

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

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

ANTÔNIO GUILHERME RONCADA PUPULIM

Botucatu - SP

Setembro 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

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

ANTÔNIO GUILHERME RONCADA PUPULIM

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

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Co-Orientador: John Patrick Kastelic

Botucatu - SP

Setembro 2022

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pupulim, Antonio Guilherme Roncada.

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

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

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Coorientador: John Patrick Kastelic

Capes: 50504037

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

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

Antônio Guilherme Roncada Pupulim

Data da defesa: 30/09/2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ- UNESP-Botucatu

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Membro titular

Departamento de Clínicas Veterinárias

UEL – Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Camila de Paula Freitas Dell’Aqua

Membro titular

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal

FMVZ-UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro Titular

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ- UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro

Membro Titular

Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte

IZ - Fazenda Experimental de Sertãozinho

DEDICATÓRIA

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

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

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

Ao dom da vida concedida a mim.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

CAPÍTULO 1

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

2. Objetivos

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho é apresentar eventos relacionados ao desenvolvimento e morfologia testicular, os principais métodos de avaliação andrológica e testicular e algumas relações entre inflamação local e função testicular.

2.2 Específico

Validar a técnica de biópsias sequenciais como modelo experimental e seus impactos no perfil transcricional de genes envolvido no estresse oxidativo, térmico, inflamação e esteroidogênese, qualidade seminal e nos achados ultrassonográficos.

3. Hipótese

A realização de biópsias sequenciais em pequeno intervalo de tempos e a aplicação de procedimentos pré e pós biópsias que evitem a inflamação e/ou infecção nos momentos, são eficazes em garantir a funcionalidade do parênquima testicular, bem como a manutenção do perfil transcricional de genes importantes para a produção seminal e possibilitam seu delineamento em estudos da função gonadal ao longo do tempo em um mesmo indivíduo.

4 Revisão de literatura

4.1 Desenvolvimento e Anatomia testicular

O trato reprodutivo do carneiro é formado, entre outros, pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (glândulas vesiculares, próstata e glândulas bulbouretrais), que juntos participam da formação, maturação e transporte dos espermatozoides (31). Os testículos, responsáveis pela produção de espermatozóides e esteróides sexuais (1), formam-se, nos ovinos, aproximadamente com trinta dias de gestação, a partir da crista genital na face medial do mesonefro embrionário (32).

Na fase embrionária, com a migração das células precursoras de Sertoli, originadas do epitélio celômico, e das células germinativas primordiais, oriundas do saco vitelínico, formam-se os cordões testiculares (33). Concomitantemente, ocorre a formação das camadas vasculares e das células mioides peritubulares (34). No adulto, estas estruturas formarão o compartimento tubular, composto pelo epitélio germinativo, células de Sertoli e membrana basal (35). Ainda na fase embrionária, os espaços peritubulares, preenchidos pelas células de Leydig fetais e tecidos conectivos provenientes dos túbulos mesonéfricos (36), formarão o compartimento intersticial que, juntamente com o tubular, constituirão no adulto as estruturas do parênquima testicular (1). Aproximadamente até cem dias de gestação ocorre a maior atividade mitótica das células fetais de Sertoli e de Leydig, sendo este um período crítico para estabelecimento dessa população celular no ovino adulto (37,38).

Os testículos iniciam a migração para o interior do processo vaginal aproximadamente com 65 dias de gestação, evento denominado de descida testicular e que se finaliza próximo ao nascimento (35). Nos carneiros, assim como em todos os ruminantes, acredita-se que o aumento da pressão intra-abdominal sobre o gubernáculo direciona os testículos à região inguinal e, posteriormente, para dentro da bolsa escrotal. A bolsa escrotal, formada a partir das eminências lábio-escrotais da genitália embrionária, fornece proteção física (39) e, juntamente com o funículo espermático, são responsáveis pela termorregulação testicular (40), processo fundamental para a espermatogênese fisiológica (39).

Para que a espermatogênese e a esteroidogênese ocorram de modo fisiológico, os testículos nos ruminantes devem permanecer em uma temperatura cerca de 3 a 5°C abaixo da corporal (40), sendo denominados de termorregulatórios os mecanismos e processos responsáveis pela manutenção dessa condição. Os sistemas nervosos autônomos simpático e parassimpático desempenham importante papel no controle dos mecanismos termorregulatórios vasculares e não vasculares (41). Nos carneiros, as glândulas sudoríparas presentes na pele da bolsa escrotal são controladas pela inervação simpática e pelos hormônios adrenocorticais. Quando a temperatura da pele escrotal se eleva acima de 35 °C, a inervação simpática promove descargas sincrônicas de suor, a intervalos de 2 a 14 minutos, promovendo assim o resfriamento por evaporação (42).

As terminações nervosas sensoriais localizadas na pele da bolsa escrotal também participam do controle da túnica dartos, musculatura lisa localizada abaixo da pele. Quando a temperatura escrotal está abaixo da fisiológica, a coordenação neural promove a contração persistente da túnica dartos, aquecendo assim os testículos ao aproximá-los do abdômen. Por outro lado, quando a temperatura se encontra elevada, a túnica relaxa e, ao afastar as gônadas do abdômen, as resfria (43).

As estruturas do funículo espermático, com exceção do ducto deferente, auxiliam no controle da temperatura gonadal. A termorregulação vascular é feita por um mecanismo onde a artéria testicular - única, longa e altamente enrolada - está intimamente associada a uma rede de finas e delicadas veias responsáveis pelo retorno venoso testicular (plexo pampiniforme) (44). Esta conformação proporciona um importante sistema de troca de calor que simultaneamente resfria o sangue arterial oriundo do corpo e aquece o sangue venoso que retorna da gônada. De modo semelhante a túnica dartos, o músculo cremaster, inserido na túnica vaginal visceral, atua no controle da termorregulação ao contrair-se ou relaxar-se, aproximando ou distanciando os testículos do corpo. Adicionalmente, esta musculatura facilita o retorno sanguíneo no plexo pampiniforme, aumentando assim a eficiência da troca de calor no cone vascular do testículo. No entanto, a musculatura cremastérica não é capaz de sustentar uma contração prolongada como a musculatura da túnica dartos o faz (1).

Uma membrana serosa derivada do peritônio, denominada de túnica vaginal parietal, reveste internamente a bolsa escrotal, no interior da qual, os testículos e

epidídimos encontram-se também revestidos por outra membrana serosa derivada do peritônio denominada de túnica vaginal visceral. A próxima camada que reveste a superfície testicular é a túnica albugínea, formada por tecido conjuntivo denso e fibras musculares lisas, que envolvem completamente todo o testículo. Esta túnica emite finos septos que convergem centripetamente formando o mediastino e dividindo o parênquima testicular em lóbulos. No interior de cada lóbulo há de dois a cinco túbulos seminíferos contorcidos em forma de alças, dentro dos quais ocorre a espermatogênese (31). A contração intermitente da musculatura lisa da túnica albugínea e das células mioepiteliais facilita a movimentação dos espermatozoides do interior dos túbulos seminíferos para as suas extremidades terminais. Estas extremidades se unem formando os túbulos retos, que, por sua vez, penetram o mediastino e desembocam em uma rede anastomosante chamada *rete testis*. A *rete testis* se modifica no polo dorsal testicular e origina de oito a doze ductos eferentes, que atravessam a túnica albugínea e se unem formando o ducto epididimário (45).

Intimamente ligados às regiões caudomedial dos testículos encontram-se os epidídimos, formados, cada um, por um único ducto epididimário contorcido que percorre as regiões da cabeça e corpo epididimário, onde ocorre a maturação espermática. Na sua parte final, o ducto ocupa a cauda do epidídimo, local onde os espermatozoides são armazenados até o momento da ejaculação. A extremidade final do ducto epididimário transforma-se no ducto deferente, que ascende o funículo espermático e, passando pelo anel inguinal, adentra à cavidade abdominal onde localiza-se dorsalmente à bexiga. A porção terminal do ducto deferente se dilata, formando a sua ampola, e se une ao ducto excretor da glândula vesicular formando assim o ducto ejaculatório que desemboca na uretra no colículo seminal (31).

Durante o desenvolvimento pré-púbere em carneiros ocorre a maturação das células de Sertoli, fundamentais para o início da espermatogênese (36,46). A seguir, ao longo de uma série de divisões mitóticas, ocorre a maturação das células de Leydig e o concomitante aumento numérico de seus receptores de hormônio luteinizante (LH), eventos seguidos pela elevação da concentração plasmática de testosterona (47–49). Conjuntamente, essas transformações concorrem para as alterações histomorfológicas essenciais para o crescimento testicular, estabelecimento da puberdade e da espermatogênese. Tais alterações se caracterizam pela proliferação (50), alongamento e

formação das projeções das células de Sertoli (51), estabelecimento da relação pós-púbere do número de células de Sertoli/células germinativas (52), bem como, pela formação da barreira hemato-testicular (53) e do lúmen dos túbulos seminíferos. O interior dos túbulos é preenchido pelos fluidos da célula de Sertoli, essenciais para o transporte dos espermatozoides (46,54). Com 15 semanas de idade, nos carneiros, já é possível detectar a presença de espermátides alongadas no epitélio germinativo (48).

