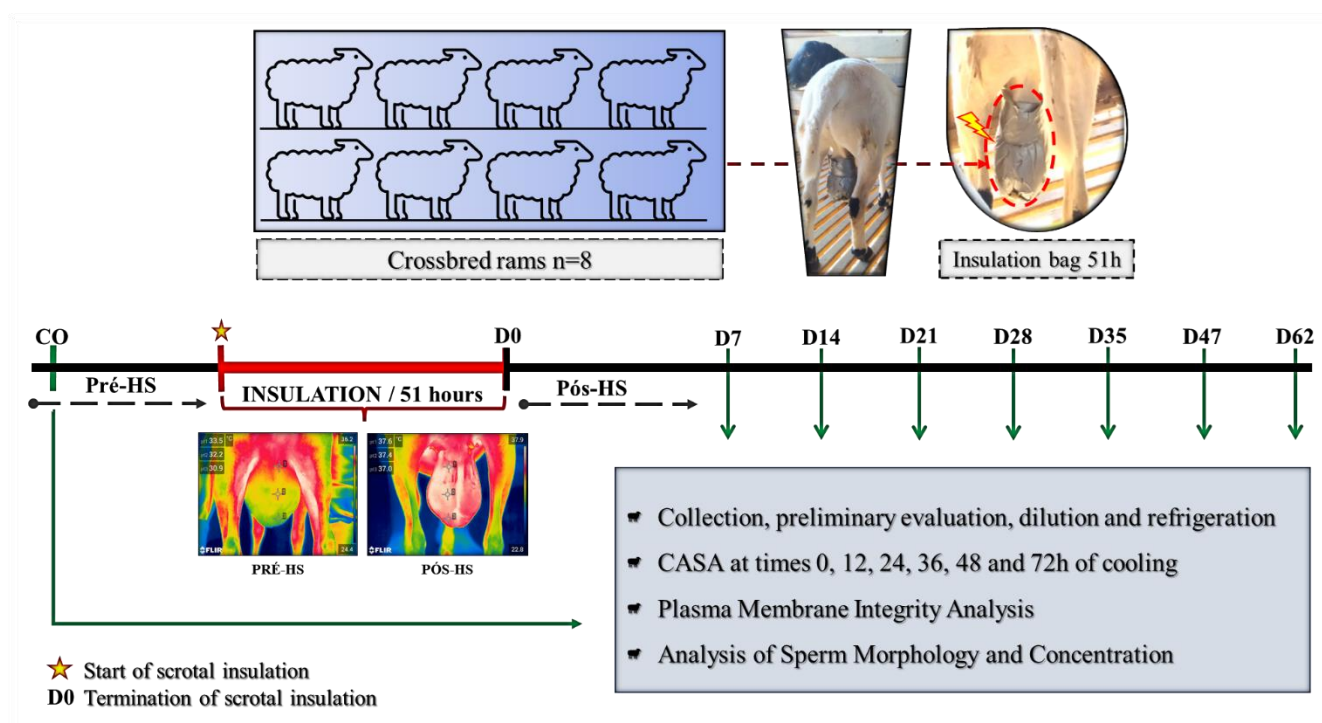


Fig 1. Representative scheme of the experimental design using 8 crossbred rams (Santa Inês vs. Dorper). For each day (control, CO pre-HS and D 7, 14, 21, 28, 35, 47, and 62 days post-HS) the ejaculates were subjectively evaluated (preliminary judgment), diluted (BotuBov[®], final concentration 400×10^6 spermatozoa) /mL; refrigerated at 5 °C and evaluated at times (0, 12, 24, 36, 48 and 72 hours of refrigeration) by Computerized Sperm Analysis (CASA). On the same days of the seminal evaluation, an aliquot of the sample was taken to evaluate the integrity of the plasma membrane and another aliquot for morphological analysis.

Immediately before and after the insulation, scrotal and ocular surface thermograms were performed (Flir E53, MSX[®], Termovisor Brazil[®], Atibaia-SP, Brazil, and the rectal temperature was assessed. The top, middle, and bottom temperatures were recorded in the scrotal thermograms.

Sperm samples were collected through artificial vagina 24 h before the insulation (Control - CO) and at days (D) 7, 14, 21, 28, 35, 47, and 62 posts insulation. The ejaculates were immediately evaluated, processed, and stored at 5 °C, as described below.

In the preliminary assessment, all samples were subjected to subjective evaluation of sperm volume (mL), total motility (%), vigor (0-5), mass sperm motility (0-5), and concentration ($\times 10^6$ spz/mL). Then, the ejaculates were diluted to the final concentration of 400×10^6 spz/mL using a commercial semen extender (BotuBov[®]; Botupharma[®], Botucatu-SP, Brazil), stored at 34 °C for 10 min in water bath, and subjected to sperm kinetics evaluation.

For sperm morphology assessment, a 10 μ L of sperm sample was mixed with 500 μ L of formol-saline 4 % (37 °C) and stored. All samples were evaluated under differential interference contrast microscopy (DIC, Leica[®], Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) (1000x), and 200 cells were ranked as morphologically normal or abnormal [35].

After that, aliquots of 0.5 mL of diluted sperm samples were transferred to 2 mL plastic tubes and transferred to a cooling device [36] previously kept at 34 °C. Then, the cooling device was stored at 5 °C in a controlled temperature fridge (Minitüb 518C[®] - Minitüb do Brasil Ltda). The sperm kinetic parameters were assessed after 12, 24, 36, 48 e 72 h of the start of storage.

