

DANIELA FRANCO DA SILVA

**ALTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES
INDUZIDAS PELO CHOQUE TÉRMICO
EM ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes

BOTUCATU

2017

DANIELA FRANCO DA SILVA

**ALTERAÇÕES CELULARES E MOLECULARES
INDUZIDAS PELO CHOQUE TÉRMICO
EM ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Doutora em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes

BOTUCATU

2017

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

Silva, Daniela Franco da.

Alterações celulares e moleculares induzidas pelo choque térmico em espermatozoides bovinos / Daniela Franco da Silva. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fabiola Freitas de Paula Lopes
Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Transtornos de estresse por calor. 3. Espermatozoides. 4. Fertilização in vitro. 5. Stress oxidativo. 6. MicroRNAs.

Palavras-chave: Bos taurus taurus; Choque térmico; Espermatozoide; Estresse oxidativo; Fertilização in vitro.

FOLHA DE AVALIAÇÃONome: **SILVA, Daniela Franco da**Título: **Alterações celulares e moleculares induzidas pelo choque térmico em espermatozoides bovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Doutora em Farmacologia e Biotecnologia.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por sempre estar ao meu lado guiando o meu caminho.

À minha mãe **Neuzina**, minha amiga, pelo incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Companheira de toda a vida e de todos os experimentos realizados de madrugada. Não teria conseguido terminar esta etapa sem as suas palavras de apoio e carinho. Pessoa que me ensinou a valorizar, ajudar e principalmente respeitar o próximo sem esperar nada em troca.

Ao meu marido **Oleksandr**, pelas longas conversas via whatsapp durante os experimentos de madrugada, principalmente pelo incentivo e todo amor e paciência durante esta etapa.

À minha orientadora, Profa Dra **Fabíola Freitas de Paula Lopes** pelo suporte, correções e incentivo. Por ter dado a oportunidade de realizar uma etapa tão importante da minha vida. Por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa sem pedir referências, apenas por confiar em mim. Agradeço a chance de aprender novas técnicas, conhecer pessoas com visões, áreas e pesquisas diferentes das quais eu já estava habituada. Sou muito grata por ampliar o meu conhecimento na área da pesquisa.

À **Universidade Estadual Paulista (UNESP), seu corpo docente, administração e direção** pela oportunidade de conclusão deste curso e por permitir levar no meu currículo, o nome de uma instituição de méritos e ética.

Ao **Programa de Pós graduação em Farmacologia e Biotecnologia do IB-UNESP -Botucatu** por ter podido fazer parte desta família. `

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À todos os colegas e funcionários do **IB-Farmacologia e Biotecnologia**

À **Universidade Federal de São Paulo - Unifesp (Eldorado-Diadema)** por ser a minha segunda casa durante esses quatro anos.

Aos colegas do Laboratório 28 da UNIFESP (Eldorado-Diadema), **Thaís, Larissa, Weber e Flávia** por toda a colaboração, auxílio e boa convivência. Àqueles que já saíram do lab, **Débora, Janahi e Cássia** sinto falta de vocês. Ao **Pedro**, que foi o caminho para que eu chegasse até o Lab 28. E todos os ICs que já passaram ou estão no lab, **Letícia, Jú Lopes, Barbara, Juliana, Rayana, Andreia, Giulia, Natália, Isabele, Thais, Leonardo e Glauca**.

Aos colegas e professores do **Laboratório 27 da UNIFESP (Eldorado-Diadema)**, Pamela, Bruna, Paty, professora Dra. Luciana e professora Dra. Monica, pelo bom relacionamento, auxílio em experimentos e educação.

Ao Laboratório 23 UNIFESP (Eldorado-Diadema), em especial à **professora Dra Mariele e todo o seu grupo de pesquisa**, muito obrigada pelas boas conversas e auxílio em experimentos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta formação, o meu muito obrigada.

"Coragem é a resistência ao medo, o domínio do medo - não a ausência do medo"

Mark Twain

RESUMO

A função do espermatozoide pode ser comprometida por condições ambientais adversas. Estudos já demonstraram que a exposição *in vivo* e *in vitro* de espermatozoides bovinos a temperatura elevada induz a morte celular, reduz a motilidade espermática e o potencial fertilizante do espermatozoide. No entanto, as alterações celulares induzidas pelo choque térmico em espermatozoides bovinos ainda são controversas. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito do choque térmico em espermatozoides de touros holandeses na motilidade espermática, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade mitocondrial, atividade de caspase, potencial de fertilização, cinética e desenvolvimento embrionário pré-implantacional. As amostras de sêmen foram descongeladas e submetidas ao gradiente de Percoll. Na amostra controle (sem incubação) os espermatozoides foram avaliados imediatamente após o gradiente de Percoll. Posteriormente, as amostras foram incubadas à 35 °C (Controle da temperatura testicular), 38,5 °C (temperatura corporal) e 41 °C (choque térmico) por 4 horas. O choque térmico de 41 °C reduziu a motilidade espermática após 2 h de incubação em comparação com 35 e 38,5 °C. A exposição de espermatozoides a diferentes temperaturas aumentou a produção de EROs, sendo este efeito mais acentuado no grupo 41°C em relação aos demais tratamentos. O aumento das EROs em espermatozoides submetidos ao choque térmico foi seguido da redução na atividade mitocondrial espermática e aumento na atividade de enzimas caspases. A exposição de espermatozoides ao choque térmico também reduziu o potencial fecundante do espermatozoide, alterou a cinética de desenvolvimento de embriões de 2-células, a cinética da clivagem embrionária e o desenvolvimento a blastocisto. Em conclusão, a exposição de espermatozoides de touros holandeses ao choque térmico desencadeou o estresse oxidativo, alterações celulares compatíveis com apoptose e comprometeu o desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Sperm function can be compromised by adverse environmental conditions. It has been demonstrated that *in vivo* and *in vitro* exposure of bovine sperm to elevated temperature induces cell death, reduces sperm motility and fertilizing potential. However, the role of heat shock on sperm apoptosis still controversial. Therefore, the objective of this study was to determine the effect *Holstein* sperm heat shock on sperm motility, oxidative stress production, mitochondrial activity, caspase activity, fertilizing potential and subsequent preimplantation embryonic development. Frozen-thawed *Holstein* sperm were subjected to control (non-incubation: sperm were evaluated immediately after Percoll gradient) and incubation at 35°C (testicular temperature control), 38.5°C (body temperature) and 41°C (heat shock) for 4 hours. Heat shock reduced sperm motility after 3 and 4 h incubation at 41°C as compared to 35 and 38.5°C. Sperm mitochondrial activity was reduced by 38.5 and 41°C when compared to control. Heat shock also increased caspase activity after 41°C incubation for 4 hours as compared to 35°C and control. When sperm were incubated at different temperature for 4 h, there was a evidence enhance in ROS quantity induced by heat stress. Initial cleavages, evaluated as 2-cell embryo, were more expressive at 35 hpi when compared with other times of evaluation. Total cleavage was also more significant at 35 hpi.. The percentage of oocytes fertilized, cleaved and that reached the 2-cell and blastocyst stage was reduced by 41°C when compared to 35°C and control. There was no differences between 38.5 and 41°C for these variables. In conclusion, exposure of *Holstein* sperm to heat shock during 4 hours reduced sperm function as compared to sperm at testicular temperature.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	íon cálcio
CCCP	carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxiribonuclease
dsRBD	domínio de ligação de RNA de fita dupla
EROs	espécies reativas de oxigênio
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
g	Gramma
h	Hora
hpi	Horas após inseminação
H33342	hoeschst 33342
HSP	proteína do choque térmico
HSF1	fator choque térmico 1
HSF2	fator de choque térmico 2
IPCC	intergovernmental Panel on Climate Change
L	Litro
Lh	hormônio luteinizante
M	Molaridade
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mg	Miligrama
Mg	Magnésio
mM	Milimolar
micro RNA	miRNA
min	Minuto
MMP	potencial de membrana mitocondrial
mL	Mililitros

nmol	Nanomolar
Pol II	RNA polimerase II
pri-miRNA	miRNA primário
PMRs	Protaminas
TNPs	proteínas de transição
RISC	complexo de silenciamento
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RT - PCR	reação em cadeia de polimerase em tempo real
SAS	statistical analysis system
Talp	tyrode's albumin-lactate-pyruvate
T-GIST	transfecção de células germinativas intactas dos túbulos seminíferos
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UR	umidade relativa
μl	Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
β	Beta
%	Porcentagem
×	Vezes
10 ⁶	Milhões
: para	(1:1)
®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
-	menos / negativo
+	mais/positivo
=	Igual
°	Grau

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Espermatogênese em touros.....	17
2.2	A célula espermática.....	19
2.3	Estresse térmico em touros.....	20
2.4	Estresse térmico na reprodução de touros.....	22
2.5	Choque térmico em espermatozoides.....	25
2.6	Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em espermatozoides.....	27
2.7	Apoptose em espermatozoides.....	28
2.8	Desenvolvimento embrionário inicial.....	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivo Específico.....	32
4	HIPÓTESE	32
	Referências.....	33
3	Capítulo 1	45

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é o país com o segundo maior rebanho bovino do mundo e o maior exportador de carne desde 2004 (Brasil, 2012/2013 a 2022/2023). Também é considerado um grande produtor mundial de leite bovino e sua projeção de crescimento está em torno de 1,9% ao ano (Brasil, 2012/2013 a 2022/2023).