Com o início da espermatogênese há um notável aumento no número e diversidade celular no interior dos túbulos seminíferos (6). O peso corporal apresenta correlação positiva com o dos testículos e das glândulas sexuais acessórias (55), sendo, portanto, um bom indicador do momento de estabelecimento da puberdade e maturidade sexual (56). Ao longo do desenvolvimento testicular até a maturidade sexual, os túbulos seminíferos que representavam 63% do peso testicular na fase pré-púbere, passam a ocupar 84% (49). Portanto, o peso e volume testicular, o perímetro escrotal (PE), e a produção espermática apresentam elevada correlação positiva (55,57), sendo variáveis importantes para seleção de reprodutores (55,58–60). O volume testicular, calculado a partir de fórmulas matemáticas, e a CE são importantes sinalizadores do potencial reprodutivo (60,61). O volume é o melhor indicador da produção espermática (58); contudo, pela facilidade e praticidade da sua determinação, a CE é a técnica mais empregada para se estimar a produção espermática e indicar a puberdade e maturidade sexual (55). A CE à puberdade varia de acordo com as raças de ovinos de $20,5 \pm 1,8$ a $29,23 \pm 3,32$ cm (55,62,63), enquanto que a maturidade sexual ocorre quando esta atinge aproximadamente 32,5 cm (55,60). Na presença de assimetria testicular perde-se o valor da determinação da CE (58).

A espermatogênese envolve uma sequência de eventos cíclicos cronológicos que ocorrem no interior dos túbulos seminíferos. Neste processo, as espermatogônias progenitoras, ao sofrerem uma série de divisões e diferenciações, transformam-se em espermatozoides. No carneiro, a espermatogênese dura cerca de 47 dias e apresenta três fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese (64). Na espermatocitogênese, as espermatogônias progenitoras, ao dividir ciclicamente por mitose ao longo da vida, formam sequencialmente as espermatogônias A1, A2, A3 A4, I e, finalmente as espermatogônias B, que também por mitose originam os espermatócitos I (65). A seguir, por meio de divisões meióticas, formam-se as espermátides haplóides a partir dos

espermátocitos primários (I) e secundários (II). Posteriormente, inicia-se a espermiogênese, processo no qual as espermatídes se alongam e progressivamente ocorre o desenvolvimento da cauda, peça intermediária e cabeça, que apresenta o núcleo e acrossoma. Os espermatozóides formados, ao final desse processo, se desprendem das células de Sertoli por um processo denominado de espermição (1).

Em um carneiro adulto, sexualmente maduro, espera-se que o ejaculado apresente $3-5 \times 10^9$ espermatozóide/mL, e no máximo de 10% de defeitos maiores e 20% de defeitos menores (66).

4.2 Histologia testicular

O parênquima testicular compreende uma massa celular de consistência macia e coloração branco acinzentada formada por dois compartimentos: o tubular e o intersticial. Nos cortes histológicos transversais do compartimento tubular, identificam-se as células de Sertoli e as células germinativas. As células de Sertoli, que fornecem suporte físico e nutricional às células germinativas (67), continuamente secretam um fluido no interior dos túbulos seminíferos, que é essencial para o transporte dos espermatozoides. Também, estimuladas pelo hormônio folículo estimulante (FSH), essas células produzem e secretam a proteína ligadora de andrógenos, responsável por manter elevadas concentrações de testosterona no lúmen tubular, condição indispensável à espermatogênese (68). As células de Sertoli, classificadas como epiteliais polarizadas, se estendem da base ao lúmen do túbulo seminífero e interagem umas com as outras por meio de um grande e único complexo juncional localizado basolateralmente (69). Em conjunto, esses complexos formam a barreira hemato-testicular e regulam a passagem de substâncias e células germinativas do compartimento basal ao adluminal do túbulo (67).

No interior do túbulo seminífero também são encontradas 4-5 camadas de células germinativas que se desenvolvem sincronicamente. A camada basal é composta por células imaturas, que durante a espermatogênese, à medida que proliferam, movem-se em direção ao lúmen e transformam-se sequencialmente de espermatogônias em espermátocitos I, espermátocitos II, espermatídes, espermatídes alongadas, e finalmente espermatozoides, que se encontram na camada luminal. As oito combinações possíveis dessas camadas celulares, denominadas de estágio do ciclo do epitélio seminífero, se

repetem sucessivamente ao longo do túbulo (1). O entendimento do ciclo do epitélio seminífero possibilita a análise temporal da espermatogênese.

Os espaços entre os túbulos seminíferos, designados como compartimento intersticial, são preenchidos por tecido conjuntivo frouxo e uma variedade de células como, as células mioides peritubulares (45), neurônios, macrófagos, linfócitos, mastócitos, fibroblastos e células de Leydig (35). No centro do compartimento intersticial, delimitado pelos bordos externos de um conjunto de três a quatro túbulos seminíferos, observa-se um vaso linfático, enquanto na sua periferia encontram-se os vasos sanguíneos (70). As células de Leydig, secretoras de testosterona, são encontradas individualmente ou em pequenos grupos em todo o estroma de tecido conjuntivo (70).

Diversos estudos promovem a elevação da temperatura testicular para avaliar o efeito temporal do estresse térmico sobre a espermatogênese. Considerando a duração das diversas fases da espermatogênese, sabe-se que os espermatozoides defeituosos presentes no ejaculado de carneiros nos primeiros 14 dias após exposição à temperatura ambiente de 40,5°C (42) representam aqueles que já se encontravam em trânsito epididimário no momento do insulto térmico (71). Com o passar do tempo, entre 14 e 21 dias são ejaculados os que se encontravam no interior do lúmen seminífero nas fases de espermátócitos secundários e espermátides, enquanto os ejaculados, entre 21-32 dias, período com maior porcentagem de espermatozoides mortos e defeituosos, representam aqueles que estavam nas fases de espermátócito primários e secundários iniciais (42).

A avaliação histológica testicular vem sendo empregada para o diagnóstico das afecções testiculares, entre as quais destaca-se a degeneração testicular, afecção mais estudada nos ruminantes. Quando reversível, a degeneração caracteriza-se pela perda das camadas de células germinativas mais próximas ao lúmen, de muitos ou todos os túbulos seminíferos, a despeito da manutenção das espermatogônias e células de Sertoli (2). Podem também ser encontrados granulomas eosinofílicos intratubulares, espermatogônias com vacuolização citoplasmática e núcleo picnótico, bem como hialinização e espessamento da membrana basal (72). Quando ocorre a completa destruição das células de Sertoli e da barreira hemato-testicular os danos são irreversíveis (73). A degeneração testicular por estresse térmico é também caracterizada pela diminuição do número das células de Leydig, pelo aumento do número de gotas lipídicas

no seu citoplasma (74), danos estruturais nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Em conjunto essas alterações comprometem a produção de testosterona (75).

4.3 Avaliação andrológica

O exame andrológico, ferramenta mais utilizada para aferir o potencial reprodutivo masculino, avalia, entre outros aspectos, as características morfológicas do sistema reprodutor, a libido e a qualidade espermática (5).

Segundo as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (66) o exame andrológico envolve inicialmente a avaliação do estado físico geral. Posteriormente, realiza-se o exame físico específico dos órgãos do aparelho reprodutor: glândulas sexuais acessórias, prepúcio, pênis e conteúdo escrotal. Adicionalmente, é feita a mensuração da circunferência escrotal na região de maior diâmetro do escroto. A seguir, é feita a coleta de sêmen, com auxílio do eletroejaculador ou vagina artificial, e as avaliações seminais imediatas macroscópica (volume, aspecto, cor e odor) e microscópicas (motilidade, turbilhonamento e vigor). Complementa-se a avaliação com a determinação mediata da concentração e percentual de anormalidades morfológicas espermáticas.

Para ser considerado com um bom potencial reprodutivo, um carneiro deve ser saudável, ter apurmos corretos, apresentar escore corporal ≥ 3 (76), não ter histórico de infertilidade e/ou alterações do trato genital, possuir CE > 33 cm e sêmen com $\geq 80\%$ de espermatozoides normais, com motilidade total $\geq 70\%$ e concentração $\geq 3 \times 10^9$ espermatozoides/mL (66).

4.3.1 Exames complementares

A ultrassonografia reprodutiva, técnica segura e não invasiva, é uma importante avaliação complementar no monitoramento do estado reprodutivo, existindo estudos em carneiros nos quais foi relacionada a aparência ultrassonográfica testicular com as mudanças histológicas no órgão com o avanço da idade (6,7,77,78). Nos ruminantes, a imagem ultrassonográfica do testículo maduro é homogênea e de ecogenicidade moderada. No centro do órgão observa-se o mediastino mais ecogênico e na sua periferia, as túnicas vaginal e albugínea aparecem como uma linha ecogênica brilhante que separa o testículo da parede do escroto. O epidídimo, bem delineado a partir do testículo, é

facilmente detectado por possuir menor ecogenicidade (4,79). Este padrão bem característico, torna a ultrassonografia testicular um importante método para identificação de lesões não detectáveis à palpação (3).

Áreas de fibrose testicular são comuns em touros jovens e apresentam-se em padrões que variam desde pequenos focos hiperecóticos, distribuídos por todo o parênquima, até um ou vários focos maiores, limitados a áreas específicas. Podem também ser vistas formando vários focos pequenos distribuídos ao redor do mediastino ou em um padrão radial aparentemente associado à fibrose de túbulos seminíferos (4). Embora a presença de áreas de fibrose possa indicar o comprometimento da espermatogênese, não existe uma relação específica entre estas e a qualidade espermática (80). Em carneiros saudáveis e com parâmetros seminais normais, o grau de calcificação do estroma testicular foi relacionado com a idade do reprodutor (81).