All sperm kinetic analyzes were performed using a computed assisted sperm analyzer (CASA; IVOS, version 14, Hamilton-Thorne Bioscience[®], Beverly, MA, EUA; Setup: frames/field: 30; minimum contrast: 60 pixels; minimum size: 6 pixels; linearity: 70%; threshold motile speed: 30 μ m/s; threshold for average minimum speed: 40 μ m/s; threshold for minimum linear speed: 20 μ m/s; head displacement: 90; size of

head: 5 pixels; amplification: 1.95; temperature: 38 °C). The sperm samples were re-diluted to 25×10^6 spz/mL and an aliquot of 10 μ L was placed in a Makler[®] chamber (SEFI Medical Instruments Ltd[®], Haifa, Israel). In each sample 5 fields were randomly analyzed for total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), curvilinear velocity (VCL, μ m/s), average path velocity (VAP, μ m/s), progressive velocity (VSL, μ m/s), rapid (RM, VAP > 75 μ m/s), lateral head displacement (DCL, μ m/s), linearity (LIN), straightness (STR), elongation (ELON, proportion of minor/principal axis x 100), crossed beat frequency (BCF, Hz) and lateral head displacement amplitude (ALH, μ m/s).

Plasma membrane integrity was assessed in slide smears stained by eosin-nigrosin [37,38]. For this evaluation, 10 μ L of sperm sample was mixed with 30 μ L of the stain in a slide. Then, this mixture was spread, dried, and the smear was analyzed under phase-contrast microscopy (1000x; professional series BE3, Motic, Tokyo, Japan). In each smear, 200 cells were randomly assessed.

For this study, a total of two treatments (pre- and post-HS), eight sampling days (CO – pre-insulation and D 7, 14, 21, 28, 35, 47 e 62 posts insulation) and assessments at 0, 12, 24, 36, 48 and 72 h for stored samples at every collection day, were considered for the statistical analyzes. All parameters were analyzed by One-Way repeated measures ANOVA followed by a *post hoc* Tukey test. All statistical analyses were done with GraphPad Prism software, Version 6.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

The average ITU during the experimental period was ~63.61 (Fig. 2). The pre-insulation scrotal surface temperature, assessed by infrared thermography, was higher at

the top vs. the bottom of the scrotum ($P < 0.05$; Fig. 3A). However, no difference was observed at post-insulation time ($P > 0.05$; Fig. 3A). When the three scrotal surface regions were grouped and pre- vs. post-insulation moments were compared, an increase of $\sim 5.2^{\circ}\text{C}$ was detected (30.84 ± 0.27 vs. 35.84 ± 0.03 ; $P = 0.0001$). Furthermore, the average scrotal surface temperature measured by the Data Loggers during the insulation was $35.64 \pm 0.62^{\circ}\text{C}$ (Fig. 3A). Importantly, no difference ($P > 0.05$) was observed for rectal and ocular surface temperature pre- and post-insulation (38.46 ± 0.07 e $37.94 \pm 0.18^{\circ}\text{C}$, respectively).

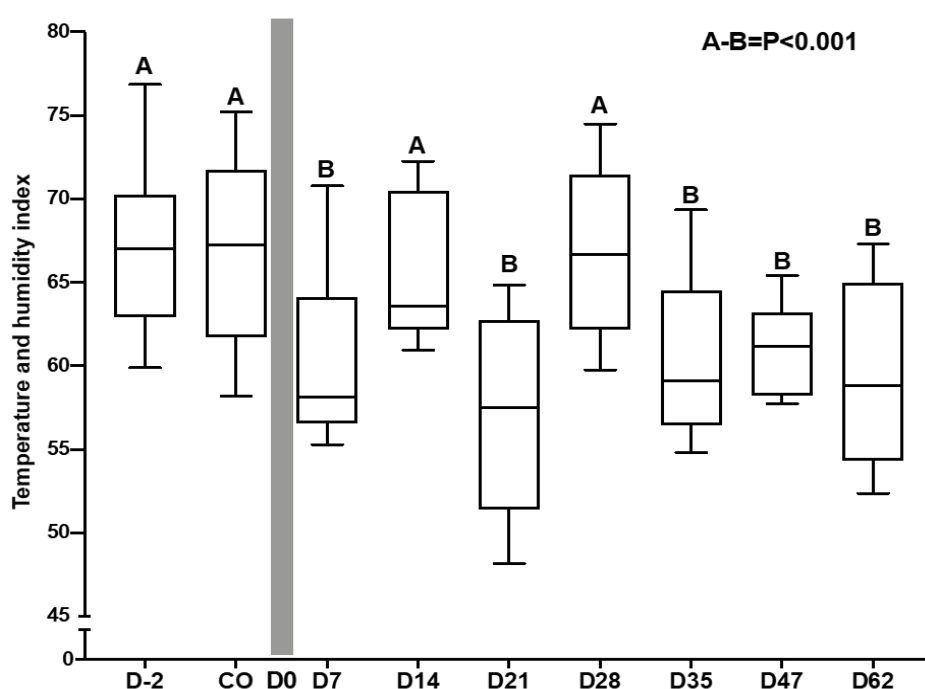


Fig. 2. Mean ($\pm$ SEM) of the Temperature and Humidity Index (TUI) of the environment during the experimental period in crossbred rams (Santa Inês vs. Dorper) subjected to testicular insulation (gray vertical bar = 51 hours). The data record started two days (D) before the insulation (D-2), followed by measuring every 30 min during HS (D0) and D7, 14, 21, 28, 35, 47 and 62 days post-HS.