Em sistemas de pecuária extensiva, a presença física dos touros corresponde a apenas 5% do total de animais. No entanto, na cadeia produtiva da bovinocultura, um macho é responsável por mais de 70% do melhoramento genético do rebanho (Ferreira *et al.*, 2009).

Por centenas de milhares de anos a evolução das subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* ocorreu sob diferentes condições ambientais (Hansen, 2004). Os bovinos taurinos evoluíram em clima temperado e não foram expostos ao desafio dos estresses presentes nas regiões tropicais, sendo pouco produtivos nestes ambientes. Todavia, os zebuínos evoluíram nos trópicos na presença de elevadas cargas de calor, de doenças tropicais e de alto desafio de parasitas internos e externos (Assis, 2007). Ademais, esses animais tendem a ter uma menor exigência nutricional e a responder melhor do que animais *Bos taurus taurus* em ambientes com certo grau de restrição nutricional (Medeiros e Vieira, 1997). Entretanto, os bovinos em condições de estresse térmico, induzidos artificialmente quanto naturalmente pela estação do ano, apresentam inibição da secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas). Como consequência, na hipófise anterior, há a queda na liberação de LH (hormônio luteinizante) e de FSH (hormônio folículo estimulante). A diminuição na liberação das gonadotrofinas (LH e FSH) afeta produção de estrógenos, acarretando vários problemas de ordem reprodutiva no macho e na fêmea (Butler *et al.*, 2003; De Rensis e Scaramuzzi, 2003)

Grande parte dos animais de produção apresentam perda de sua performance reprodutiva com o aumento de 1 °C na temperatura retal (MCDowell *et al.*, 1976). Este aumento de temperatura quando nas primeiras 12 h após inseminação artificial diminui a fertilização em cerca de 16% e aumenta a taxa de mortalidade embrionária de 45 para 61% entre os dias 35 e 42 de gestação (Ulberg e Burfening, 1967). Assim, em vacas lactantes a exposição em temperaturas e umidade elevadas causa hipertermia, resultando em estresse térmico e diminuição dos índices de gestação (Al-katanani *et al.*, 1999). Nestas condições, os animais podem atingir e até ultrapassar temperaturas retais de 41

°C (Ealy et al., 1993) estando esta temperatura associada à baixa taxa de prenhez (Ulberg e Burfening, 1967).

A infertilidade ou sub-fertilidade de touros é um dos principais problemas em criação animal, pois tem um impacto significativo sobre o desempenho reprodutivo do rebanho. Os efeitos das mudanças climáticas e do aquecimento global afetam imensamente a saúde dos bovinos (Nardone *et al.*, 2010). As altas temperaturas típicas do Brasil promovem o aumento da temperatura corporal em animais de aptidão para a produção de leite e carne, o que resulta em diminuição da produtividade e fertilidade (Hansen, 2009).

Entre as diversas causas que provocam a diminuição do desempenho reprodutivo de touros, destacam-se as condições ambientais adversas (Hansen, 2009). Segundo Skinner Louw (1966), a temperatura ambiente crítica para prejuízo na espermatogênese em touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* está entre 27 °C e 32 °C. Estas temperaturas causam estresse térmico levando ao aumento da temperatura escrotal e testicular com consequente degeneração testicular (Waites, 1970).

Estudos utilizando modelo de insulação escrotal demonstraram que o aumento da temperatura escrotal causa erros na espermatogênese com aumento na produção de espermatozoides anormais, redução da motilidade e comprometimento da maturação espermática. Nestes estudos, as alterações espermáticas ocorreram 12 a 14 dias após a exposição do animal ao estresse térmico, permanecendo por 26 a 90 dias pós-insulação escrotal, dependendo da severidade de estresse térmico ao qual os animais foram submetidos (Setchell, 1998). Além disto, a insulação escrotal reduziu o número total de espermatozoides ejaculados possivelmente devido reabsorção dos espermatozoides com defeitos morfológicos no epidídimo e ductos deferentes. No entanto, o número de espermatozoides ejaculados retornou aos valores experimentais iniciais após a remoção da insulação escrotal (Setchell, 1998). Nestes estudos, as taxas de clivagem demonstraram-se semelhantes quando oócitos foram fecundados com espermatozoides de touros pré-insulação e nos dias 7 e 14 pós- insulação. No entanto, as taxas de blastocisto foram reduzidas quando os oócitos foram fecundados com espermatozoides coletados no dia 14 e 21 pós-insulação (Fernandes *et al.*, 2008). Além de reduzir a capacidade fecundante do espermatozoide, o estresse térmico também aumentou as taxas de blastômeros positivos para apoptose após a fecundação de oócitos com sêmen coletado de touros submetidos à insulação escrotal de 48 horas (Walters *et al.*, 2005).

Os efeitos diretos da temperatura elevada na função espermática também já foram demonstrados em experimentos *in vitro* (choque térmico). A exposição de espermatozoides bovinos as temperaturas entre 41 a 43 °C reduziram a viabilidade espermática em função do tempo de exposição quando comparados ao controle 39 °C. A exposição dos espermatozoides a temperatura de 41 °C por 3 ou 4 horas, levou a diminuição da motilidade espermática. As temperaturas de 41 °C e 42 °C reduziram a velocidade espermática, enquanto que a temperatura de 43 °C reduziu significativamente a viabilidade e motilidade dos espermatozoides (Monterroso *et al.*, 1995). No entanto, não foram observadas diferenças na resistência ao choque térmico entre espermatozoides *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* (Chandolia *et al.*, 1999).

O efeito deletério do choque térmico na capacidade fecundante do espermatozoide e na capacidade de produzir embriões depende da intensidade do estresse (Chandolia *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2014). A incubação de espermatozoides à 38,5 °C e 40 °C por 4 horas diminuiu a motilidade espermática em ambos os grupos, sendo esta redução mais severa na temperatura de 40 °C. Outrossim, a incubação dos espermatozoides a 40 °C por 4 horas não afetou as taxas de fecundação, clivagem e desenvolvimento a blastocisto (Hendricks *et al.*, 2009). Entretanto, quando espermatozoides foram submetidos ao choque térmico de 41 °C por 4 horas houve redução na porcentagem de células espermáticas com motilidade progressiva, na integridade de membrana plasmática, no potencial de membrana mitocondrial, na proporção de oócitos fecundados (formação de pró-núcleos), clivados e que atingiram o estágio de blastocisto (Rahman *et al.*, 2014).

Deste modo, a infertilidade causada pelo estresse térmico é um problema de ordem multifatorial, pois afeta as funções fisiológicas e celulares em vários tecidos. No que diz respeito à função reprodutiva do touro, o estresse térmico causa erros na espermatogênese com aumento na produção de espermatozoides anormais, comprometimento da maturação espermática no epidídimo e redução da motilidade (Setchell, 1998). Já no trato reprodutor da vaca o estresse térmico compromete o crescimento folicular (Badinga *et al.*, 1993; Wolfenson *et al.*, 1995), a função do endométrio (Malayer *et al.*, 1988), o fluxo sanguíneo para o útero (ROMAN-PONCE *et al.*, 1978) além de reduzir a taxa de fertilização e aumentar a morte embrionária (Ulberg e Burfening, 1967). Com tal características, o intuito deste trabalho foi avaliar o efeito do trato reprodutor da vaca no choque térmico de espermatozoides de touros holandeses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatogênese em touros

O desenvolvimento do gameta masculino é um programa de diferenciação complexo que produz espermatozoides altamente especializados (Hess e Renato De Franca, 2008). Este processo chamado de espermatogênese é caracterizado como uma etapa de divisão e diferenciação, através do qual, os espermatozoides são produzidos em túbulos seminíferos dos testículos (Johnson *et al.*, 2000).

Durante o desenvolvimento embrionário, células especiais chamadas células germinativas primordiais migram da direção do saco vitelínico do embrião para as gônadas indiferenciadas. Depois de atingir a gônada fetal, as células primordiais dividem-se várias vezes antes de formar as células chamadas gonócitos. No macho, estes gonócitos parecem sofrer uma diferenciação imediatamente antes da puberdade para formar o tipo de espermatogônia A0 das quais originam-se outras células germinativas. O tipo de espermatogônia A1 divide-se progressivamente para formar o tipo A2, tipo A3 e tipo A4. O tipo A4 divide-se novamente para formar espermatogônias intermediárias (tipo In) e então novamente para formar o tipo B de espermatogônia. Este processo é chamado espermatocitogênese. Todo processo de espermatocitogênese divisional, desde espermatogônia até espermátide, leva aproximadamente 45 dias no touro. Todavia estas divisões são incompletas desde que pequenas pontes citoplasmáticas ou intercelulares ficam retidas entre a maioria das células de uma série ou de um “clone” de células germinativas de células de desenvolvimento (Bloom e Fawcett, 1975; Izadyar *et al.*, 2002).