Nas orquites a ecotextura do parênquima testicular apresenta-se heterogênea na fase aguda e, com o passar do tempo, ocorre aumento da ecogenicidade, indicando fibrose. Nos casos de hipoplasia, um dos testículos apresenta padrão hipoeicoico, e na epididimite ocorre o aumento de tamanho do epidídimo com redução da sua ecogenicidade. Em casos de acúmulo intraescrotal de líquidos, observa-se a separação das túnica vaginal visceral e parietal por regiões anecoicas que podem apresentar pontos hiperecoicos, sinalizando a presença intraescrotal de exsudato/transudato (hidrocele), pus (piocele) ou sangue (hematocele) (4).

Um método de análise quantitativa e objetiva da ecotextura do tecido vêm sendo empregado para relacionar o aspecto ultrassonográfico com alterações microscópicas do parênquima testicular (4,6,7,10). Através do uso de softwares específicos, é possível a determinação da tonalidade de cada pixel que compõe uma imagem ultrassonográfica. Essa tonalidade pode variar desde o negro, que recebe um valor numérico de pixel (VNP) igual a zero, até o branco, que recebe um VNP igual a 255, passando por todos os demais 248 tons de cinza. O VNP indica a amplitude do eco e, conseqüentemente, o seu valor médio representa a ecogenicidade tecidual. A heterogeneidade dos VNP é representada pela média dos valores de desvio padrão de pixels VNP de uma determinada área (DPP) (6,12). Juntos, VNP e DPP caracterizam objetivamente a aparência ultrassonográfica do tecido avaliado (4,10).

As medidas de DPP e VNP vêm sendo usadas para relacionar a ecotextura testicular com o desenvolvimento pré-púbere dos túbulos seminíferos, densidade celular (6), mudanças nas proporções de vários tipos de células germinativas na pré-puberdade (6,82), morfologia espermática futura (83), e para indicar a puberdade (7,11) e a maturidade sexual (77) em carneiros.

Embora a determinação da ecotextura testicular possa ser indicativa da produção espermática em touros (84) e carneiros (85), o seu uso na determinação da degeneração testicular é discutível. Em um estudo com degeneração testicular induzida hormonalmente em um pequeno número de touros, não houve alteração na ecotextura testicular (86). Em touros, com processo leve de degeneração testicular, não houve correlações entre intensidade de pixel e a qualidade do sêmen observada na mesma semana do exame ultrassonográfico; entretanto quando avaliados os ejaculados colhidos 2 a 4 semanas (14) ou 4 a 8 semanas (10) após o exame de ultrassom foram detectadas correlações positivas, porém baixas. Também, não foram detectadas correlações significativas entre a intensidade de pixel e as porcentagens de espermatozoides normais (10). Em conjunto, esses achados não validam a aplicação clínica da ultrassonografia em casos de degeneração testicular.

Já bodes, com históricos de deficiência de zinco e parâmetros seminais anormais, dependendo do grau de degeneração, apresentaram aspecto heterogêneo com áreas hiperecóticas confirmadas no exame histológico com a presença de calcificações (87).

Amostras teciduais são também úteis para avaliações moleculares da função testicular. A hipertermia testicular em ratos está relacionada com a menor expressão de enzimas esteroidogênicas (ex., *CYP17A1* [17α -hydroxylase], *StAR* [enzima reguladora aguda da esteroidogênese]) (88). Em touros *Bos indicus*, o aumento da temperatura escrotal por insulação reduziu a concentração intratesticular de testosterona e a expressão gênica da *StAR*, e aumentou a expressão da *GPX* (Glutathione peroxidase) e da *HSP70* (proteína do choque térmico 70), respectivamente envolvidas nos processos antioxidantes e manutenção da estrutura funcional das proteínas (89). Em camundongos, 415 genes diferencialmente transcritos foram descritos após estresse térmico (90).

A vasta maioria dos estudos que empregam amostras testiculares para avaliações histológicas ou moleculares empregam a orquiectomia ou a eutanásia, o que impede o

acompanhamento dos processos estudados em todos os animais experimentais (88,90,91). Estudos testiculares voltados a elucidar os efeitos morfológicos ou moleculares de determinados tratamentos, ao longo de um período delimitado, teriam um importante refino de delineamento experimental se pudessem ser analisadas amostras teciduais sequenciais obtidas sempre dos mesmos animais. Este problema seria solucionado pelo emprego de biópsias testiculares sequenciais, caso estas não afetem os achados subsequentes.

A biópsia, por permitir a obtenção de amostras teciduais adequadas à avaliação microscópica da estrutura (6) e da função testicular (92), é considerada uma técnica complementar na avaliação reprodutiva do macho. Em humanos, esse procedimento é considerado um método seguro para o diagnóstico de infertilidade (93–95), criptorquidismo (96), varicocele (97) e tumores (98). Contudo, existem também relatos que os níveis de testosterona diminuem após a realização de repetidas biópsias, com aumento do risco de deficiência de androgênio (20) e agravamento das lesões (99).

A técnica de biópsia pode ser realizada de forma aspirativa com agulhas finas (23-20G), útil no diagnóstico de pequenas lesões testicular (95), ou também com agulhas de acionamento automático, com diâmetros variando de 14 ou 18G, que colhem pequenos fragmentos testiculares (93). Embora essas agulhas tenham maiores diâmetros, o procedimento é referido como menos traumático que a técnica aspirativa (100). Há uma ampla variedade de agulhas de biópsias com acionamento automático que podem ser usadas em animais. Entre essas destacam-se as agulhas "Tru-cut", "Core Needle" e "Firing biopsy" (8,93,100–103), que, apesar de possuírem diferentes nomes e grande variação de espessuras (10 a 18 G), são similares.

Apesar do emprego frequente, existem ainda muitas dúvidas e receio sobre a segurança das biópsias testiculares como prática rotineira em ruminantes, o que tem despertado o interesse sobre o tema. Em carneiros, a realização de uma biópsia por testículo com agulha Tru-cut (8), e em lhamas, uma biópsia unilateral com agulha Firing biopsy (102), foi segura e não comprometeu a função gonadal. Além disso, biópsias testiculares semanais sequenciais, realizadas em carneiros impúberes (6,7) ou púberes (103), não comprometeram a função testicular.

No entanto, existem também relatos da formação de tecido cicatricial pós-biópsia no parênquima testicular. Essas áreas podem calcificar e/ou desencadear reações autoimunes anti-esperma em consequência da quebra da barreira hemato-testicular (104). A integridade da barreira hemato-testicular é fundamental para a função do órgão, pois evita o acesso do sistema imune às células germinativas que já estão em divisão meiótica; como essas células têm genoma diferente das demais células diplóides do organismo, o contato destas com o sistema imune pode desencadear reações auto-imune específicas (19). Esse evento foi relatado em homens que passaram pelo procedimento de biópsia com agulhas 19G (19). Em conjunto, essas reações adversas, somadas à complexidade prática e aos custos de realização, são empecilhos importantes para a utilização rotineira das biópsias testiculares em animais (6).

A partir da literatura disponível, é possível inferir que a biópsia é um importante recurso para avaliações clínicas e fisiológicas do tecido testicular; vários estudos não associam sua aplicação a lesões ou danos severos. Contudo, a maioria desses não inclui uma descrição minuciosa da metodologia aplicada, principalmente no que se refere aos procedimentos pré e pós-biópsia, voltados a contornar seus possíveis efeitos indesejáveis, como edemas, hemorragias, hidrocele e infecções, principalmente quando estas são sequenciais. Também não existem informações relacionadas às consequências da realização de biópsias testiculares sequenciais em um curto período.

4.4 Mediadores inflamatórios e função testicular

As infecções/inflamações do parênquima testicular (94) e as infecções sistêmicas (21), por ação direta dos lipopolisacarídeos (LPS) e/ou indiretamente por citocinas pró-inflamatórias (105,106), podem ter efeitos inibitórios na função gonadal, afetando a produção de andrógenos e o funcionamento do epitélio seminífero (107). Os *Toll-like receptors* (TLR), receptores encontrados principalmente em células mieloides e epiteliais, identificam regiões específicas dos patógenos, os *motifs*, e, posteriormente, desencadeiam a inflamação. Nas células de Sertoli os ligantes de TLR associado à proteína de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MYD88) levam à ativação dos fatores de transcrição da inflamação como o fator de necrose tumoral (TNF), fator nuclear kappa B (NFκB), proteína ativada 1 (AP1), ativação das quinases Jnk (Jun N-terminal kinase) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAP-kinase), os quais desencadeiam a ativação de um subconjunto de genes, incluindo interleucina-1 alfa

(IL1 α), interleucina-6 (IL6), TNF, activina A (106,108) e a ciclooxygenase 2 (COX2) (109) (Somade 2019 e Chen 2020).

Estas citocinas atuam em várias funções no epitélio seminífero. Em camundongos a IL1 α , IL6, activina A e TNF α estimulam a produção de lactato e transferrina, essenciais para a espermatogênese (23,110–112), e provavelmente a regulam por mecanismos estimulatórios e inibitórios em diferentes momentos (24,113). Além disso, há evidências de que estes mediadores modulam a resposta da célula de Sertoli à estimulação de FSH (23,25,26) e a produção de andrógenos (27–29). Imediatamente após a espermição, ocorre maior produção destes mediadores inflamatórios, momento em que ocorre a fagocitose do citoplasma residual dos espermatozoides pelas células de Sertoli (114).

Contudo, a presença em níveis suprafisiológico destes mediadores inflamatórios promove o desarranjo dos complexos juncionais das células Sertoli, que regulam a passagem dos espermatócitos primários do compartimento basal para o adluminal do epitélio seminífero (115–117). Desta forma, estas citocinas apesar de participarem do processo regulatório da espermatogênese, também atuam na sinalização inflamatória do epitélio seminífero, sendo portanto, uteis para explicar as relações entre uma possível infecção/inflamação e a disfunção testicular (30).