After the insulation, a significant decrease in TM and PM (%) was observed from D7 onwards ($P < 0.05$), reaching its nadir at D14, D21, D28 and D35 ($P < 0.05$).

On D47, TM and PM increased, reaching values similar to those observed at D7, and at D62, the values reached values similar to CO ($P > 0.05$).

Inversely, an increase in the morphological sperm defects was observed from D7 onwards ($P < 0.05$), with an additional boost at D14 and 21 ($P < 0.05$; Fig. 3C). Although an improvement in sperm morphology started at D28, only at D62 the values were similar to CO ($P > 0.05$).

Similarly, a decrease was observed in sperm concentration for D7 ($P < 0.05$), maintaining similar levels until D47 and reaching similar levels to CO only at D62 ($P < 0.05$).

In addition, the variables regarding the sperm kinetics (VSL, VAP, and VLC) were kept until D7, reducing significantly at D14 ($P < 0.05$), remaining low until D35. An increase then was observed at D47, reaching similar levels to CO and D7 ($P > 0.05$) and remaining high until the completion of the study.

The percentage of membrane integrity (Fig. 3B) decreased in the samples starting at D7 ($P < 0.05$), with a further impairment at D14 ($P < 0.05$), reaching the lowest values at D21-35 ($P < 0.05$). From D47 onwards, an improvement was observed, reaching levels similar to D14 ($P > 0.05$), whereas at D62, the values were not different from the observed at D7 ($P > 0.05$).

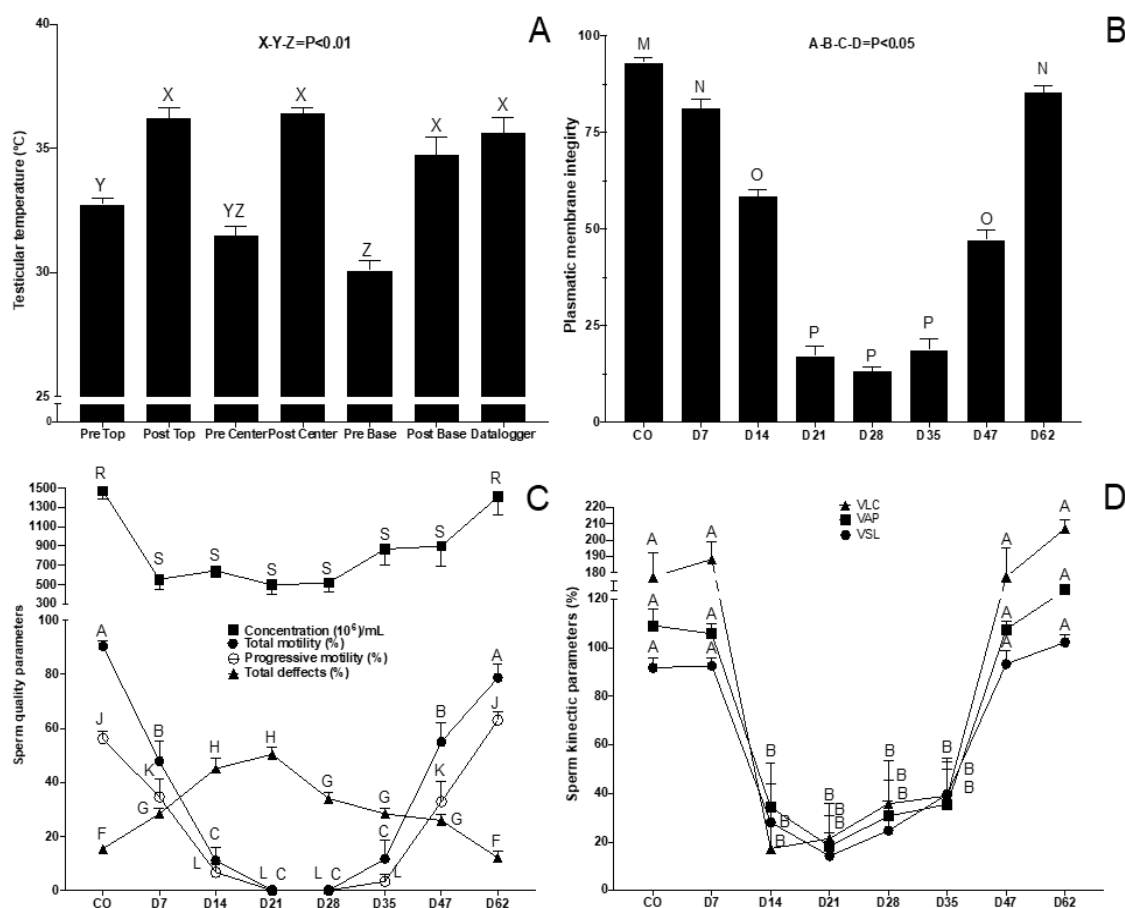


Fig. 3. Mean ($\pm$ SEM) of (A) scrotal surface temperature analyzed by thermography at pre- and post-testicular heat stress (THS) and by datalogger during the THS period (51 hours). The temperature averages analyzed by thermography were divided into top, middle and bottom regions of each scrotal side; (B) plasma membrane integrity of sheep submitted to THS pre- (control, CO) and D7, 14, 21, 28, 35, 47 and 62 days post-THS; (C) sperm quality parameters (concentration, total and progressive motility (%) and total morphological defects) of 8 crossbred rams (Santa Inês vs. Dorper) pre- (control, CO) and post-THS (D7, 14, 21, 28, 35, 47 and 62 days, and (D) sperm kinetics parameters in rams ($n = 8$) submitted to THS for 51 h, different letters indicate statistical significance ($P < 0.05$).