A espermatogênese começa pouco depois do nascimento por proliferação das células espermatogoniais que se dividem por mitose para manter seus próprios números e para produzir espermátocitos primários, que dividem-se por meiose para produzir espermátocitos secundários. Estes sofrem meiose originando as espermátides arredondadas e haplóides que diferenciam-se (sem mais divisão) em espermatozoides maduros (Johnson *et al.*, 2000). As mudanças morfológicas, tais como a formação do acrossoma e flagelo, modelação nuclear e condensação da cromatina, ocorrem durante a diferenciação das espermátides arredondadas haplóides após a divisão meiótica (espermiogênese) (Yadav e Kotaja, 2014). A unidade estrutural básica da cromatina é o nucleossoma, composto de DNA envolvido em torno de várias proteínas de ligação

chamadas histonas. A cromatina é fortemente compactada com a ajuda de protaminas espermáticas que substituem a maioria das histonas permitindo uma proteção mais eficiente do DNA. As histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4) são pequenas proteínas básicas que permitem a compactação do DNA genômico eucariótica nos núcleos. Como resultado da espermiogênese, os espermatozoides são equipados com todas as estruturas necessárias para as suas funções potenciais. Os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos, nos quais posteriormente, se direcionam para o epidídimo. O trânsito dos espermatozoides através do longo ducto epididimário é importante para a sua maturação final e aquisição da capacidade de motilidade espermática (Yadav e Kotaja, 2014).

No touro, as fases de divisão mitótica, meiótica e a espermiogênese caracterizadas por divisões e/ou a diferenciações em espermatogônias, espermatócitos e espermátides tem duração de 21, 23 e 17 dias, respectivamente, resultando em 61 dias (Rp, 1970).

As células germinativas localizadas no compartimento basal do epitélio seminífero proporcionam uma fonte de células indiferenciadas que permitem a produção de espermatozoides ao longo de todo o período de maturidade sexual (De Rooij e Russell, 2000). Curiosamente, estudos recentes têm conseguido gerar células estaminais embrionárias totipotentes a partir de células estaminais germinais masculinas (Fagoonee *et al.*, 2011). Portanto, as células germinativas masculinas isoladas dos testículos adultos podem oferecer uma ferramenta poderosa para a medicina regenerativa (Björk *et al.*, 2010).

A diferenciação das células germinativas masculinas é coordenada por padrões de expressão de genes específicos, que são rigidamente controlados ao nível transcricional e pós-transcricional. A regulação pós-transcricional de RNA mensageiros (RNAm) codificadores de proteínas torna-se proeminente durante os passos finais da espermatogênese, quando o núcleo do espermatozoide compactado torna transcionalmente inativo (Yadav e Kotaja, 2014). Os miRNAs são reguladores importantes da expressão de genes que funcionam principalmente pós-transcionalmente para controlar as propriedades dos seus RNAm alvo (Bartel, 2004). Assim, as células germinais masculinas expressam diversas classes de pequenos RNAs, incluindo miRNAs Dicer dependentes (Romero *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012) e pequenos RNAs endógenos de interferência (endo-siRNAs) (Wu *et al.*, 2012) bem

como RNAs piwi de interação Dicer-independentes (piRNAs) (Chuma e Nakano, 2013).

Estudos demonstram que o fator de transcrição ao choque térmico 2 (HSF2) codifica uma proteína que se liga especificamente ao elemento de choque térmico que é constitutivamente expresso durante o desenvolvimento embrionário (Sarge *et al.*, 1991); (Pirkkala *et al.*, 2001). No entanto, as funções do HSF2 não se limitam apenas a embriogênese. Em ratos adultos, HSF2 é expresso no núcleo meiótico e na diferenciação de espermatócitos e espermátides arredondadas (Kallio *et al.*, 2002).

Os alvos moleculares do HSF2 durante a espermatogênese foram identificados ao nível de todo o genoma, por Akerfelt *et al.* (2008). A imunoprecipitação de alta resolução da cromatina (*CHIP-on-chip*) utilizando a análise de microarray para avaliar locais em que o HSF2 está vinculado nos testículos de ratos adultos, demonstrou que o HSF2, interage principalmente no cromossomo Y de ratos. Alguns de seus genes-alvo (*Ssty2 e Sly*) fazem parte de grupos de genes multi-cópia na região macho-específica do braço longo do cromossomo Y (*MSYq*) de ratos, que são expressos exclusivamente durante a espermatogênese. Assim, este estudo demonstrou que a supressão da região *MSYq* provoca defeitos na cabeça do espermatozoide e na fertilidade de ratos.

O fator de transcrição HSF2, expresso em células germinativas, parece atuar diretamente em genes que controlam a espermatogênese. Entre estes genes (*WTI, RHOX5 e SOX8*) estão os que são expressos nas células de Sertoli e em células pós-mitóticas nos testículos adultos para interagirem com o desenvolvimento das células germinativas dos túbulos seminíferos, além de serem importantes para todos os estágios da gametogênese masculina. Finalmente, um deles (*FOXII*) atua no epidídimo para controlar uma ou mais das fases finais de maturação espermática (Bettegowda e Wilkinson, 2010).

2.2 A célula espermática

Os espermatozoides são células que apresentam um forte flagelo para impulsioná-lo através de um meio aquoso. São livres de organelas citoplasmáticas, tais como os ribossomos, retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi, que são desnecessárias para a tarefa de entregar o DNA ao oócito (Gadella et al., 2008 e De Leeum et al., 1990). No entanto, os espermatozoides contêm muitas mitocôndrias

estrategicamente localizadas para fornecer energia de forma mais eficiente ao flagelo (Jhon, 2002)

Apresenta-se como uma célula altamente diferenciada delimitadas pela membrana plasmática, possuindo uma cauda, a qual impulsiona o espermatozoide ao oócito e a cabeça, que contém um núcleo haplóide condensado (Alberts, 1994; Dukes, 1988). A cabeça, a peça intermediária e a cauda do espermatozoide são divididas pelo anel posterior e pela estrutura do *annulus* (Gadella *et al.*, 2008). A peça intermediária é um segmento que possui de 5 a 7 μm de comprimento e em torno de 1 μm de espessura. Inicia-se da base final da cabeça do espermatozoide e termina no *annulus* (ou anel de Jensen, é uma estrutura firmemente aderida à membrana plasmática do flagelo). Contém a porção inicial do flagelo com seu axonema (nove pares de microtúbulos periféricos mais dois microtúbulos centrais), as nove fibras densas e uma bateria mitocondrial, sendo esta última responsável pelo fornecimento de energia para a propulsão do espermatozoide. A peça principal estende-se do *annulus* até praticamente o final da cauda. Seu comprimento gira em torno de 45 μm (Garcia e Fernández, 2001). Estas estruturas funcionam como uma barreira juncional para as trocas lipídicas entre a cabeça e a peça intermediária e desta com a cauda. A superfície da cabeça do espermatozoide possui no mínimo quatro regiões identificadas: a área apical, a área pré-equatorial, a equatorial e a pós-equatorial, sendo que a cabeça do espermatozoide, não contém barreiras juncionais para manter estas regiões (De Leeuw *et al.*, 1990). No entanto, sabe-se que cada uma das regiões da superfície da cabeça do espermatozoide tem papéis específicos que permitem a fertilização do oócito. Dois terços anteriores do núcleo estão cobertos pelo acrossoma limitado por uma membrana contendo enzimas que facilita a penetração do espermatozoide no oócito é dedicada à zona pelúcida, uma área da superfície da cabeça do espermatozoide que está envolvida na reação acrossomal (fusão intracelular), enquanto que outra região está envolvida na ligação com a membrana plasmática e a fusão com oócito (a fusão da membrana intercelular) (Gadella *et al.*, 2008).

2.3 Estresse térmico em touros

As mudanças climáticas, definidas como uma série de alterações meteorológicas de longo prazo, como a temperatura, radiação solar e vento podem ser consideradas uns dos principais desafios para a humanidade neste século (Hansen, 2004). Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudança Climática (*Intergovernmental Panel on Climate Change-IPCC*) a temperatura média da atmosfera aumentou em $0,6\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ durante o século XX e, se mantido o crescimento atual dos níveis de poluição da atmosfera, a temperatura global aumentará de 1,4 a 5,8 °C entre 1900 e 2100, o que resultará em extinções em massa e devastação em áreas costeiras (Marengo, 2006) .

O estresse térmico é definido como o aumento de calor corporal que altera o equilíbrio fisiológico, metabólico, celular e molecular. Sendo esse calor uma função da quantidade de calor produzido pelo animal e da quantidade de calor trocado com o ambiente (Armstrong, 1994). No Brasil, o clima predominantemente tropical e subtropical que se caracteriza por temperatura ambiental elevada ao longo de todo ano, pode resultar em estresse térmico, que compromete a produtividade e a fertilidade dos animais de interesse zootécnico (Hansen, 2009).

Estudos demonstraram que bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*) são mais adaptados aos ambientes tropicais quando comparados aos animais taurinos (*Bos taurus taurus*). Estas diferenças estão associadas às características genotípicas e fenotípicas inerentes as diferentes raças (Ferreira *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2003). Os *Bos taurus indicus* foram selecionadas naturalmente para as condições de ambiente tropical, que se caracteriza por apresentar elevadas temperaturas. A faixa de temperatura de conforto térmico dos zebuínos varia de 10 a 27 °C, com temperatura crítica superior de 35 °C e inferior de 0 °C (Pereira, 2005). Os zebuínos possuem características anatômicas e mecanismos de termorregulação muito eficientes na dissipação de calor, o que torna estes animais mais resistentes a temperaturas elevadas (Hansen, 2009).