5 Considerações finais

A intensa proliferação e maturação das células de Sertoli e de Leydig que ocorrem ao longo do desenvolvimento embrinário e pré-púbere, respectivamente, são processos importantes para garantir a manutenção da função testicular. A integridade das gônadas, das túnicas albugínea e vaginal, da bolsa escrotal e do funículo espermático, permite a atuação dos mecanismos termorregulatórios, fundamental para o desenvolvimento gonadal e a correta espermatogênese.

A ultrassonografia tem sido usada como ferramenta complementar ao exame andrológico. A determinação da ecogenicidade e heterogeneidade tecidual possibilitam a análise ultrassonográfica da histomorfologia testicular. Essas avaliações foram correlacionadas com as mudanças microscópicas do parênquima testicular ao longo do desenvolvimento pré-puberal e no estabelecimento da maturidade sexual.

O uso da biópsia testicular como técnica complementar ao exame andrológico, demonstra ser uma alternativa importante para a avaliação do desenvolvimento e o

entendimento dos problemas reprodutivos. Embora hajam relatos da ocorrência de fibrose, de reações autoimune anti-esperma e deficiência de androgênio, que colocam em dúvida a sua aplicação, não há uma descrição adequada da metodologia pré e pós procedimento, bem como aplicação de biópsias sequenciais realizadas em um pequeno intervalo de tempo. Em situações em que rapidamente haja o comprometimento da funcionalidade gonadal, as biópsias sequenciais podem ser uma importante ferramenta para o estudo dos efeitos envolvidos no mesmo animal.

4 Referências

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

sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls.

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

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

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

Dev. 2014;81(6):497–513.

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

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

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

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

2017;46(4):317–23.

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

1988;17(1–2):77–84.

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2

O artigo foi redigido nas normas da revista Livestock Science.

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

Serial frequent Tru-cut testicular biopsies in rams enable assessment of transcriptional profile without acute adverse effects

Pupulim AGR^{1*}, Rattes PZ^{1*}, Mogollón García HD^{1,2}, Carvalho JC^{1,3}, Uzae KZ¹, Ribeiro GC⁴, Navolar, FMN⁵, Di Santis, GW⁵, Rizzoto, G¹, Nogueira, GP⁶, Nunes SG⁷, Castilho ACS⁸, Kastelic JP⁹, Ferreira JC^{1#}

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil. ²Department of Clinical and Toxicological Analysis, University of São Paulo (USP),

São Paulo, SP, Brazil.

³Santo Amaro University, São Paulo, SP, Brazil

⁴Department of Veterinary Clinical Science, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

⁵Departamento of Preventive Veterinary Medicine. Londrina State University, Londrina, PR, Brazil.

⁶Department of Animal Health and Production, FMVA, Sao Paulo State University UNESP, Araçatuba, SP, Brazil.

⁷ Department of Pharmacology, Bioscience Institute, São Paulo State University, (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

⁸ University of Western São Paulo (Unoeste), Presidente Prudente-SP, Brazil.

⁹Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada.

*Both authors contributed equally

Corresponding author:

#João Carlos Pinheiro Ferreira

Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Rua Prof. Dr. Walter Maurício Correa, s/n, Botucatu, SP 18618–681, Brazil.

Tel: +55 14 38802121; Email: joao.cp.ferreira@unesp.br

ABSTRACT

Our objective was to investigate effects of serial frequent biopsies on transcriptional profiles, semen quality, and testicular echotexture of ram testes. Testicular biopsies were collected from six mature rams with a 16 G Tru-cut needle at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h, alternating testes at each collection. Rams received benzathine benzylpenicillin (30,000 IU/kg IM) once, plus flunixin meglumine (1.1 mg/kg, once daily for 3 d). Before each biopsy, scrotal skin was infiltrated with 1 mL 2% lidocaine and disinfected. Immediately after each biopsy, direct digital pressure (≥ 5 min) followed by ice (10 min) were applied at the puncture point. Testicular samples were assayed by RT-q PCR for genes involved in acute inflammation, oxidative stress, and steroidogenesis; none had any change ($P > 0.05$) in expression. Semen collection via artificial vagina (before and 28 d after biopsies) and ultrasonographic evaluations of scrotum and testes (before and every 4 d from 5 d to 21 d after biopsies). There were no changes ($P > 0.05$) in seminal characteristics at 28 d or in testicular ultrasonographic echogenicity up to 21 d after biopsies. There were no signs of scrotal pain, increased temperature, swelling, or bleeding up to 28 d after biopsies. In conclusion, serial frequent testicular biopsies did not cause gross morphological inflammatory changes in the scrotum or testes and did not alter testicular transcriptional profiles of target genes, with no significant effects on semen or ultrasonographic characteristics. We concluded that this was a viable approach for monitoring acute molecular changes in testes.

Keywords: Testis; Biopsy; Gene expression; Sperm; Semen; Andrological evaluation

1. Introduction

Breeding soundness evaluation, a method of designating males as likely or unlikely capable of establishing pregnancy, includes a physical and reproductive examination and analysis of sperm quality (Kastelic and Thundathil, 2008).

Ultrasonography (Giffin et al., 2009) and hormonal assays (Bartlewski et al., 2017) can be used as additional procedures.

Testicular biopsies for histological evaluation are an auxiliary, albeit rarely used procedure for andrological assessment (Giffin et al., 2014; Meyers-Wallen, 1991). In humans, testicular biopsy is regarded as a safe complementary method for diagnosis of male infertility (Carpi et al., 2005; Dohle et al., 2012), cryptorchidism (Faure et al., 2016), varicocele (Elzanaty, 2014), and tumors (Ramanathan and Dogra, 2018). However, they are also related to the occurrence of vascular lesions, inflammatory changes, and fibrosis (Schlegel and Su, 1997), formation of anti-sperm antibodies (Harrington et al., 1996), decreased testosterone concentrations, and increased risk of androgen deficiency (Manning et al., 1998). Likewise, in rams, single testicular biopsies with 19 G hypodermic or 14 G Tru-cut needles caused fibrosis and microcalcifications and, potentially, a breakdown of the blood-testis barrier and formation of anti-sperm antibodies (Fedder et al., 2017). In contrast, a single testicular biopsy did not promote changes in the testicular parenchyma in llamas (Heath et al., 2002b) or impact semen characteristics or testosterone concentrations in rams (Sartori et al., 2002). Also, sequential unilateral biopsies, performed with a 10 G Tru-cut needle in 14, 18, and 22-wk old rams (Lunstra and Echternkamp, 1988), and weekly biopsies, performed with a 12 to 16 G Core needle in prepubertal lambs from 10 to 19 wk of age, did not compromise testicular development (Bartlewski et al., 2017; Giffin et al., 2014).

Several studies of the effects of therapeutic approaches (Barth and Bowman, 1994; Orazizadeh et al., 2010) or heat stress (HS) (Li et al., 2009; Rizzoto et al., 2020) on testicular function have been done. However, a critical limitation is the absence of sequential sampling of testicular parenchyma for histological and/or molecular responses to these treatments. If such analyses are imperative, orchiectomy and/or slaughter are the typical approach (Bozkaya et al., 2017; Li et al., 2009; Rizzoto et al., 2020), but that precludes repeated sampling from the same individual.

Sequential biopsies would be extremely useful for monitoring testicular responses to therapeutic approaches or HS. However, little is known regarding whether sequential testicular biopsies at short intervals affect testicular molecular responses or spermatogenesis. Therefore, our objective was to determine acute effects of serial frequent testicular biopsies on immediate expression of testicular genes related to oxidative stress, inflammation, and steroidogenesis, and to monitor semen characteristics and testicular ultrasonographic echotexture during the first weeks after biopsies.

2. Material and methods

2.1 Local and animals

The study was conducted in Botucatu (22°53'20" south/ 48°29'52" west). Six crossbred Santa Ines x Dorper rams ~18 mo and ~63.8 kg were used. Rams were kept in pens with slatted floor, and fed a total mixed ration twice daily, with *ad libitum* access to water. The diet was formulated to meet the nutritional requirements of rams (NRC,

2015) and the amount fed was adjusted daily to yield at least 5% orts. Environmental temperature and humidity data were recorded every 10 min (HOBO Data Loggers U12-012; Onset®, Bourne, MA, USA), with an average temperature-humidity index of 59.8 (41.9 - 72.8).

These rams were free of any reproductive anatomical or seminal abnormalities, had a scrotal circumference > 33 cm, > 70% normal spermatozoa, and total motility > 80%, according to standards of the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 2013). In addition, they were also free of any ultrasonographically detectable abnormalities of the scrotum or testes (MyLabFive scanner with a 7.5 MHz linear-array transducer, Esaote, Italy).

All animal use activities were reviewed and approved by the Ethics Committee of Animal Use at the School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (Protocol 120-2021).