Lastly, as no difference was observed between the sperm kinetics data evaluated between 0-24 or 36-72 h during the 72 h of cooling (Table 1), the data were grouped and averaged. When considering sperm kinetic parameters, starting values followed the same indicated on Fig. 3C and D. Although no impact was observed regarding the time of storage for all parameters at CO, D7, 35, 47, and 62, at D14, an interesting phenomenon was observed where cellular viability reached 0 for all parameters at 36-72h of storage when compared to 0-24 h ($P < 0.05$). Furthermore, at D21 and D28 the

samples were necropermic already at 0h (Fig. 3C) and therefore no changes were observed during storage at 5 °C.

There was no difference when comparing the moments 0-24 h with 36-72 h ($P > 0.05$) of sperm storage at 5 °C for 72 hours, when the sperm kinetics variables (TM, PM, VCL, ALH, LIN, STR, VSL, VAP, BCF and fast spermatozoa) on the Control, D7, D35, D47 and D62 days, although on D7, D35 and D47 the variables were different from those observed on the Control day ($P < 0.05$). On D14, the initial values differed significantly from the Control and D7 days ($P < 0.05$), and storage at 5 °C led to total sperm immobilization ($P < 0.05$). On D21 and D28 the samples were necropermic (Table 1).

Table 1. Mean ($\pm$ SEM) of sperm kinetics of semen stored at 5 °C for 72 hours in different periods and moments of rams submitted to testicular heat stress (THS). Treatment effect and storage time effect were considered when ($P < 0.05$) represented by different letters and *.

		CO	D7	D14	D21	D28	D35	D47	D62
Total motility (%)	0 – 24h	85.7 $\pm$ 1.8 ^A	55.4 $\pm$ 4.8 ^B	5.47 $\pm$ 1.6 ^C	0 ^C	0 ^C	9.4 $\pm$ 2.9 ^C	55.8 $\pm$ 5.1 ^B	85 $\pm$ 2.3 ^A
	36 – 72h	83.1 $\pm$ 1.8 ^A	58.9 $\pm$ 4.5 ^B	0* ^C	0 ^C	0 ^C	7.3 $\pm$ 3.3 ^C	66.1 $\pm$ 3.4 ^B	81.3 $\pm$ 2.4 ^A
Progressive motility (%)	0 – 24h	52.2 $\pm$ 1.4 ^A	37.9 $\pm$ 3.7 ^B	3 $\pm$ 1.1 ^C	0 ^C	0 ^C	2.2 $\pm$ 0.9 ^C	39.5 $\pm$ 2.9 ^B	58.7 $\pm$ 1.8 ^A
	36 – 72h	46.6 $\pm$ 2.8 ^A	30.7 $\pm$ 2.7 ^B	0* ^C	0 ^C	0 ^C	1.6 $\pm$ 1 ^C	43.5 $\pm$ 3.3 ^A	48.2 $\pm$ 1.9 ^A
VCL	0 – 24h	193 $\pm$ 6.1 ^A	198.2 $\pm$ 5.4 ^A	110.4 $\pm$ 20 ^B	0 ^D	0 ^D	37.5 $\pm$ 10.1 ^C	191.4 $\pm$ 7.2 ^A	199 $\pm$ 2.9 ^A
	36 – 72h	189.1 $\pm$ 4.3 ^A	194.3 $\pm$ 4.7 ^A	0* ^B	0 ^B	0 ^B	22.9 $\pm$ 9.3 ^B	182.3 $\pm$ 3.3 ^A	192.6 $\pm$ 4 ^A
ALH	0 – 24h	7.55 $\pm$ 0.24 ^A	8.1 $\pm$ 0.2 ^A	4.3 $\pm$ 1.6 ^B	0 ^B	0 ^B	2.9 $\pm$ 0.8 ^B	8.2 $\pm$ 0.4 ^A	7.7 $\pm$ 0.2 ^A
	36 – 72h	7.7 $\pm$ 0.2 ^A	8.7 $\pm$ 0.2 ^A	0* ^B	0 ^B	0 ^B	2.2 $\pm$ 0.8 ^B	8 $\pm$ 0.3 ^A	8.2 $\pm$ 0.2 ^A
LIN	0 – 24h	49.7 $\pm$ 1.3 ^A	47.9 $\pm$ 1.3 ^A	28.1 $\pm$ 4.9 ^B	0 ^C	0 ^C	32.7 $\pm$ 8.5 ^B	51.7 $\pm$ 2.9 ^A	49.2 $\pm$ 1.3 ^A
	36 – 72h	43.6 $\pm$ 1.9 ^A	43.2 $\pm$ 0.9 ^A	0* ^C	0 ^C	0 ^C	19.5 $\pm$ 7.1 ^B	44.5 $\pm$ 1.5 ^A	43.2 $\pm$ 1.1 ^A
STR	0 – 24h	80.1 $\pm$ 3.3 ^A	83.5 $\pm$ 0.9 ^A	50.9 $\pm$ 8.4 ^B	0 ^C	0 ^C	35.9 $\pm$ 9.3 ^B	83.53 $\pm$ 1.7 ^A	81.1 $\pm$ 1.2 ^A
	36 – 72h	76 $\pm$ 1.6 ^A	78.4 $\pm$ 0.8 ^A	0* ^C	0 ^C	0 ^C	22.3 $\pm$ 7.9 ^B	78.8 $\pm$ 1.6 ^A	76.1 $\pm$ 1 ^A
VAP	0 – 24h	110.7 $\pm$ 2.9 ^A	108.6 $\pm$ 2.9 ^A	60.5 $\pm$ 10.4 ^B	0 ^C	0 ^C	33.7 $\pm$ 9.1 ^B	105.9 $\pm$ 2.2 ^A	115 $\pm$ 1.6 ^A
	36 – 72h	106.3 $\pm$ 2.6 ^A	102.2 $\pm$ 2.6 ^A	0* ^C	0 ^C	0 ^C	21.6 $\pm$ 7.7 ^B	97.9 $\pm$ 1.9 ^A	106 $\pm$ 1.8 ^A
VSL	0 – 24h	90.61 $\pm$ 2.9 ^A	90.4 $\pm$ 2.5 ^A	51.5 $\pm$ 9.1 ^C	0 ^C	0 ^C	25.9 $\pm$ 7.5 ^B	89.5 $\pm$ 3.15 ^A	94.5 $\pm$ 8.9 ^A
	36 – 72h	85.1 $\pm$ 4.9 ^A	79.6 $\pm$ 2.3 ^A	0* ^B	0 ^B	0 ^B	16.82 $\pm$ 6.2 ^B	78.5 $\pm$ 2.5 ^A	81.4 $\pm$ 10 ^A
BCF	0 – 24h	35.1 $\pm$ 0.6 ^A	34.3 $\pm$ 0.7 ^A	12.1 $\pm$ 2.6 ^B	0 ^C	0 ^C	2.5 $\pm$ 0.5 ^C	31.4 $\pm$ 1.2 ^A	32.1 $\pm$ 0.7 ^A
	36 – 72h	32.7 $\pm$ 0.8 ^A	30.8 $\pm$ 0.6 ^A	0* ^B	0 ^B	0 ^B	2 $\pm$ 0.7 ^B	30.5 $\pm$ 0.9 ^A	29.7 $\pm$ 0.8 ^A
RAP	0 – 24h	67.88 $\pm$ 3.2 ^A	45.4 $\pm$ 5 ^A	13.6 $\pm$ 3.2 ^C	0 ^B	0 ^C	12.2 $\pm$ 5.1 ^C	50.3 $\pm$ 4.6 ^A	77.2 $\pm$ 2.3 ^A
	36 – 72h	66.3 $\pm$ 3.3 ^A	43.7 $\pm$ 5.5 ^A	0* ^B	0 ^B	0 ^B	8.4 $\pm$ 4.4 ^B	56.5 $\pm$ 3.3 ^A	70.7 $\pm$ 2.2 ^A