No entanto, as raças de origem européia *Bos taurus taurus*, foram selecionadas ao longo de centenas de anos para condições de clima temperado. A faixa de temperatura de conforto térmico das raças européias varia de 0 a 16 °C, com temperatura crítica superior de 27 °C e inferior de -10 °C (Pereira, 2005). Dessa forma, em condições de clima tropical as raças européias sofrem estresse térmico, uma vez que suas características anatômicas e mecanismos de termorregulação são ineficientes na

dissipação de calor, o que leva ao aumento da temperatura corporal (Skinner e Louw, 1966).

Nos bovinos a temperatura fisiológica corporal pode variar normalmente entre 36,7 °C a 39,1 °C, com média de 38,3 °C. Para os mamíferos que possuem os testículos alojados em bolsas escrotais pendulares, inclusive touros, a espermatogênese normal é dependente da manutenção da temperatura testicular de 2 a 6 °C mais baixa que a temperatura corpórea. Sabe-se que existe um gradiente de temperatura na bolsa escrotal e nos testículos, que aumenta quanto mais distante estiver a estrutura à cavidade abdominal. A temperatura média da superfície escrotal de touros é de 30,4 °C (pólo dorsal), 29,8 °C (região média) e 28,8 °C (pólo ventral) (Kastelic *et al.*, 1997). Assim, é bem conhecido que o aumento da temperatura testicular reduz a qualidade do sêmen, podendo resultar em um quadro de degeneração testicular, doença ocasionada, entre muitos fatores, por qualquer processo que determine a elevação da temperatura testicular (Waites, 1970).

2.4 Estresse térmico na reprodução de touros

Pesquisas demonstraram que a exposição de touros ao estresse térmico *in vivo* resulta no aumento da temperatura escrotal e testicular, o que diminui a qualidade do sêmen, a morfologia espermática com um maior número de espermatozoides com problemas de cauda, a motilidade e o perfil bioquímico espermático reduzindo a capacidade fecundante do espermatozoide e comprometendo o desenvolvimento de embriões gerados a partir de gametas anormais (Brito *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006); (Pezzini *et al.*, 2006).

A avaliação do estresse térmico na função reprodutiva de bovinos tem sido amplamente estudada com modelo experimental de insulação escrotal (Brito *et al.*, 2003). O modelo de insulação escrotal é realizado com o uso de uma bolsa térmica produzida externamente com material impermeável à água e internamente com material isolante térmico, com o intuito de evitar a dissipação de calor do testículo para o ambiente (Garcia, 2004).

Quando touros *Bos taurus taurus* (Holandês) e *Bos taurus indicus* (Curraleiro) foram submetidos a insulação escrotal com aplicação de uma bolsa térmica nos testículos por 48 horas houve redução significativa da motilidade espermática. Neste experimento, a fase pós-insulação correspondeu ao período após a retirada da bolsa

térmica dos animais, em que se procedeu à avaliação andrológica completa nos touros. Os valores obtidos no período pós-insulação foram comparados aqueles do período de pré-insulação. No dia 16 após insulação escrotal o vigor espermático foi reduzido em touros da raça Holandesa, chegando a 50% a menos que os valores pré-insulação. Os touros da raça Curraleira revelaram apenas uma discreta variação no vigor espermático, não havendo influência da insulação escrotal. Houve diferença na porcentagem de espermatozoides anormais, quando comparadas as duas raças estudadas. Touros da raça Curraleira apresentaram, ao redor do 16º dia após a insulação escrotal, valores máximos de espermatozoides anormais no ejaculado. Já na raça Holandesa, este valor manteve-se acima de 30% de anormalidades espermáticas, entre o 16º e 44º dia após a insulação. Os autores observaram aumento significativo de gota citoplasmática proximal a partir do 23º dia, sendo um indicativo da alteração de espermátides ou mesmo de espermátócitos (Pezzini *et al.*, 2006).

Em estudos anteriores com animais taurinos, a insulação escrotal (48 h) resultou no aumento de espermatozoides anormais, com retorno aos parâmetros normais entre o 32º e o 42º dia após a insulação escrotal (Austin *et al.*, 1961; Vogler *et al.*, 1991); (Barth e Bowman, 1994). Em outros experimentos, verificou-se que a insulação escrotal em zebuínos, por períodos longos, de 96 e 168 horas, intensificou a redução na motilidade e morfologia espermática, e os animais necessitaram de 105 e 148 dias, respectivamente, para retornarem aos valores de normalidade (Fonseca e Chow, 1995); (Gabaldi, 1999).

Brito *et al.* (2003) desenvolveram modelos de insulação usando touros *Bos taurus indicus* (Nelore) e *Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus* (Canchim 5/8; Charolês 3/8; *Bos taurus indicus*). No experimento¹, os touros foram alocados nos grupos controle e insulação de todo o escroto por quatro dias. As concentrações espermáticas e o total de espermatozoide ejaculado foram maiores no controle, quando comparados ao grupo insulado no dia 0 e 14. A motilidade espermática foi reduzida a níveis muito baixos em touros insulados nos dias 11 e 31 pós insulação. Em geral, a motilidade espermática foi maior no grupo controle, que no grupo de insulado. A porcentagem de espermatozoides normais no tratamento insulado demonstrou-se baixa em relação ao período de pré-insulação e grupo controle a partir do dia 11. Os autores detectaram, patologias espermáticas como cabeças soltas (dia 11), defeitos de peça intermediária (dias 11 e 14), gotas proximais (dias 14, 18 e 27), vacúolos espermáticos

(dias 18 e 21), e defeitos no acrossoma (dias 27 e 31) nos touros insulados, em comparação ao período de pré-insulação e ao grupo controle. No experimento 2 os touros foram alocados nos grupos controle, insulação de todo o escroto e insulação *scrotal-neck* (apenas a região do cordão espermático). Da mesma forma as concentrações espermáticas e o total de espermatozoides ejaculados no período de pós-insulação foram maiores no controle, quando comparados ao insulado e *scrotal-neck* nos dias -4 e 0. A motilidade espermática apresentou-se reduzida entre os dias 21 e 31 após a insulação. No dia 24, a motilidade também foi mais baixa que os grupos controle e *scrotal-neck*. O *scrotal-neck* não afetou a motilidade espermática em touros *Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus*. A proporção de espermatozoides normais no grupo insulação escrotal foi mais baixa que no período de pré-insulação e que os grupos controle e *scrotal-neck* nos dias 14 a 25. O *scrotal-neck* não afetou significativamente a morfologia espermática. Outros estudos avaliando a relação entre os espermatozoides submetidos à insulação escrotal por 5 horas e sua habilidade de fertilização *in vitro* demonstraram que a frequência de clivagem dos oócitos foram similares entre os períodos de pré-insulação escrotal e nos dias 7 e 14 pós-insulação escrotal. No entanto, no dia 21 pós-insulação a taxa de clivagem dos oócitos foi menor quando comparado aos outros períodos. Não obstante, em relação às taxas de blastocistos, verificaram uma diminuição nos dias 14 e 21 pós-insulação escrotal, quando comparado ao período de pré-insulação escrotal. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que houve um aumento de espermatozoides morfologicamente anormais durante o período de 14 dias pós-insulação escrotal, sendo que os defeitos de cabeça e cromatina aumentaram significativamente quando comparados ao período pré-insulação escrotal (Fernandes *et al.*, 2008).

Sekoni e Gustafsson (1987) avaliaram os efeitos do estresse térmico sazonal nas anormalidades morfológicas em espermatozoides de touros (*Bos taurus taurus*). Neste experimento, as amostras de sêmen de 19 touros foram colhidas uma vez ao mês, por um período de um ano. Estes autores apontaram maior porcentagem de anormalidades na cabeça do espermatozoide e gota proximal, no período do verão, quando comparado com as demais estações do ano. Entretanto, a porcentagem de cabeças soltas foram mais significativas no inverno. Já, Gholami *et al.* (2011) avaliaram a qualidade do sêmen de touros *Bos taurus taurus* (*in natura* e descongelado) durante o período de estresse térmico, e verificaram diminuição significativa no volume de sêmen, na concentração

de espermática e na produção total de espermatozoides nas nove semanas de estudo. A suplementação dos animais com ômega 3 e ácidos graxos afetou positivamente a motilidade total e progressiva dos sêmen *in natura* após nove semanas. No entanto não foram observadas diferenças nos padrões de motilidade no sêmen descongelado.