2.2 Testicular biopsies

Rams were subjected to six sequential testicular biopsies using Tru-cut 16 G needles at the following times: 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h, with biopsies performed on the right testis at 0, 6, and 24 h (top, middle and bottom regions, respectively), and on the left testis at 3, 12, and 48 h (top, middle and bottom regions, respectively). Before each biopsy, infrared thermography (Flir E53, MSX®, Termovisor®, Atibaia-SP, Brazil) of three points on the scrotal surface, and rectal temperature (Termômetro Digital. G-Tech®, Duque de Caxias, RJ, Brazil) were used to monitor temperature. Biopsies were

always performed using an anterior approach to the testes, thereby avoiding the large veins on the posterior surface (Kastelic et al., 1996)

Immediately before the first biopsy, rams were given a single dose of benzathine benzylpenicillin (30,000 IU/kg IM; Pentabiótico[®], Zoetis, São Paulo, SP, Brazil) and flunixin meglumine (1.1 mg/kg IM; Flumax[®], JA Saúde Animal, Patrocínio Paulista, São Paulo, Brazil), with the flunixin, repeated once daily for the next 2 d. Prior to each biopsy, the scrotum was shaved and washed twice with chlorhexidine soap (Riohex 2%[®], Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brazil), followed by an alcohol-based chlorhexidine solution (Riohex 0,5%[®], Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brazil). Then, the testis was grasped, and the scrotal skin was infiltrated with 1 mL of 2% lidocaine (Lidovet[®], Bravet, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). After each biopsy, performed according to the Tru-cut 16G needle manufacturer's instruction (Unit, São Paulo, SP, Brazil), the testis was held, and digital pressure at the puncture point was performed for at least 5 min. Then, an ice pack was applied on the scrotal surface for 10 min. If the amount of testicular tissue was considered insufficient for RTq-PCR assay at the first attempt (< 1.3 mg), the biopsy was repeated. Scrotal surface and rectal temperatures were measured after each biopsy. Testicular biopsies were stored in cryotubes (Corning[®], Corning Inc., New York, USA) at -80 °C pending RNA extraction for PCR analyses.

During the experimental period, rams were evaluated daily for behavioral signs of pain. The main parameter observed were activity, appetite, altered gait, positions of ears and head, and orbital tightening.

2.3 Semen evaluation

Semen was collected with an artificial vagina 3 d before and 28 d after the first biopsy. Sperm motility and kinetics were assessed by computer-assisted sperm analysis (CASA; IVOS, Version 14, Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, USA), with the following setup: frames/field: 30; minimum contrast: 60 pixels; minimum size: 6 pixels; linearity: 70%; threshold motile speed: 30 $\mu\text{m/s}$; threshold for average minimum speed: 40 $\mu\text{m/s}$; threshold for minimum linear speed: 20 $\mu\text{m/s}$; head displacement: 90; size of head: 5 pixels; amplification: 1.95; temperature: 38 °C). For CASA, semen was diluted (final concentration, 30×10^6 sperm/mL) in Botubov® extender (Botupharma, Botucatu, SP, Brazil), and 10 μL was placed in a Makler chamber. The CASA parameters evaluated were total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), curvilinear velocity (VCL, mm/s), path velocity (VAP, mm/s), progressive velocity (VSL, mm/s), lateral head displacement (ALH, mm), tail beat frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %), and linearity (LIN, %).

For assessment of sperm morphology, a wet mount preparation of sperm diluted in warm 4% formalin-saline (1:10) on a slide covered with a coverslip was evaluated by differential interference contrast microscopy (1,000X magnification; Leica®, Leica Microscope – DM 500, Wetzlar, Germany). Sperm morphology was classified according to Bloom (1973), with 200 cells designated as morphologically normal or abnormal.

2.4 Scrotal and testicular examination

Before each biopsy, and then, every 2 d, the scrotum was physically evaluated for signs of pain, swelling, edema, or skin lesions. In addition, testes were assessed by B-mode ultrasonography (MyLabFive equipped with 7.5 MHz linear-array transducer, Esaote, Italy) immediately before (day 0 = D0) and at D5, D9, D13, D17, and D21 after the first biopsy. The ultrasound transducer was held parallel to the longitudinal axis on the anterior surface of the scrotum and moved laterally to evaluate the testicular parenchyma. Images were recorded from each testis and subsequently analyzed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Initially, the ultrasound picture was adjusted to the software scale. Then, the testicular ultrasound echogenicity and heterogeneity were determined as numeral pixel value (NPV) and pixel standard deviation (PSD), respectively (Giffin et al., 2014), in three randomly selected areas of 501.4 ± 0.24 pixels of testicular parenchyma, avoiding regions with image artifacts or scarring from biopsies.

2.5 RNA extraction and quantification

Testes biopsies were thawed and homogenized. Total RNA was extracted with Trizol[®], using the co-precipitate GlicoBlue (Invitrogen, Sao Paulo, SP, Brazil) and stored at -80 °C. All samples were incubated with DNase I (1 IU/mg; Invitrogen) at 65 °C for 10 min to lyse genomic DNA. Immediately after incubation, total RNA from each sample was submitted to reverse transcription using random primers, following manufacturer's instructions (High-Capacity Kit, Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA).

To perform RT-qPCR for target genes (Table 1), QuantStudio™ 7 Flex equipment using the Power Sybr Green® (Applied Biosystems®) system was used, using specific primers for each gene. The qPCR reactions were carried out in 25 mL volumes, with 1 mL of cDNA, 12.5 mL of Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 300 mM of each forward and reverse primers, and 9 mL of water. The qPCR cycling conditions were 95 °C for 10 min for initial denaturing and then 40 cycles of 95 °C for 10 s, followed by primer annealing and extension at 60 °C for 1 min (Table 1). Reactions were optimized to achieve maximum amplification efficiency for each gene (90-110%). Samples were analyzed in duplicate and as a negative control, water was added to the mix of cDNA (in each plate).

NormFinder software (Department of Molecular Medicine [MOMA], Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark) was used to select appropriate housekeeping genes; amplification profiles of isomeryl peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and beta-actin (*ACTB*) were analyzed. Ultimately, *ACTB* was identified as the most suitable gene. The Ct method (target genes/*ACTB*) was used to quantify relative mRNA abundance, with correction of efficiency for each target gene (Livak and Schmittgen, 2001).

Table 1. Primers for Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-q PCR) to assess mRNA abundance of genes in testicular tissues.

Gene	Forward sequence	Reverse sequence	Con (mM)	Temp. (°C)
<i>TNF-α</i>	GGA CCA GCC AAG AGA GAG AC	GCA GGG TGT ATG AGA GAG CA	300	60

<i>IL-1</i>	ACA GAT GAA GAG CTG CCC	CTT CCC TTC CCT TCT GCC AG	300	60
<i>STAR</i>	GCA TCC TCA AAG ACC AAG GAG	CTT GAC ACT GGG GTT CCA TCT	200	57
<i>SOD-2</i>	TCA CAG CAT CTT CTG GAC	TGCTCCTTATTGAAGCCAAG	300	60
<i>GPX-1</i>	AGT TTG GGC ATC AGG AAC	CCG AAG GAA GGC GAA GAG	300	60
<i>HSP70</i>	AAC ATG AAG AGC GCC GTG GAG G	GTT ACA CAC CTG CTC CAG TCC	300	60
<i>GAPDH</i>	GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAA	AAG CAG GGA TGA TGT TCT GG	200	60
<i>β-actin</i>	GTC CGT GAC TAC AAG GAG AAG	AGG AAG GAA GGC TGG AAG GAG	300	60

Primer concentration per PCR reaction (mM); Temperature of annealing and extension (°C).

2.6 Statistical analyses

Parametric assumptions were tested using Shapiro-Wilk's test (normality). Seminal parametric data (volume, concentration, major, minor and total defects, and sperm kinetics) were analyzed using paired Student's *t*-test. Comparisons among right (RT) and left testis (LT) from NPV and PSD variables were assessed by repeated measures over time (Mixed Model). The testis side (TS), day (D), and a testis side x day interaction (TxD) were considered fixed effects. Also, repeated measures over time were applied to compare the means of NPV and PSD, considering each testis and both testes, with day considered a fixed effect. The Tukey test was used as a post-hoc test.

Results are mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical significance was defined as $P < 0.05$ and GraphPad Prism (Version 8.2.1) was used.

Differences in relative mRNA abundance of target genes were evaluated by one-way ANOVA, with a Tukey test used to locate differences. Data that were not normally distributed were transformed to base-10 logarithms before analysis. Analyses were performed using JMP software (SAS Institute Cary, NC, USA). Data are presented as means $\pm$ SEM. Differences were considered significant when $P < 0.05$ and all were expressed as fold change.

3. Results

During the experimental period, there were no indications (neither visual nor by palpation) of any lesion or inflammation in the scrotum or skin, and there were no indications of intrascrotal fluid collections. Also, rams did not have any behavioral sign of pain during the biopsy period or thereafter.

The mean number of biopsies per timepoint for the right and left testes was 1.97 and 1.95, respectively. Mean scrotal surface and rectal temperatures (31.1 ± 0.2 and 38.7 ± 0.05 °C, respectively) remained stable during the collection of biopsies. For five biopsy attempts, bleeding did not stop after 5 min of digital pressure, and an additional 5 min of digital pressure was applied to the puncture point.

There were no significant differences between the control and D28 timepoints for semen volume, concentration, sperm morphology, or sperm kinetics characteristics ($P > 0.005$), except for ALH, which was lower at D28 ($P < 0.005$) (Table 2).

Table 2. Mean $\pm$ SEM of semen volume, sperm concentration, morphology, and kinetics characteristics before (Control) and 28 days (D28) after sequential biopsies performed with Tru-cut needles in rams (n = 6).