Different letters indicate difference within the line (day of collection) $P < 0.05$; Asterisk (*) indicate difference ($P < 0.05$) between 0-24 and 36-72 h of storage for each respective variable.

Discussion

Scrotal insulation, a validated model to mimic the HS effects on testes function [7], was used successfully in this study to increase scrotal temperature causing a profound impact on sperm function. The infrared thermography was a practical way to monitor the scrotal surface temperature. Considering the data from infrared thermograms and Data Loggers, the insulation caused an increase of $\sim 5.2^{\circ}\text{C}$ in the scrotal surface temperature, with no increase of rectal and ocular surface temperature. Considering that the intratesticular temperature is $\sim 4.5^{\circ}\text{C}$ superior to the scrotal temperature [39], it's possible to infer that in our study, intratesticular temperature was roughly 40.2°C .

The first deleterious impacts derived from increased intratesticular temperature on the sperm quality, were at first observed at D7, when a significant decrease in total and progressive motility, as well as sperm concentration and percentage of morphologically normal cells. At this moment, the ejaculated sperm were the cells presented in the epididymis at the time of testicular insulation, since the epididymal transit is $\sim 10.4\text{d}$ [40] The most common morphological abnormalities observed at D7 were cytoplasmic droplet, tail tightly bent/curled, curled on tail of head (CO = 9% e D7 = 19% - data not presented). In addition, at D7, increased lesions in sperm membrane were observed.

The majority of the studies related to testicular insulation in rams, independently of time of exposure, presented important reduction in sperm quality between 4 -10 d from the start of insulation (e.g., decrease in total motility and %RAP, as well as

increase in abnormal morphology rates) [41-43], similar results were also observed for animals exposed to increased ambient temperatures in bioclimatic chambers [44]. On the other hand, for *B. taurus* [45,46] and *B. indicus* [45], independently of the time of insulation, the first signs of reduction in sperm quality were only observed between 9 and 18d after the start of insulation. Taken together, these findings indicate a higher sensibility for the epididymal sperm in rams when compared to bulls.

The complete absence of sperm motility from D21 onwards, in association with the decrease of morphologically normal cells starting at D14 and the drastic reduction in sperm concentration from D7 onwards, indicate the severity of the impacts of HS on the spermatogenesis in rams. The findings reported are similar to the observed in other studies in which the insulation led to an increase of 4 and 5.7 °C in the scrotal surface temperature, respectively [41,43]. However, in few other studies, the impact in sperm cells was more subtle [47,13]. This difference probably reflects the efficiency of the insulation method, hence in one of the studies, the increase in temperature was only of 1.68 °C [47]. Importantly, the increased incidence of defects observed in the 14-21d interval post-insulation reflects the impact of HT on spermiogenesis [10].