Meyerhoeffer *et al.* (1985), avaliaram 16 touros da raça Angus em câmara climática com temperatura controlada por 8 semanas, a fim de determinar os efeitos do estresse térmico sobre características do sêmen. Câmaras climáticas são equipamentos usados para realizar a simulação de determinadas condições de temperatura e umidade. Estes equipamentos são utilizados em diversos segmentos industriais (farmacêutico e alimentício) e em instituições de pesquisas (universidades, laboratórios, etc.) para os mais diversos fins, tais como: sistemas de calibração, pesquisas sobre conforto térmico, estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos, ensaios de produtos (componentes eletrônicos, e dispositivos mecânicos) (Brionizio e Mainier; 2006). No grupo estressado a temperatura da câmara climática foi de 35 °C por oito horas e a 31 °C por 16 horas completando um total de 24 h. Os touros do grupo controle foram mantidos a 23 °C durante todo o experimento. As câmaras não tinham controle de umidade relativa (UR), que variou de 46 a 80% na câmara climática do grupo estressado e de 60 a 85% no controle. O estresse térmico aumentou a frequência respiratória e a temperatura retal dos animais, quando comparados com o controle. O volume de sêmen por ejaculado diminuiu no grupo estresse térmico durante a sexta semana de tratamento. A porcentagem de motilidade total e progressiva foram semelhantes em ambos os grupos na primeira e segunda semana de tratamento. No entanto, no grupo estressado a motilidade total foi reduzida duas semanas após o tratamento e a progressiva após quatro semanas. A porcentagem de espermatozoides móveis diminuiu de 76% (pré-tratamento) para 48% após o estresse térmico. A porcentagem de células espermáticas anormais foram maiores no grupo estressado em comparação ao controle, três a quatro semanas após o tratamento. De seis a oito semanas os touros estressados apresentaram cerca de 30% de espermatozoides com acrossoma alterado em comparação a 10% de anormalidades encontradas nos espermatozoides dos touros controle. Contudo, a recuperação da normalidade morfologia ocorreu de 3 a 8 semanas após o estresse térmico.

2.5 Choque térmico em espermatozoides

A exposição de espermatozoides bovinos as temperaturas entre 41 a 43 °C (choque térmico) reduziram a integridade da membrana plasmática em função do tempo de exposição (1 a 4 horas) quando comparados a população de espermatozoides a temperatura de 39 °C (grupo controle). Além disso, quando os espermatozoides foram submetidos à temperatura de 41 °C por 3 ou 4 horas apresentaram redução da motilidade espermática em relação ao controle não incubado. (Monterroso *et al.*, 1995; Chandolia *et al.*, 1999).

Maya-Soriano *et al.* (2013) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas *in vitro* (4 °C/temperatura de refrigeração, 22 °C/temperatura ambiente, 32 °C/temperatura do escroto e 41,5 °C/estresse térmico, por 3 horas) em espermatozoides de touros *Bos taurus taurus* e verificaram que a viabilidade espermática foi afetada principalmente pela temperaturas de 41,5 °C, demonstrando que o espermatozoide é sensível à temperaturas de choque térmico. Neste experimento, todos os grupos estudados apresentaram valores de motilidade total e progressiva baixas em comparação às amostras *in natura* (controle), muito embora, a queda mais significativa tenha sido observada na temperatura de 41,5 °C. A porcentagem de acrossoma reagido foi detectado em todos os grupos estudados. Nada obstante, este efeito foi mais acentuado nas amostras incubadas a 32 °C e a 41,5 °C em comparação ao controle. A porcentagem de integridade da membrana plasmática também foi afetada negativamente pelas temperaturas, sendo significativamente mais baixa para os grupos incubados a 4 °C, 32 °C e 41,5 °C em relação ao controle *in natura*. Ainda assim, não foram detectadas diferenças em termos de anormalidades morfológicas.

Hendricks *et al.* (2009) detectaram diminuição da motilidade em espermatozoides incubados por 4 horas nas temperaturas de 38,5 e 40 °C, em relação ao controle não incubado. Esta redução foi mais evidente a temperatura de 40 °C. Além disto, a incubação dos espermatozoides nestas temperaturas reduziu as taxas de clivagens. Entretanto, não foi observado o efeito da temperatura em relação à porcentagem de óocitos que se tornaram blastocistos ou na porcentagem de embriões clivados que se tornaram blastocistos.

Rahman *et al.* (2013) ao incubarem espermatozoides a temperatura de 38,5 °C e 41 °C por 4 horas verificaram redução da motilidade, da integridade da membrana plasmática e do potencial mitocondrial em comparação ao grupo controle (não

incubado). A redução destes parâmetros foram mais acentuados à incubação a 41 °C. Outrossim, observaram redução na proporção de oócitos fecundados (formação de pró-núcleos), clivados e que atingiram o estágio de blastocisto no grupo submetido a 41 °C em comparação ao controle. Da mesma forma, a qualidade do embrião foi negativamente afetada pela incubação de espermatozoides a 41 °C, indicado por uma maior proporção de apoptose celular em blastocistos D7 em comparação ao grupo controle. Os autores também encontraram redução da atividade da *Mitogen-activated protein kinase 14* (MAPK14) ao inibirem a via p38 da MAPK com um inibidor específico, quando os espermatozoides foram incubados à 38,5 e 41 °C. A hipótese dos autores era que a MAPK14 poderia ser ativada durante o choque térmico e estar relacionada com a via de sinalização para apoptose quando induzida pelo calor. Neste grupo experimental observaram o aumento da motilidade espermática, da atividade da *Mitogen-activated protein kinase 14* (MAPK14) e redução da fragmentação de DNA no grupo 41 °C em comparação ao grupo controle sem tratamento. Entretanto, não identificaram melhoras na fertilização e no desenvolvimento embrionário no grupo 41 °C em relação ao controle.

Chandolia *et al.* (1999) descreveram o efeito do choque térmico na função espermática de touros Brahman, mestiços Brahman, Angus e Holandês. Os espermatozoides pós descongelados foram submetidos à incubação em temperaturas de 38,5; 41 e 42 °C por 4 horas. Os autores identificaram redução da motilidade e da velocidade de trajeto a temperatura de 41 e 42 °C. No entanto, não houve interação entre raças.

2.6 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em espermatozoides

A membrana plasmática de espermatozoides de mamíferos é constituída por mais de 60% de ácidos graxos poli-insaturados, ricos em duplas ligações, fornecendo fluidez a membrana espermática (Valença e Guerra, 2007).

As EROs produzidas pelos espermatozoides são o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (Aitken, 1995; De Lamirande e Gagnon, 1999). Aitken (1995) sugere que a nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato, NADPH, seja a principal fonte de elétrons responsáveis pela produção de (O_2) pelo espermatozoide humano com o possível envolvimento do sistema NADPH-oxidase. Uma segunda hipótese para a produção de EROs é a diaforase espermática (uma oxidoreductase

NADPH-dependente), localizada na peça intermediária do espermatozoide e integrada à cadeia respiratória mitocondrial (Gavella e Lipovac, 1992). Os danos causados pelo desbalanceamento na produção de EROs afetam a viabilidade do espermatozoide, caracterizada pela redução da motilidade, lesões ao DNA espermático e mitocondrial podendo interferir na capacidade fecundante do espermatozoide (Irvine et al., 2000). Já no ejaculado, as principais fontes de EROs são os espermatozoides morfologicamente anormais e leucócitos (Gavella e Lipovac, 1992).

Um estudo avaliando o efeito da dieta (selênio e vitamina E) na inibição da apoptose pelo calor e do estresse oxidativo sobre a espermatogênese em camundongos após hipertemia escrotal (42 °C /30 minutos), identificou que a hipertermia induz a apoptose (TUNEL) de células espermatogênicas e aumenta a produção de EROS avaliadas pela sonda diclorofluorescein diacetato (DCFHDA). Estas observações indicaram claramente o desenvolvimento de estresse oxidativo e da apoptose após hipertermia. Análises adicionais nos grupos de choque térmico + selênio e choque térmico + vitamina E mostraram um comportamento protetor em relação aos efeitos do grupo de choque térmico (Kaur e Bansal, 2015).

Pino et al. (2013), demonstraram um aumento da produção de EROS em espermatócitos no estágio de paquíteno à temperatura de 40 °C. Já em espermatídes redondas a produção de EROS não se alterou quando expostas à temperaturas superiores a 33 °C. Os autores verificaram que o consumo de oxigênio aumentou com a temperatura e foi significativamente maior em espermatídes redondas do que os espermatócitos de paquíteno, indicando um desacoplamento mitocondrial em espermatozoide redondo em altas temperaturas. Entretanto, a capacidade antioxidante foi maior em espermatídes redondos do que espermatócitos de paquítenos quando submetidos à 40 °C. Contudo, estes resultados sugerem que espermatócitos paquítenos são mais suscetíveis ao estresse oxidativo quando expostos à altas temperaturas, entretanto, as espermatídes redondas são mais protegidas por causa de um desacoplamento mitocondrial induzido pela temperatura, juntamente com uma maior capacidade antioxidante.