Sperm characteristics	Control	D28
Volume (mL)	1.8 $\pm$ 0.10	1.7 $\pm$ 0.11
Concentration (x 10 ⁹ /mL)	1.44x10 ⁹ $\pm$ 0.17x10 ⁹	1.15x10 ⁹ $\pm$ 0.16x10 ⁹
Total motility (%)	83.5 $\pm$ 2.3	89.2 $\pm$ 1.7
Progressive motility (%)	63 $\pm$ 2.9	71.8 $\pm$ 1.3
VCL (μ m/s)	209.9 $\pm$ 5.2	191.1 $\pm$ 6.8
VAP (μ m/s)	123.3 $\pm$ 2.4	122.6 $\pm$ 4.4
VSL (μ m/s)	104.4 $\pm$ 2.4	105.6 $\pm$ 3.4
ALH (μ m)	7.6 $\pm$ 0.3 ^a	6.2 $\pm$ 0.28 ^b
BCF (Hz)	36.6 $\pm$ 1.2	39 $\pm$ 1.5
STR (%)	84.3 $\pm$ 1.9	85.3 $\pm$ 1
LIN (%)	52 $\pm$ 2	58 $\pm$ 2.2
Minor defects	7.3 $\pm$ 1.3	4 $\pm$ 0.6
Major defects	6 $\pm$ 1.2	4.8 $\pm$ 1.1
Total Defects	13.3 $\pm$ 2.1	8.2 $\pm$ 1.2

ALH: lateral head displacement; BCF: beat cross frequency; LIN: linearity; STR: straightness; VAP: path velocity; VCL: curvilinear velocity; VSL: progressive velocity.
^{a,b}. Within a column, means with a different superscript differed (P < 0.05).

No signs of intrascrotal bleeding or hydrocele were observed in the sequential ultrasound evaluations performed after testicular biopsies. For NPV and PSD, there was no effect of the testis side, day, nor interaction between the testis side and day ($P > 0.05$). The mean $\pm$ SEM of NPV and PSD are shown in Figure 1.

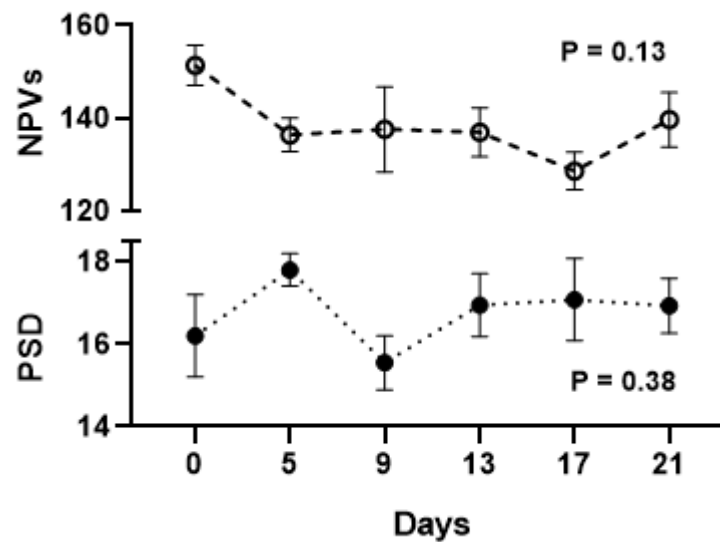


Figure 1. Mean $\pm$ SEM of the number of pixels value (NPV; ○) and pixel standard deviation (PSD; ●) of both testes of rams ($n = 6$) before (Day 0) and up to 21 days after sequential biopsies performed with Tru-cut needles.

Regarding the transcriptional gene profile, for all genes evaluated, there was no effect of testis side, hour, nor interaction between testis side and hour ($P > 0.05$; Figure 2).

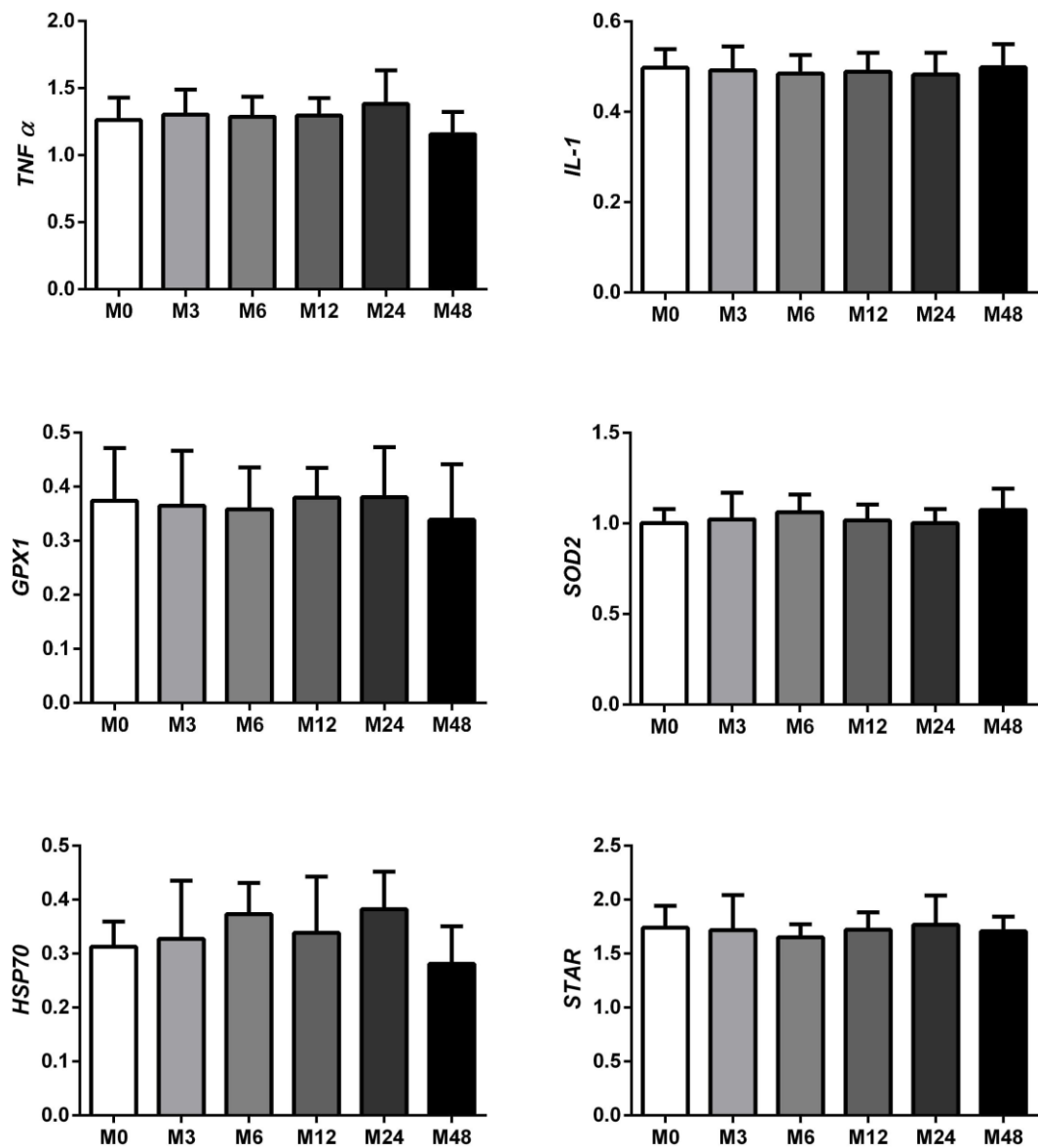


Figure 2. Transcript abundance of *TNFα*, *IL-1*, *GPX1*, *SOD2*, *HSP70*, and *STAR* of rams at each moment (M) of sequential biopsies with Tru-cut needle. The data are presented as mean $\pm$ SEM of the relative mRNA levels (target gene/geometric mean of reference genes [*ACTB*]). Significance differences were not found ($P > 0.05$). *TNFα*, tumor necrosis factor- α ; *IL-1*, interleukin-1; *GPX1*, glutathione peroxidase 1; *SOD2*, superoxide dismutase 2; *HSP70*, heat shock protein 70; *STAR*, steroidogenic acute regulatory protein.

4. Discussion

Testicular evaluation is critical in studies involving effects of the environment, HS or male reproductive diseases (Rizzoto et al., 2020). Serial biopsies would be extremely useful for assessment of molecular and histological changes of testicular parenchyma after treatments or experimental procedures. This is apparently the first report to assess effects of serial frequent testicular biopsies in ruminants. Based on the absence of transcript profile changes in genes commonly used to monitor steroidogenesis, inflammatory, oxidative, and HS responses, we inferred that serial biopsies with a 16 G Tru-cut needle are a viable approach to study acute changes in testicular tissue.

Studies reporting single (Heath et al., 2002b), double (Heath et al., 2002a), weekly (Bartlewski et al., 2017; Giffin et al., 2014), or monthly (Lunstra and Echterkamp, 1988) multiple percutaneous biopsies performed with Tru-cut needles lacked details regarding pre- or post-operative procedures. There is only a brief mention in one report that the scrotal skin was scrubbed with betadine and rinsed with alcohol (Heath et al., 2002b) and in another report that skin was infiltrated with 2% xylocaine (Heath et al., 2002a). In these two studies, a small incision was made in the scrotal skin to introduce the Tru-cut needle. In humans, there are reports of pain, decreased testosterone concentrations (Hussein, 2013), infection (Beierdörffer H, 1979), intratesticular bleeding, and scrotal hematoma (Harrington et al., 1996; Ron-El et al., 1998) after testicular biopsies (Dabaja and Schlegel, 2013). However, in the present study, appropriate pre- and post-biopsy procedures mitigated potential complications. After biopsies, keeping the testes in the same position in the scrotum and applying digital pressure and ice packs minimized intrascrotal bleeding, as no sign of intrascrotal

fluid accumulation was observed ultrasonographically. Also, penicillin and a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) were given to prevent infection and inflammation. From our perspective, it does not seem advisable to procure percutaneous testicular biopsies without judicious and pre-emptive pre- and post-operative procedures.