The physiological spermatogenesis takes ~47d [40]. The first sign of sperm quality recovery in our study was the reduction of the cells with defects from D28 onwards, followed by the increase in TM, PM, VSL, VAP and VSC from D47 onwards. The recovery of the sperm quality to pre-insulation levels was only observed on D47 for VSL, VAP and VCL, and on D62, For TM and PM. However, until the end of the sampling, the results for membrane integrity were not recovered. In comparison with other studies, the recovery of sperm quality was either after [13,18] or even before the data herein described [41,43]. The comparison of the findings of this study with other

manuscripts clearly indicates that earlier sperm quality recoveries are directly related to exposure to lesser scrotal surface temperatures $\sim 32\text{-}33^\circ\text{C}$ [47,18], while longer recovery times were associated with exposure to higher temperatures $\sim 38^\circ\text{C}$ [41,43].

In general, the effects of the testicular heat stress on the sperm characteristics described in our study were similar to other reports, which indicated a lack of sperm motility between 12 and 21d post-insulation [41-43], increased plasma membrane damage from 15d onwards, as well as azoospermia from 18d onwards [41]. Our findings in association with the data available in the literature reflect the extreme sensibility of spermatocytes and spermatids to testicular HS, hence the cells match the spermatogenic cycle interval evaluated in the study [48].

The storage at 5°C is an important biotechnological resource to preserve sperm for longer periods [49]. In the present study, considering the collected samples before the scrotal insulation as well as the harvested on D47 and 62, the storage of sperm extended with commercial media containing 20% egg yolk and 8% glycerol for 72h at 5°C did not impact the sperm kinetic parameters studied (TM, PM, VLC, VAP, VSL, ALH, LIN, STR, BCF e RAP), similarly to the observed in studies that used medias containing TES-TRIS + 10% egg yolk [22] and TRIS + methionine + 15% egg yolk [50], where no differences in TM was observed after 96h of storage at 5°C . However, our results were superior to those observed in other models, which have used media containing a Triladyl + 20% egg yolk [51], Tris + fructose + 20% egg yolk [52], or sodium citrate + 20%egg yolk [53]. In these studies, the reduction of quality was observed already at 72 h at storage at 4°C .

An important difference between the extender used in our study when compared to the other publications is the presence of glycerol (8%). Although the cryoprotectant

aspect of glycerol has been known for more than 70 years [54], there's not much information about its effect on sperm cells under refrigerated storage. Although the cytotoxic potential is described for glycerol under long-exposure time [55], reports have indicated potential energetic contribution to the sperm metabolism [56,57]. Recent studies have indicated that the presence of glycerol in the extender increased the time of storage at 5 °C for sperm in bull and rams, respectively [58,59], besides increasing pregnancy rate for cooled bovine sperm [60]. The presence of glycerol in the extender used in our study could have impacted the sperm quality during storage at 5 °C; however, as there was no experimental control in that regard, the statement is only speculative.

Although TM and PM were already decreased at D7 post-insulation, the storage of sperm cells for 72 h at 5 °C did not cause any further decrease in these variables. The same was also observed at D47 when the TM and PM started to increase. Due to the sperm on D7 and D47 post-HS have presented sperm motility results similar to the acceptable in a breeding soundness examination and the good resistance to the storage process, it's possible that the samples could be used in an artificial insemination protocol. Since the sperm were exposed to stress during storage and transit in the epididymis, the cells will bear concerns about the genetic health of the offspring [61], therefore it's possible to infer that the utilization of sperm samples from animals in early stages or recovering from HS exposure, even though presenting reasonable gross quality, similarly to the observed in our study, has the potential to negatively impact fertility and health of the progeny.

At the moment of lowest TM (D14), which preceded the establishment of necropermic (D21 and D28), the sperm cells didn't resist the storage at 5 °C for 72h,

and at the end of the experimental interval, no moving cell was observed. On D35, although the low motility rate ($\sim 9.4\%$), the majority of sperm parameters were maintained throughout the 72h of storage, with the exception being VCL, BCL, and RAP. This result likely reflects the surge of a new generation of cells, which were less impacted by HS and that at the moment of insulation, were undergoing the final mitotic steps (primary spermatocytes) [62].

The extreme increase in testicular temperature ($\sim 5.2^\circ\text{C}$) induced by the insulation method employed in the present study, led to a rapid deterioration of the sperm quality, culminating in necrospermic between 21 and 28d post-insulation, and was followed by the progressive recovery in sperm quality until normospermia was reached at D62. However, besides the important decrease in total and progressive motility observed on D7 post-insulation, the resistance of the cells to the 5°C storage was not impacted. During the recovery of the HS impacts, the resistance to storage was re-established even before the normospermia was regained.

Lastly, this study answers important questions, explaining for the first time, the impacts of HS in storage sperm at 5°C , supporting the utilization of this biotechnology in breeding programs, however, there's a need to further elucidate possible genetic and epigenetic risks for the offspring, which can derive from the utilization of the sperm samples on the fewer days after or during the recovery post-HS exposure.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

We thank Drs. Sony Dimas Bicudo, Rubens Paes de Arruda, Lindsay Unno, and André Crespilho for their suggestions for this research project.