2.7 Apoptose em espermatozoides

A apoptose em espermatozoides pode ser induzida por alterações endócrinas que levam à secreção do ligante do receptor de morte Fas (FasL) pelas células de Sertoli. O

receptor Fas é uma proteína de superfície celular que pertence à família dos receptores TNF (tumor necrosis factor) e NGF (nerve growth factor). O sinal apoptótico induzido por Fas é iniciado quando um ligante de Fas se une ao receptor, o que dispara uma via iniciada por caspase-8, que culminará com a ativação de caspases -3, -6, e -7, envolvidas com a fragmentação de DNA (Thornberry, 1998; Paasch *et al.*, 2004). Após a ativação da Fas pelo ligante FasL, a degradação do DNA ocorre dentro de 3 horas e a célula pode estar morta dentro de aproximadamente 5 horas (Nagata, 1996). Um dos sinais da apoptose é a exteriorização de fosfatidilserina (PS), sinal esperado pela célula de Sertoli para a fagocitose da célula alvo. Células de sertoli de ratos fagocitam células espermatozônicas degeneradas *in vitro*, devido ao reconhecimento da fosfatidilserina na membrana plasmática externa (Young e Nelson, 2001). Falhas na fagocitose das células apoptóticas resultariam em um alto número de células anormais no ejaculado e, como consequência, baixa fertilidade (Sakkas *et al.*, 1999).

A caspase-3 foi identificada pela primeira vez em espermatozoides de humanos por Weng *et al.* (2001), ao avaliarem a relação da apoptose com a infertilidade por citometria de fluxo. Estes autores encontraram uma estreita relação entre os altos níveis de caspase-3 ativada, com a translocação de fosfatidilserina e a fragmentação de DNA em pacientes inférteis e em amostras com baixa motilidade. Wang *et al.* (2002) observaram a ativação de caspase-3 na peça intermediária de espermatozoides de humanos, juntamente com fragmentação de DNA em espermatozoides com baixa motilidade de homens inférteis. Alterações na polarização da membrana mitocondrial estão envolvidas na formação do apoptossomo, responsável pela ativação da caspase-3.

Sabendo que a apoptose é comum durante a espermatogênese, Hendricks e Hansen (2008) testaram se a apoptose poderia ser induzida em espermatozoide de touros e equinos após a ejaculação. Os autores incubaram os espermatozoides de touros às temperaturas de (38,5 °C) e choque térmico (40 °C e 41 °C) durante 4 h e não verificaram o aumento na proporção de espermatozoides positivo para a reação de TUNEL. Também não houve redução na polaridade mitocondrial causada pela exposição de 40 ou 41 °C. Entretanto, na segunda incubação, nas mesmas temperaturas durante 24 h identificaram um ligeiro aumento na proporção de espermatozoides que foram TUNEL positivo em comparação com o controle não incubado (1,0-1,4%). Assim, o aumento na marcação de TUNEL não foi afetado pela temperatura de incubação e ocorreu mesmo na presença de um inibidor da caspase do grupo II (z-

DEVD-fmk). Em espermatozoides de equinos também não foi observado TUNEL positivo, mesmo com o uso de um despolarizador de membranas mitocondriais (cianeto de carbonilo 3-clorofenilhidrazona CCCP), em resposta à incubação a 41 °C durante 4 h. Assim, os espermatozoides pós-ejaculados de equinos foram resistentes à indução de apoptose e esta resistência, pelo menos nos touros, foi devido à refratariedade das mitocôndrias à despolarização induzida por choque térmico, à falta de procaspase-9, e uma ausência de procaspase-3.

2.8 Desenvolvimento embrionário inicial

Os gametas femininos possuem níveis variáveis de capacidade de desenvolvimento. Este ponto contribui para as taxas de sucesso relativamente baixas em tecnologias de reprodução assistida. Por exemplo, nas últimas décadas, estudos têm explorado as causas da competência de oócitos ou embriões iniciais com base na sua qualidade, utilizando estratégias, a fim de determinar esta capacidade de desenvolvimento, incluindo o momento da divisão celular embrionária. As características quantificáveis como a taxa de blastocistos, a sobrevivência do embrião após a criopreservação e a prenhez após a transferência de embriões apoiam o uso da cinética de clivagem embrionária inicial (Orozco-Lucero *et al.*, 2004)

Durante o período de desenvolvimento pré-implantação, o zigoto sofre várias divisões mitóticas para se transformar em um blastocisto composto por em média por 100 blastômeros. Em bovinos, o tempo necessário para a penetração de espermatozoides *in vitro* é menor que 4 h, a decondensação do espermatozoide leva 1-2 horas e o pronúcleo masculino aparece de 9-11 h após-inseminação (hpi) (Xu, 1998). O momento da primeira clivagem zigótica pode variar de 8 h, nos seres humanos (entre 22 e 30 hpi; (Nagy *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2007) e mais de 20 h em bovinos (entre 22 e 48 hpi; (Grisart *et al.*, 1994; Yoshioka e Iwamura, 2000), com um pico de embriões na fase de 2-células de 36 hpi (Van Soom *et al.*, 1992).

Lonergan *et al.* (1999) e Vandaele *et al.* (2006) indicam que a maioria dos blastocistos são oriundos de zigotos que clivaram precocemente. Em bovinos, os embriões de melhor qualidade surgem de zigotos que clivaram 30 hpi e o potencial de desenvolvimento diminui à medida que o tempo de inseminação para a primeira clivagem aumenta. Os embriões derivados de zigotos que clivavam muito tarde (> 42 hpi) geralmente não atingiram o estágio de blastocisto (Lonergan, *et al.*, 1999; Van

Soom *et al.*, 1997). Holm *et al.* (1998) descreveu que o intervalo ótimo para a seleção de embriões viáveis foi de 32-36 hpi. Sugerindo que o momento da primeira clivagem influencia significativamente na capacidade do embrião atingir o estágio de blastocisto.

Alguns fatores podem afetar o tempo da clivagem embrionária. Por exemplo, fatores intrínsecos do oócito e / ou espermatozoides, tais como maturação do ooplasma, diferenças na capacidade do espermatozoides ou anormalidades cromossômicas (Sakkas *et al.*, 1998). Em espermatozoides, Ward *et al.* (2001) verificaram que a taxa de zigotos clivados 33 hpi foi o melhor preditor de potencial reprodutivo de touro *in vivo*. A taxa de clivagem precoce variou significativamente entre os touros de alta (55,3%) e baixa (6,4%) taxa de retorno (representa a taxa de vacas inseminadas que não retornam ao estro antes de 56 dias após a primeira inseminação). Larson *et al.*(2000), indicaram que o estado da cromatina dos espermatozoides pode influenciar a clivagem embrionária precoce. Níveis elevados de danos ao DNA (> 27%) detectados pelo sperm chromatin structure assay (SCSA) estavam relacionados com uma redução significativa das taxas de fertilização e gestação em seres humanos. A porcentagem de espermatozoides com DNA danificado foi significativamente maior (31,1%) nos casos de gestações com falha em relação aos ciclos de sucesso (15,4%).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do trato reprodutor da vaca no choque térmico de espermatozoides de touros holandeses.

3.3 Objetivos específicos

Determinar o efeito da incubação de espermatozoides de touros holandeses nas temperaturas 35 °C (controle de incubação), 38,5 °C (temperatura corporal fisiológica) e 41 °C (choque térmico) por 4 horas na:

- Indução de espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade mitocondrial e de enzimas caspases em espermatozoides;
- Motilidade espermática;
- Potencial fecundante dos espermatozoides;
- Cinética de desenvolvimento embrionário ao estágio de 2-células;
- Cinética de clivagem embrionário;
- Desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto

4 HIPOTHESES

O choque térmico induz a produção de EROS afetando a motilidade, atividade mitocondrial, atividade de caspase, desta forma reduzindo a função espermática e sua capacidade fecundante.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, K. A.; BHARGAVA, P. M. Nucleic acid metabolism of mammalian spermatozoa. **Biochem J**, v. 86, p. 298-307, Feb 1963. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14010728> >.

AKERFELT, M. et al. Promoter ChIP-chip analysis in mouse testis reveals Y chromosome occupancy by HSF2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 32, p. 11224-9, Aug 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18682557> >.

ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell**. New york: 1994.

AMANAI, M.; BRAHMAJOSYULA, M.; PERRY, A. C. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. **Biol Reprod**, v. 75, n. 6, p. 877-84, Dec 2006. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943360> >.

AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J. The male gamete is not a somatic cell- the possible meaning of varying sperm RNA levels. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 2, p. 179-80, Jan 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22703389> >.

ANTON, E.; KRAWETZ, S. A. Spermatozoa as biomarkers for the assessment of human male infertility and genotoxicity. **Syst Biol Reprod Med**, v. 58, n. 1, p. 41-50, Feb 2012. ISSN 1939-6376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22239080> >.

ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **J Dairy Sci**, v. 77, n. 7, p. 2044-50, Jul 1994. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929964> >.

ARRUDA, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). . 2000. 121 Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo., São Paulo - Pirassununga.

ASSIS, R. E. F. Evolução da espécie *Bos taurus* e formação das Raças Zebuínas (*Bos taurus indicus*) com ênfase na Raça Nelore. 2007. Faculdades Associadas de Uberaba- FAZU.

AUSTIN, J. W.; HUPP, E. W.; MURPHEE, R. L. Effects of scrotal insulation on semen of Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 307-310, 1961.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> >.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Can Vet J**, v. 35, n. 2, p. 93-102, Feb 1994. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069831> >.

BETTEGOWDA, A.; WILKINSON, M. F. Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 365, n. 1546, p. 1637-51, May 2010. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403875> >.

BJÖRK, J. K. et al. miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. **Development**, v. 137, n. 19, p. 3177-84, Oct 2010. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724452> >.