Immunological and acute inflammatory responses can be triggered by pathogens-associated molecular patterns (PAMP) or damage-associated molecular patterns (DAMP) (Tang et al., 2012); consequently, testicular biopsies are potential promoters of inflammation due to pathogens or trauma. To assess the inflammatory response after sequential biopsies, we measured the transcript profile of pro-inflammatory cytokines interleukin 1 (*IL1*) and tumor necrosis factor α (*TNF- α*) genes. Despite being physiologically expressed in the testicular parenchyma (Delfino et al., 2003; Lysiak, 2004), these genes commonly have high expressions in testicular ischemia or autoimmune orchitis (Lysiak, 2004). In that regard, *IL-1* amplifies the inflammatory response, stimulating the release of IL-6 by Sertoli cells (Syed et al., 1995), which acts as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in spermatocytes (Hakovirta et al., 1995). Testicular inflammation increases *TNF- α* expression, inducing apoptosis of Sertoli cells (Riccioli et al., 2000). Together, IL1 and *TNF- α* participate in dynamic changes in Sertoli cells' junctional complexes, and their increase impairs the displacement of germ cells to the adluminal space of the seminiferous tubules (Li et al., 2006; Sarkar et al., 2008).

The NSAID use in this study had two beneficial effects. First, it helped to control testicular inflammation and pain and thereby promoted animal welfare. Second, it prevented a traumatically induced transcription of pro-inflammatory cytokines (*IL1*

and *TNF- α*) in testicular tissues after serial frequent biopsies, avoiding a diffuse testicular acute inflammatory response and, consequently dysfunctional spermatocytes (Hakovirta et al., 1995) and Sertoli cells (Riccioli et al., 2020). As HS did not change the testicular transcription of these cytokines (Ferreira, unpublished data), we inferred that NSAID treatment did not represent a bias for these studies.

Furthermore, the transcript profile of *STAR* did not change during the experimental period. Testicular HS (Rizzoto et al., 2020) or inflammatory conditions (e.g., increased tissue levels of *IL1* and *TNF- α*) (Lin et al., 1998; Nehar et al., 1997) decrease *STAR* mRNA in Leydig cells. The absence of changes in the *STAR* transcript profile in this study provided evidence that steroidogenesis was not impaired and reinforced the lack of a diffuse testicular acute inflammatory condition after serial biopsies.

Reactive oxygen species (ROS) participate in several physiological cellular processes (Checa and Aran, 2020). However, large accumulations can have harmful effects (Checa and Aran, 2020). Both *TNF α* (Forrester et al., 2018) and *IL1* (Ansari et al., 2018) are involved in intracellular ROS production. Glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) are essential enzymes to prevent deleterious effects of intracellular ROS accumulation (Yu and Huang, 2015). Based on the absence of changes in *GPX1* and *SOD2* mRNA transcripts, we inferred that the NRF2-antioxidant response element signaling pathway, the first cellular response to intracellular accumulation of ROS, was not activated (Amin et al., 2014). Also, the absence of changes in the transcript profile of the *HSP70* gene indicated that ROS balance was not impaired in the testicular tissue after repeated biopsies, as HSP70 is a critical protein to mitigate the deleterious effects of intracellular ROS accumulation (Týč et al., 2015).

The most pronounced seminal changes in testicular degeneration in ruminants occur from 21 to 28 d after its induction and are characterized by reduction of sperm motility and percentage of morphologically normal sperm in ruminants (Alves et al., 2016; Barth and Kastelic, 2021). Except for ALH, which decreased, but remained within the physiologic range (Ibănescu et al., 2016; Malama et al., 2017), the lack of changes in the ejaculate, sperm characteristics, and morphological defects at D28 indicated that spermatogenesis was not impaired by the serial sequential biopsies (five or six per testis).

These findings provided further evidence that there was no diffuse testicular acute inflammation and, consequently, no testicular degeneration.

All evidence mentioned above was corroborated by ultrasonography, a valuable tool for examining testicular parenchyma (Kastelic and Brito, 2012). As mentioned before, there was no evidence of intrascrotal fluid accumulation. Both NPV and PSD have been used to monitor development of seminiferous tubules, testicular tissue density, and proportions of testicular cell types (Ahmadi et al., 2012; Brito et al., 2012; Giffin et al., 2014). An absence of significant changes in NPV and PSD supported our conclusion of no diffuse change in the testicular parenchyma.

Our findings were similar to the other studies where no deleterious effect on semen quality was observed after single bilateral biopsies in bulls (Byers, 1953) or rams (Sartori et al., 2002). However, increased testicular temperature and decreased sperm progressive motility were reported, up to 14 and 28 d, respectively, after a single biopsy in bulls (Heath et al., 2002a). As post-biopsy semen analysis was performed only at D28 in our study, we cannot exclude the possibility that breaching the blood-testis barrier with a biopsy procedure can cause a subsequent decrease in seminal

characteristics. There are reports of poor semen quality after testicular trauma in stallions (Papa and Leme, 2002) or after collection of a biopsy with a 14 G needle in rams (Fedder et al., 2017). These effects were attributed to the immune system's access to germ cells and subsequent anti-sperm autoimmune reactions (Manning et al., 1998; Steele et al., 2001).

The necessity of two attempts to obtain an amount of testicular tissue sufficient for RTq-PCR assay seemed to be related to the relatively softer ovine testicular parenchyma. We collected testicular biopsies from *Bos taurus* (unpublished data), and just one attempt was necessary to obtain a good sample.

5. Conclusion

Serial frequent testicular biopsies did not change the transcriptional profile of testicular genes related to oxidative stress, acute inflammation, or steroidogenesis. Also, after the biopsies, there were no changes in seminal characteristics at 28 d or in testicular ultrasonographic echogenicity and heterogenicity up to 21 d. Therefore, we concluded that this approach is valuable for monitoring acute-short time molecular and cellular changes in testicular tissues.

Acknowledgments

Financial support from FAPESP (Grant#2018/02007-6), CAPES (Code 001), PIBIC-CNP (Grant#3845), CAPES PRINT-Unesp, and FMVZ Unesp, Botucatu, are gratefully acknowledged.

Authorship contributions statement

Pupulim AGR Conceptualization Data curation; Formal analysis; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Writing - original draft.

Rattes PZ Conceptualization Data curation; Formal analysis; Methodology; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Writing - original draft.

Mogollón García HD Conceptualization; Methodology; Writing - original draft.

Carvalho JC Methodology ; Visualization.

Uzae KZ Project administration; Supervision; Validation; Visualization.

Ribeiro GC Methodology; Visualization.

Navolar, FMN Methodology; Visualization.

Di Santis, GW Methodology; Visualization, ; Data curation; Validation

Nunes SG Software; Supervision; Data curation; Validation; Visualization; review & editing.

Castilho ACS Software; Data curation Supervision; Validation; Visualization; review & editing.

Nogueira GP Funding acquisition; review & editing.

Kastelic JP Conceptualization; Funding acquisition; Writing - review & editing.

Ferreira JC Conceptualization; Funding acquisition; Investigation; Project administration; Writing - review & editing.

Declaration of interest

The authors declare that no conflict of interest could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

- Ahmadi, B., Lau, C.P.S., Giffin, J., Santos, N., Hahnel, A., Raeside, J., Christie, H., Bartlewski, P., 2012. Suitability of epididymal and testicular ultrasonography and computerized image analysis for assessment of current and future semen quality in the ram. *Exp. Biol. Med.* 237, 186–193.
<https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011050>
- Alves, M.B.R., Andrade, A.F.C., Arruda, R.P., Batissaco, L., Florez-Rodriguez, S.A., Oliveira, B.M.M., Torres, M.A., Lançon, R., Ravagnani, G.M., Prado Filho, R.R., do, Vellone, V.S., Losano, J.D.A., Franci, C.R., Nichi, M., Celeghini, E.C.C., 2016. 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* 86, 795-805.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.034>

- Amin, A., Gad, A., Salilew-Wondim, D., Prastowo, S., Held, E., Hoelker, M., Rings, F., Tholen, E., Neuhoﬀ, C., Looft, C., Schellander, K., Tesfaye, D., 2014. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. *Mol. Reprod. Dev.* 81, 497–513. <https://doi.org/10.1002/mrd.22316>
- Ansari, M.Y., Khan, N.M., Ahmad, I., Haqqi, T.M., 2018. Parkin clearance of dysfunctional mitochondria regulates ROS levels and increases survival of human chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 26, 1087–1097. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.07.020>
- Barth, A., Kastelic, J.P., 2021. Testicular Degeneration, in: *Bovine Reproduction*. Wiley, pp. 144–150. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch13>
- Barth, A.D., Bowman, P.A., 1994. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Can. Vet. J.* 35, 93–102.
- Bartlewski, P.M., Giffin, J.L., Oluwole, O.A., Hahnel, A.C., 2017. Prospective ultrasonographic and endocrine predictors of spermatogenic onset in ram lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 179, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.015>
- Beierdörﬀer H, S.C., 1979. Peculiarities and side effects of testicular biopsy. *Andrologia* 1, 311–319.
- Bloom, E., 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med* 25, 383–91.
- Bozkaya, F., Atli, M.O., Guzeloglu, A., Kayis, S.A., Yildirim, M.E., Kurar, E., Yilmaz, R., Aydilek, N., 2017. Effects of long-term heat stress and dietary restriction on