Financial support

This study was supported by CAPES – Code 001, CNPQ, FAPESP (scholarship n° 2018/02007-6); Botupharma® and FMVZ/Unesp - Botucatu-SP

References

- [1] Smoyer-Tomic KE, Kuhn R, Hudson A. Heat wave hazards: an overview of heat wave impacts in Canada. *Nat Hazards* 2003;28:465e86.
<https://doi.org/10.1023/A:1022946528157>.
- [2] Bell ML, O’neill MS, Ranjit N, Borja-Aburto VH, Cifuentes LA, Gouveia NC. Vulnerability to heat-related mortality in Latin America: a case –crossover study in Sao Paulo, Brazil, Santiago, Chile and Mexico City, Mexico. *Int J Epidemiol* 2008;37:796–804. <https://doi.org/10.1093/ije/dyn094>.
- [3] Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Onlin* 2015;30:14–27. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.018>.
- [4] Rahman MB, Schellander K, Luceño NL, Soom AV. Heat stress responses in spermatozoa: mechanisms and consequences for cattle fertility. *Theriogenology* 2018;113:102–112. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.012>.
- [5] Setchell BP, Waites GM, Thorburn GD. Blood flow in the testis of the conscious ram measured with krypton 85. *Circ Res* 1966;18:755e65. <https://doi.org/10.1161/01.RES.18.6.755>.
- [6] Kastelic JP, Coulter GH, Cook RB. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology* 1995;44:147–152. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00155-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00155-2).
- [7] Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH, Saacke RG. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. *Theriogenology* 1996;45:935–42. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00023-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00023-4).
- [8] Skinner JD, Louw GN. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J Appl Physiol* 1966;21:1784e90. <https://doi.org/10.1152/jappl.1966.21.6.1784>.
- [9] Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Unanian MM, Kastelic JP. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. *Anim Reprod Sci* 2003;79:1–15. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00082-4).
- [10] Rahman MB, Vandaele L, Rijsselaere T, Maes D, Hoogewijs M, Frijters A, et al. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology* 2011;76:1246–57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.031>.
- [11] Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Imtiwati KR. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: a review. *Vet World* 2016;9:260–268. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268>.
- [12] Kastelic J, Wilde R, Rizzoto G, Thundathil J. Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. *Vet Med (Praha)* 2017;62:437–42. <https://doi.org/10.17221/124/2016-VETMED>.

- [13] Takahashi M. Estresse térmico na função reprodutiva e fertilidade em mamíferos. *Reprod Med Biol* 2012;11:37–47. <https://doi.org/10.1007/s12522-011-0105-6>.
- [14] Hochereau-de Reviers MT, Locatelli A, Perreau C, Pisselet C, Setchell BP. Effects of a single brief period of moderate heating of the testes on seminiferous tubules in hypophysectomized rams treated with pituitary extract. *Reproduction* 1993;97:381–387. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0970381>.
- [15] Setchell, BP. The parkes lecture heat and the testis. *Reproduction* 1998;114:179–194. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1140179>.
- [16] Zhu B, Walker SK, Oakey H, Setchell BP, Maddocks S. Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia* 2004;36:384–394. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2004.00635.x>.
- [17] Wettemann RP, Desjardins C. Testicular function in boars exposed to elevated ambient temperature. *Biol Reprod* 1979;20:235–241. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.2.235>.
- [18] Alves MBR, Andrade AFC, Arruda RP, Batissaco L, Florez-Rodríguez SA, Oliveira BMM, Celeghini, ECC. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. *Theriogenology* 2016;86:795–805. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.034>.
- [19] Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril* 2008;90:716–1722. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.007>.
- [20] Crespilho AM, Nichi M, Guasti PN, Freitas-Dell'Aqua CP, Sá Filho MF, Maziero RR et al. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Anim Reprod Sci* 2014;146:126–133. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.020>.
- [21] O'Hara JP, Hanrahan L, Richardson AD, Fair ACO, Evans P. Lonergan, Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm, *Theriogenology* 2010;73:4,541-549. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009>.
- [22] Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Tamayo-Canul J, López-Urueña E, de Paz P, Anel L, Alvarez M. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Anim Reprod Sci* 2014;151(3-4), 137-147. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.006>.
- [23] Anel L, De Paz P, Alvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, Anel E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* 2003; 60:7, 293-1308. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00140-7).
- [24] Anel L, Alvarez M, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Anel E, & De Paz P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod Domest Anim*. 2006; 41:1,30-42. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00767.x>.
- [25] David I, Robert-Granié C, Manfredi E, Lagriffoul G, & Bodin L. Environmental and genetic variation factors of artificial insemination success in French dairy sheep. *Animal*. 2008;2:7,979-986. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002152>.
- [26] Fukui Y, Kohno H, Okabe K, Katsuki S, Yoshizawa M, Togari T, & Watanabe H. Factors affecting the fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen-thawed semen during the non-breeding season. *J Reprod Dev* 2010;1005270276-1005270276 <https://doi.org/10.1262/jrd.10-015T>.
- [27] Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, & Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm

membrane. *Biol Reprod* 2000;63:5,1531-1537.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1531>.

[28] Maxwell WM, & Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review.

Reprod Fertil Dev 1993;5:6,613-638. <https://doi.org/10.1071/RD9930613>.

[29] Mieusset R, Casares PQ, Sanchez-Partida LG, Sowerbutts SF, Zupp JL, & Setchell BP. The effects of moderate heating of the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on body temperature, respiratory rate, spermatozoa output and motility, and on fertility and embryonic survival in ewes inseminated with frozen semen. *Ann N Y Aca. Sci* 1991;637:1,445-458. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb27329.x>

[30] Mieusset R, Casares PQ, Partida LS., Sowerbutts SF, Zupp JL, & Setchell BP. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *Reprod* 1992;94:2,337-343. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940337>.

[31] Mieusset R, & Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995;18:4,169-184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1995.tb00408.x>.

[32] Kenyon, PR, Maloney SK, & Blache D. Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. *N Z J Agric Res* 2014;57:1,38-64.

<https://doi.org/10.1080/00288233.2013.857698>.

[33] Animal, CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, CBRA, 1998. 2013.