BLOOM, D.; FAWCETT, D. W. **A textbook of Histology**. Saunders Company. Philadelphia: 1975.

BOUHALLIER, F. et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. **RNA**, v. 16, n. 4, p. 720-31, Apr 2010. ISSN 1469-9001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150330> >.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento AGE – Assessoria de Gestão
Estratégica. Projeções do Agronegócio-Brasil Brasília: 96 p. 2012/2013 a 2022/2023.

BRIONIZIO, J. D.; MAINIER F. B. Avaliação de temperatura e umidade em uma câmara climática . ENQUALAB, 2006.

BRITO, L. F. et al. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 79, n. 1-2, p. 1-15, Nov 2003. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853175> >.

BRYKCZYNSKA, U. et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. **Nat Struct Mol Biol**, v. 17, n. 6, p. 679-87, Jun 2010. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473313> >.

BUJAN, L. [Environment and spermatogenesis]. **Contracept Fertil Sex**, v. 26, n. 1, p. 39-48, Jan 1998. ISSN 1165-1083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9532881> >.

BUTLER, S.T.; MARR, A.L.; PELTON, S.H.; RADCLIFF, R.P.; LUCY, M.C.; BUTLER, W.R. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative

energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. **J Endocrinol**, v. 176, p. 205-217, 2003.

BUKOWSKA, D. et al. Analysis of integrins and vascular endothelial growth factor isoforms mRNA expression in the canine uterus during perimplantation period. **Pol J Vet Sci**, v. 14, n. 2, p. 253-8, 2011. ISSN 1505-1773. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21721410> >.

BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA functions. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 175-205, 2007. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506695> >.

CARLETON, M.; CLEARY, M. A.; LINSLEY, P. S. MicroRNAs and cell cycle regulation. **Cell Cycle**, v. 6, n. 17, p. 2127-32, Sep 2007. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786041> >.

CARLSEN, E. et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **BMJ**, v. 305, n. 6854, p. 609-13, Sep 1992. ISSN 0959-8138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1393072> >.

CHANDOLIA, R. K.; REINERTSEN, E. M.; HANSEN, P. J. Short communication: lack of breed differences in responses of bovine spermatozoa to heat shock. **J Dairy Sci**, v. 82, n. 12, p. 2617-9, Dec 1999. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10629808> >.

CHUMA, S.; NAKANO, T. piRNA and spermatogenesis in mice. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 368, n. 1609, p. 20110338, Jan 2013. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166399> >.

CURRY, E.; ELLIS, S. E.; PRATT, S. L. Detection of porcine sperm microRNAs using a heterologous microRNA microarray and reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Mol Reprod Dev**, v. 76, n. 3, p. 218-9, Mar 2009. ISSN 1098-2795. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19012322> >.

DADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microsc Res Tech**, v. 61, n. 1, p. 56-75, May 2003. ISSN 1059-910X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672123> >.

DE LEEUW, F. E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, n. 2, p. 171-83, Apr 1990. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2331890> >.

DE ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **J Androl**, v. 21, n. 6, p. 776-98, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 0196-3635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105904> >.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow- a review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139-1151, 2003.

DUKES. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 1988.

FAGOONEE, S. et al. Potential applications of germline cell-derived pluripotent stem cells in organ regeneration. **Organogenesis**, v. 7, n. 2, p. 116-22, 2011 Apr-Jun 2011. ISSN 1555-8592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593601> >.

FERNANDES, C. E. et al. Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1560-8, Dec 2008. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723216> >.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-48, Mar 2009. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121865> >.

FERREIRA, F. et al. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 732-738, 2006.

FONSECA, V. O.; CHOW, L. A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 707-716, 1995.

GABALDI, S. H. Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore submetidos à insulação escrotal. 1999. 85 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, p. 340-350, 2002.

GADELLA, B. M. et al. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. **Int J Dev Biol**, v. 52, n. 5-6, p. 473-80, 2008. ISSN 0214-6282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649260> >.

Garcia M. L. S; Fernández G. C. **EMBRIOLOGIA**: 2º edição, 2001.

GARRIDO, N. et al. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. **Reprod Biomed Online**, v. 17, n. 6, p. 855-65, Dec 2008. ISSN 1472-6491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079971> >.

GRISART B, MASSIP A, DESSY F 1994 Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. **Journal of Reproduction and Fertility** 101 257-264.

GHOLAMI, H. et al. Improvement of Semen Quality in Holstein Bulls during Heat Stress by Dietary Supplementation of Omega-3 Fatty Acids. **Int J Fertil Steril**, v. 4, n. 4, p. 160-7, Jan 2011. ISSN 2008-076X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24851176> >.

GILBERT, I. et al. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1073-86, Jun 2007. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17636162> >.

GRUNEWALD, S. et al. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. **Andrologia**, v. 37, n. 2-3, p. 69-71, Jun 2005. ISSN 0303-4569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16026427> >.

GUR, Y.; BREITBART, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. **Genes Dev**, v. 20, n. 4, p. 411-6, Feb 2006. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449571> >.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: **Oxford University Press**, 1999. 936p.

HAMMOUD, S. S. et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. **Nature**, v. 460, n. 7254, p. 473-8, Jul 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19525931> >.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 349-60, Jul 2004. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271465> >.

_____. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1534, p. 3341-50, Nov 2009. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833646> >.

HAYASHI, K. et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. **PLoS One**, v. 3, n. 3, p. e1738, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18320056> >.

HE, H. et al. Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. **J Biol Chem**, v. 278, n. 37, p. 35465-75, Sep 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813038> >.

HENDRICKS, K. E.; MARTINS, L.; HANSEN, P. J. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to post-ejaculatory aging and heat shock: development to the blastocyst stage and sex ratio. **J Reprod Dev**,

v. 55, n. 1, p. 69-74, Feb 2009. ISSN 0916-8818. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957823> >.

HENKEL, R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. **Asian J Androl**, v. 14, n. 2, p. 260-9, Mar 2012. ISSN 1745-7262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138904> >.

HESS, R. A.; RENATO DE FRANCA, L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Adv Exp Med Biol**, v. 636, p. 1-15, 2008. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19856159> >.

Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H 1998 Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology** v. 50 p. 1285-1299.

IZADYAR, F. et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. **Reproduction**, v. 124, n. 1, p. 85-94, Jul 2002. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12090922> >.

JOHNSON, G. D. et al. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 21-36, Jan 2011. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876223> >.

JOHNSON, L. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 471-80, Jul 2000. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844217> >.

KAUR. S; BANSAL M. P. Protective role of dietary-supplemented selenium and vitamin E in heat-induced apoptosis and oxidative stress in mice testes . **Andrology** p. 1109-19 v. 47. PMID: 25521483 DOI: 10.1111/12390. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25521483> >.

KALLIO, M. et al. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. **EMBO J**, v. 21, n. 11, p. 2591-601, Jun 2002. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032072> >.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 13, n. 2, p. 271-82, Jul 1997. ISSN 0749-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9216048> >.

KEMPISTY, B. et al. Morphological and molecular aspects of zygote formation and early stages of embryo development in pigs in light of genetic and microfluidic research v. 67, p. 380-384, 2011.

KIANI, J.; RASSOULZADEGAN, M. A load of small RNAs in the sperm - how many bits of hereditary information? **Cell Res**, v. 23, n. 1, p. 18-9, Jan 2013. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266892> >.

KRAMER, J. A.; KRAWETZ, S. A. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. **Mol Hum Reprod**, v. 3, n. 6, p. 473-8, Jun 1997. ISSN 1360-9947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9239735> >.

KRAWETZ, S. A. et al. A survey of small RNAs in human sperm. **Hum Reprod**, v. 26, n. 12, p. 3401-12, Dec 2011. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21989093> >.

LARSON KL, DEJONGE CJ, BARNES AM, JOST LK, EVENSON DP 2000 Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Human Reproduction** 15 1717-1722.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J Anim Sci**, v. 48, n. 1, p. 76-86, Jan 1979. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/573253> >.

LEWIS, B. P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787-98, Dec 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697198> >.

LIAN, J. et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, p. 13, 2009. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210773> >.

LIU, W. M. et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 2, p. 490-4, Jan 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203953> >.

MAATOUK, D. M. et al. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. **Biol Reprod**, v. 79, n. 4, p. 696-703, Oct 2008. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633141> >.

MACLAUGHLIN, J.; TERNER, C. Ribonucleic acid synthesis by spermatozoa from the rat and hamster. **Biochem J**, v. 133, n. 4, p. 635-9, Aug 1973. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4748826> >.

MARCON, E. et al. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. **Chromosome Res**, v. 16, n. 2, p. 243-60, 2008. ISSN 0967-3849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204908> >.

MARENGO, J. A. Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Brasília: MMA 2006.

MAYA-SORIANO, M. J. et al. Retinol might stabilize sperm acrosomal membrane in situations of oxidative stress because of high temperatures. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 367-73, Jan 2013. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23149412> >.

MEDEIROS, L. F. D.; VIEIRA, D. H. **Bioclimatologia Animal**. Rio de Janeiro: 1997.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343-9, Sep 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372041> >.

MEISTRICH, M. L. et al. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 483-8, May 2003. ISSN 0009-5915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12743712> >.