- the expression of genes of steroidogenic pathway and small heat-shock proteins in rat testicular tissue. *Andrologia* 49, 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.12668>
- Brito, L.F.C., Barth, A.D., Wilde, R.E., Kastelic, J.P., 2012. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls. *Theriogenology* 78, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.022>
- Byers, J.H., 1953. The influence of testes biopsy on semen quality. *J. Dairy Sci.* 36, 1165–1171. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(53\)91614-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(53)91614-2)
- Carpi, A., Menchini Fabris, F.G., Palego, P., Di Coscio, G., Romani, R., Nardini, V., Rossi, G., 2005. Fine-needle and large-needle percutaneous aspiration biopsy of testicles in men with nonobstructive azoospermia: Safety and diagnostic performance. *Fertil. Steril.* 83, 1029–1033. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.09.027>
- Checa, J., Aran, J.M., 2020. Reactive oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes. *J. Inflamm. Res.* 13, 1057–1073. <https://doi.org/10.2147/JIR.S275595>
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3º edição. ed. Belo Horizonte.
- Dabaja, A.A., Schlegel, P.N., 2013. Microdissection testicular sperm extraction: An update. *Asian J. Androl.* 15, 35–39. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.141>
- Delfino, F.J., Boustead, J.N., Fix, C., Walker, W.H., 2003. NF- κ B and TNF- α stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00005-4)

- Dohle, G.R., Elzanaty, S., Van Casteren, N.J., 2012. Testicular biopsy: Clinical practice and interpretation. *Asian J. Androl.* 14, 88–93.
<https://doi.org/10.1038/aja.2011.57>
- Elzanaty, S., 2014. Varicocele repair in non-obstructive azoospermic men: Diagnostic value of testicular biopsy-A meta-analysis. *Scand. J. Urol.* 48, 494–498.
<https://doi.org/10.3109/21681805.2014.932839>
- Faure, A., Bouty, A., O'Brien, M., Thorup, J., Hutson, J., Heloury, Y., 2016. Testicular biopsy in prepubertal boys: A worthwhile minor surgical procedure? *Nat. Rev. Urol.* 13, 141–150. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.312>
- Fedder, J., Marcussen, N., Fedder, M.D.K., Engvad, B., 2017. Testicular damage following testicular sperm retrieval: A ram model study. *Biomed Res. Int.* 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/2472805>
- Forrester, S.J., Kikuchi, D.S., Hernandez, M.S., Xu, Q., Griendling, K.K., 2018. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circ. Res.* 122, 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
- Giffin, J.L., Bartlewski, P.M., Hahnel, A.C., 2014. Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes. *Exp. Biol. Med.* 239, 1606–1618. <https://doi.org/10.1177/1535370214543063>
- Giffin, J.L., Franks, S.E., Rodriguez-Sosa, J.R., Hahnel, A., Bartlewski, P.M., 2009. A study of morphological and haemodynamic determinants of testicular echotexture characteristics in the ram. *Exp. Biol. Med.* 234, 794–801.
<https://doi.org/10.3181/0812-RM-364>
- Hakovirta, H., Syed, V., Jégou, B., Parvinen, M., 1995. Function of interleukin-6 as an

- inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108, 193–198. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03475-M](https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03475-M)
- Harrington, T.G., Schauer, D., Gilbert, B.R., 1996. Percutaneous testis biopsy: an alternative to open testicular biopsy in the evaluation of the subfertile man. *J. Urol.* 156, 1647–1651. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)65473-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)65473-9)
- Heath, A.M., Carson, R.L., Purohit, R.C., Sartin, E.M., Wenzel, J.G.W., Wolfe, D.F., 2002a. Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 507–512. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.220.507>
- Heath, A.M., Pugh, D.G., Sartin, E.A., Navarre, B., Purohit, R.C., 2002b. Evaluation of the safety and efficacy of testicular biopsies in llamas. *Theriogenology* 58, 1125–1130. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00944-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00944-5)
- Hussein, A., 2013. Evaluation of diagnostic testis biopsy and the repetition of testicular sperm extraction surgeries in infertility patients. *Fertil. Steril.* 100, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.022>
- Ibănescu, I., Leiding, C., Ciornei, Ș. G., Roșca, P., Sfartz, I., & Drugociu, D., 2016. Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 166, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.005>
- Kastelic, J.P., Brito, L.F.C., 2012. Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 45–51. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02042.x>
- Kastelic, J.P., Cook, R.B., Coulter, G.H., 1996. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. *Reproduction* 108,

81–85. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1080081>

- Kastelic, J.P., Thundathil, J.C., 2008. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 368–373.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01186.x>
- Li, M.W.M., Xia, W., Mruk, D.D., Wang, C.Q.F., Yan, H.H.N., Siu, M.K.Y., Lui, W.Y., Lee, W.M., Cheng, C.Y., 2006. Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J. Endocrinol.* 190, 313–329.
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06781>
- Li, Y., Zhou, Q., Hively, R., Yang, L., Small, C., Griswold, M.D., 2009. Differential gene expression in the testes of different murine strains under normal and hyperthermic conditions. *J. Androl.* 30, 325–337.
<https://doi.org/10.2164/jandrol.108.005934>
- Lin, T., Wang, D., Stocco, D., 1998. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis without affecting steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid or protein levels. *J. Endocrinol.* 156, 461–467.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1560461>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lunstra, D.D., Echtenkamp, S.E., 1988. Repetitive testicular biopsy in the ram during pubertal development. *Theriogenology* 29, 803–810.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90217-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90217-8)

- Lysiak, J.J., 2004. The role of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-9>
- Malama. E., Zeron, Y., Janett., E., Siuda, M., Roth., Z., Bollwein, H., 2017. Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology* 87, 79–90.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.002>
- Manning, M., Jünemann, K.P., Alken, P., 1998. Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Lancet* 352, 37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79518-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79518-0)
- Meyers-Wallen, V.N., 1991. Clinical approach to infertile male dogs with sperm in the ejaculate. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 21, 609–633.
[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50063-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50063-2)
- National research council (NRC), 2015. Nutrient Requirements of Beef Cattle, 8th Revised Edition, 8th ed. National Academies Press, Washington, D.C.
<https://doi.org/10.17226/19014>
- Nehar, D., Mauduit, C., Boussouar, F., Benahmed, M., 1997. Tumor necrosis factor- α -stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 138, 1964–1971.
<https://doi.org/10.1210/endo.138.5.5098>
- Orazizadeh, M., Khorsandi, L.S., Hashemitabar, M., 2010. Toxic effects of

- dexamethasone on mouse testicular germ cells. *Andrologia* 42, 247–253.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.00985.x>
- Papa, F.O., Leme, D.P., 2002. Testicular fine needle aspiration cytology from a stallion with testicular degeneration after external genitalia trauma. *J. Equine Vet. Sci.* 22, 121–124. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(02\)70124-X](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(02)70124-X)
- Ramanathan, S., Dogra, V., 2018. Current status of percutaneous testicular biopsy for focal lesions. *Abdom. Radiol.* 43, 3125–3131. <https://doi.org/10.1007/s00261-018-1560-x>
- Riccioli, A., Starace, D., D'Alessio, A., Starace, G., Padula, F., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., 2000. TNF- α and IFN- γ Regulate Expression and Function of the Fas System in the Seminiferous Epithelium. *J. Immunol.* 165, 743–749. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.743>
- Rizzoto, G., Ferreira, J.C.P., Codognoto, V.M., Oliveira, K.C., Mogollón García, H.D., Pupulim, A.G.R., Teixeira-Neto, F.J., Castilho, A., Nunes, S.G., Thundathil, J.C., Kastelic, J.P., 2020. Testicular hyperthermia reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls. *Theriogenology* 152, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.029>
- Ron-El, R., Strauss, S., Friedler, S., Strassburger, D., Komarovsky, D., Raziel, A., 1998. Serial sonography and colour flow Doppler imaging following testicular and epididymal sperm extraction. *Hum. Reprod.* 13, 3390–3393. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.12.3390>
- Sarkar, O., Mathur, P.P., Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2008. Interleukin 1 Alpha (IL1A) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat. *Biol. Reprod.* 78, 445–454.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064501>

Sartori, R., Prestes, N.C., Canavessi, A.M.O., Curi, P.R., Bergfelt, D.R., 2002.

Testicular biopsy with Tru-Cut needle in conjunction with fibrin adhesive or nylon suture: Assessment of post-biopsy testicular function in rams. *Small Rumin. Res.* 45, 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00108-6](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00108-6)

Schlegel, P.N., Su, L.M., 1997. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum. Reprod.* 12, 1688–1692.

<https://doi.org/10.1093/humrep/12.8.1688>

Steele, E.K., Ellis, P.K., Lewis, S.E.M., McClure, N., 2001. Ultrasound, antisperm antibody, and hormone profiles after testicular Trucut biopsy. *Fertil. Steril.* 75, 423–428. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01700-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01700-3)

Syed, V., Stephan, J.P., Gerard, N., Legrand, A., Parvinen, M., Bardin, C.W., Jégou, B., 1995. Residual bodies activate sertoli cell interleukin-1 α (il-1 α) release, which triggers il-6 production by an autocrine mechanism, through the lipoxigenase pathway. *Endocrinology* 136, 3070–3078.

<https://doi.org/10.1210/endo.136.7.7789334>

Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., Lotze, M.T., 2012. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 249, 158–175.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>

Týč, J., Klingbeil, M.M., Lukeš, J., 2015. Mitochondrial Heat Shock Protein machinery Hsp70/Hsp40 is indispensable for proper mitochondrial DNA maintenance and replication. *MBio* 6. <https://doi.org/10.1128/mBio.02425-14>

Yu, B., Huang, Z., 2015. Variations in antioxidant genes and male infertility. *Biomed*

Res. Int. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/513196>