[34] Rizzoto G, Hall C, Tyberg JV, Thudathil JC, Caulkett NA, Kastelic JP. Testicular hyperthermia increases blood flow that maintains aerobic metabolism in rams. *Reprod Fertil Dev* 2019;31:683e8. <https://doi.org/10.1071/RD17509>.

[35] Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med* 1973;25:383–91.

<https://10024782118>.

[36] Bicudo SD, Paschoal JPS, Ribeiro EFR, Papa FO. Dispositivo de incubação para o resfriamento de sêmen em pequenos volumes. *Rev Bras Reprod Anim* 1991;2:456.

<http://www.cbra.org.br/>.

[37] Swanson EW, Bearden HJ. An eosin/nigrosin stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J Anim Sci* 1951;10:981–987. <https://doi.org/10.2527/jas1951.104981x>.

[38] Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod* 2003;18:813–816. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg199>.

[39] Coulter GH, Senger PL, Bailey RC. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. *J Reprod Fertil* 1988;84:417–23. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840417>.

[40] Hochereau-de Reviers MT, Monet-Kuntz C, Courot M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *Reprod Fertil Suppl* 1987;34:101–14. <https://www.bioscioproceedings.org/bp/0009/pdf/bp0009rdr9.pdf>.

[41] Ibrahim NM, Romano JE, Troedsson MH, & Crabo BG. Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. *J Androl* 2001;22:5,863-877. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02592.x>.

[42] Arman C, Quintana Casares PI, Sanchez-Partida LG, Setchell BP. Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. *Asian J Androl* 2006;8:411–8. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00145.x>.

[43] Rocha DR, Martins JAM, Van Tilburg MF, Oliveira RV, Moreno FB, Monteiro-Moreira ACO & Moura AA. Effect of increased testicular temperature on seminal

plasma proteome of the ram. *Theriogenology* 2015;84:8,1291-1305.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.008>.

[44] Shahat AM, Thundathil JC, & Kastelic JP. Scrotal subcutaneous temperature is increased by scrotal insulation or whole-body heating, but not by scrotal neck insulation; however, all three heat-stress models decrease sperm quality in bulls and rams. *J Therm Biol* 2021;100:103064. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103064>.

[45] Vogler CJ, Bame JH, DeJarnette JM, McGilliard ML & Saacke RG. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology* 1993;40:6,1207-1219. <https://doi.org/10.1016/0093-691X%2893%2990291-C>.

[46] Arteaga AA, Barth AD, & Brito LF. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology* 2005;64:2,408-415.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.12.008>.

[47] Hamilton TRDS, Mendes CM, Castro LSD, Assis PMD, Siqueira AFP, Delgado JDC, Assumpção MEODÁ. Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. *Oxid Med Cell Longev* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1687657>.

[48] Senger PL. Endocrinology of the male and spermatogenesis. In: Senger PL (ed.): *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Cadmus Professional Communications, United States of America 2003;214–239.

[49] Bicudo SD, Sousa DB, Takada L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Rev bras reprod anim supl* 2003;27:120–126.

<http://www.cbra.org.br/>.

[50] Bucak MN, Çoyan K, Öztürk C, Güngör Ş, & Ömür AD. Methionine supplementation improves ram sperm parameters during liquid storage at 5 C. *Cryobiology* 2012;65:3,335-337. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.09.002>.

[51] Al-Mutary MG, Al-Ghadi MQ, Ammari AA., Al-Himadi AR, Al-Jolimeed AH., Arafah MW & Swelum AAA. Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5° C for up to 168 h. *Theriogenology* 2020;152,139-146.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.001>.

[52] Rather HA., Islam R, Malik AA, & Lone FA. Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4 C. *Small Rumin Res* 2016;141,24-28. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.06.007>.

[53] Fang YI, Zhong R, Chen L, Feng C, Sun H, & Zhou D. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. *Small Rumin Res* 2015;130,178-182.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.05.016>.

[54] Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164:666.

<https://doi.org/10.1038/164666a0>.

[55] Borges-Silva JC, Silva MR, Marinho DB, Nogueira E, Sampaio DC, Oliveira LOF et al. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:1004–1008. <https://doi.org/10.1071/RD14185>.

[56] Mann T, White IG. Metabolism of glycerol, Sorbitol and related compounds by spermatozoa. *Nature* 1956;178:142–143. <https://doi.org/10.1038/178142b0>.

- [57] Mohri H, Masaki J. Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1967;14:179–94.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0140179>.
- [58] Crespilho AC, Papa FO, Dell'Aqua Jr JA, Zahn F, Martins Jr A, Araujo GHM, et al. Effect of glycerol concentration on the motility and viability of cooled–stored ram semen. *Reprod Dom Anim* 2008;43:73–4. <http://hdl.handle.net/11449/14584>.
- [59] Crespilho AM, Papa FO, Santos MDP, de Sa Filho MF. Use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed–time artificial insemination programs—case report. *Am J Anim Vet* 2012;7:175–179.
<http://dx.doi.org/10.3844/ajavsp.2012.175.179>.
- [60] Papa PM, Maziero RD, Guasti PN, Junqueira CR, Freitas–Dell'Aqua CP, Papa FO, et al. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology* 2015;83:107–113.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.009>.
- [61] Paul N, Talluri TR, Nag P, Kumaresan A. Epididymosomes: A potential male fertility influencer. *Andrologia* 2021;53:9:e14155. <https://doi.org/10.1111/and.14155>.
- [62] Dawson RMC. The labelling of ram semen in vivo with radioactive phosphate and [carboxy-14C] stearic acid. *Biochem J* 1958;68:3,512.
<https://dx.doi.org/10.1042%2Fbj0680512>.