MEYERHOEFFER, D. C. et al. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **J Anim Sci**, v. 60, n. 2, p. 352-7, Feb 1985. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3988628> >.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 287-301, Feb 2010. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759174> >.

MONTERROSO, V. H. et al. Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 947-61, Nov 1995. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727790> >.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum Reprod Update**, v. 3, n. 5, p. 403-39, 1997 Sep-Oct 1997. ISSN 1355-4786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528908> >.

MW, P. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** p. 29-45, 2001.

NAGY ZP, JANSSENSWILLEN C, JANSSENS R, DE VOS A, STAESSEN C, VAN DE VELDE H, VAN STEIRTEGHEM AC 1998 Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. **Human Reproduction** 13 1606-1612.

NARDONE, A. et al. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems v. 130, p. 57-69, 2010.

OSTERMEIER, G. C. et al. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 154, May 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141202> >.

PATEL OV, BETTEGOWDA A, IRELAND JJ, COUSSENS PM, LONERGAN P, SMITH GW 2007 Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction** 133 95-106.

PAPAIOANNOU, M. D.; NEF, S. microRNAs in the testis: building up male fertility. **J Androl**, v. 31, n. 1, p. 26-33, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1939-4640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875496> >.

PARAZZINI, F.; BORTOLOTTI, A.; COLLI, E. Declining sperm count and fertility in males: an epidemiological controversy. **Arch Androl**, v. 41, n. 1, p. 27-30, 1998 Jul-Aug 1998. ISSN 0148-5016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9642457> >.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biol Reprod**, v. 66, n. 4, p. 1169-77, Apr 2002. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11906938> >.

PEREIRA, J. C. C. Fundamentos de bioclimatologia aplicados a produção animal. FEP MVZ. Minas Gerais: 2005.

PEZZINI, T. G. et al. Características seminais de touros Curraleiros e Holandeses submetidos a insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 41, p. 863-868, 2006.

PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB J**, v. 15, n. 7, p. 1118-31, May 2001. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344080> >.

PINO JA, OSSES N, OYARZÚN D, FARÍAS JG, MORENO RD, REYES JG. Differential effects of temperature on reactive oxygen/nitrogen species production in rat pachytene spermatocytes and round spermatids. **Reproduction** Jan. 2013 24;145(2):203-12. doi: 10.1530/REP-12-0330. Print 2013 Feb. PMID: 23241345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241345> >.

PITTOGGI, C. et al. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 20), p. 3537-48, Oct 1999. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504302> >.

PREMKUMAR, E.; BHARGAVA, P. M. Transcription and translation in bovine spermatozoa. **Nat New Biol**, v. 240, n. 100, p. 139-43, Nov 1972. ISSN 0090-0028. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4509027> >.

RAHMAN, M. B. et al. Bovine spermatozoa react to in vitro heat stress by activating the mitogen-activated protein kinase 14 signalling pathway. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, n. 2, p. 245-57, Jan 2014. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327743> >.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901-6, Feb 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706289> >.

ROMERO, Y. et al. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25241, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998645> >.

ROUSSEAU, S. et al. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. **Reprod Biomed Online**, v. 16, n. 4, p. 492-503, Apr 2008. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413057> >.

RP, A. **Sperm production rates**. Academic Press. New York: 1970. 433-482.

RUBY, J. G. et al. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1193-207, Dec 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174894> >.

SALUMETS A, HYDÉN-GRANSKOG C, MÄKINEN S, SUIKKARI AM, TIITINEN A, TUURI T 2003 Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. **Human Reproduction** 18 821-825

SARGE, K. D. et al. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. **Genes Dev**, v. 5, n. 10, p. 1902-11, Oct 1991. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717345> >.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A 1998 Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. **Human Reproduction** 13 182-187.

SEKONI, V. O.; GUSTAFSSON, B. K. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. **Br Vet J**, v. 143, n. 4, p. 312-7, 1987 Jul-Aug 1987. ISSN 0007-1935. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3620889> >.

SETCHELL, B. P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. **J Reprod Fertil**, v. 114, n. 2, p. 179-94, Nov 1998. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070346> >.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **J Appl Physiol**, v. 21, n. 6, p. 1784-90, Nov 1966. ISSN 0021-8987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5951717> >.

SYSTEM, S. A. **SAS**. EUA SAS Institute Inc., Cary, NC, 2002

TANG, F. et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes Dev**, v. 21, n. 6, p. 644-8, Mar 2007. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369397> >.

TURNER, M. J.; JIAO, A. L.; SLACK, F. J. Autoregulation of lin-4 microRNA transcription by RNA activation (RNAa) in *C. elegans*. **Cell Cycle**, v. 13, n. 5, p. 772-81, Mar 2014. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398561> >.

TUSHER, V. G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 9, p. 5116-21, Apr 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309499> >.

VALENÇA RMB, GUERRA MMP. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.47-53, 2007.

VAN MONTFOORT AP, DUMOULIN JC, KESTER AD, EVERS JL 2004 Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. **Human Reproduction** 19 2103-2108.

VAN SOOM A, VAN VLAENDEREN I, MAHMOUDZADEH AR, DELUYKER H, DE KRUIF A 1992 Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology** 38 905-919.

VAN SOOM A, YSEBAERT MT, DE KRUIF A 1997 Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development** 47 47-56.

VANDAELE L, MATEUSEN B, MAES DG, DE KRUIF A, VAN SOOM A 2007 Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity. **Reproduction** 133 709-718. 60.

VANDAELE L, MATEUSEN B, MAES D, DE KRUIF A, Van Soom A 2006 Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? **Theriogenology** 65 1691-1703.

VOGLER, C. J. et al. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **J Dairy Sci**, v. 74, n. 11, p. 3827-35, Nov 1991. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757624> >.

XU KP, GREVE T 1988 A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility** 82 127-134.

WAITES, G. M. H. **The testis**. Academic Press. New York: 1970.

WALTERS, A. H. et al. 5. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1925-37, Apr 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823349> >.

WANG, G. R.; ZHOU, Z. D.; GE, Z. M.; ZHAO, M. J. Preliminary investigation of relationship between sperm apoptosis and male infertility. *Zhonghua Nan Ke Xue*, Beijing, v. 8, p. 25-27, 2002.

WARD F, RIZOS D, CORRIDAN D, QUINN K, BOLAND M, LONERGAN P 2001 Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction and Development* 60 47-55.

WENG, S. L.; SCHUFFNER, A.; MORSHEDI, M.; BEEBE, S.; TAYLOR, S.; OEHNINGER, S. C. Caspase-3 activity is present at low levels in ejaculated human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, New York, v. 76, n. 3, p. 193, 2001.

WRZESKA, M.; REJDUCH, B. Genomic imprinting in mammals. **J Appl Genet**, v. 45, n. 4, p. 427-33, 2004. ISSN 1234-1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523153> >.

WU, Q. et al. The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis. **J Biol Chem**, v. 287, n. 30, p. 25173-90, Jul 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665486> >.

YADAV, R. P.; KOTAJA, N. Small RNAs in spermatogenesis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 382, n. 1, p. 498-508, Jan 2014. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23632103> >.

YAN, N. et al. Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. **J Assist Reprod Genet**, v. 26, n. 4, p. 179-86, Apr 2009. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242788> >.

YOSHIOKA K, SUZUKI C, IWAMURA S 2000 Effects of activin A and follistatin on developmental kinetics of bovine embryos: cinematographic analysis in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility** 118 119-125.

_____. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 73-9, Jul 2007. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641090> >.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**, v. 17, n. 24, p. 3011-6, Dec 2003. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681208> >.

CAPÍTULO I

Heat shock effect on fertilizing potential of Holstein sperm

Daniela F. Silva^{A*}, Thaís A. Rodrigues^B; Juliana Vieira Lopes^B, Weber B. Feitosa^B,
Fabíola F. Paula-Lopes^{A,B}

^AInstitute of Biosciences, State University of Sao Paulo, Botucatu-SP, Brazil;

^BDepartment of Biological Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema
SP, Brazil.

Corresponding author: Fabíola Freitas de Paula-Lopes

Department of Biological Sciences, Federal University of São Paulo, 275 Professor
Arthur Riedel Ave., 09972-270 Jardim Eldorado, Diadema, São Paulo, Brazil.

Email: paula.lobes29@unifesp.br, ffpaulalopes@gmail.com, Telephone: (5511) 3385-
4137 extension 3521 / Fax: (5511) 3319-3400

ABSTRACT

Sperm function can be compromised by adverse environmental conditions. For example, the sperm cell may be damaged by elevated temperature in the reproductive tract of heat stressed cows. It has been demonstrated that *in vivo* and *in vitro* exposure of bovine sperm to elevated temperature compromises sperm cellular function. However, the mechanisms triggered by elevated temperature in the sperm cell are still controversial. Therefore, the objective of this study was to determine the effect of heat shock on ejaculated sperm oxidative stress, mitochondrial and caspase activity, motility, fertilizing potential and preimplantation developmental kinetics. Frozen-thawed Holstein sperm were subjected to control (non-incubation: sperm were evaluated immediately after Percoll gradient) and SP-TALP incubation at 35°C (testicular temperature control), 38.5°C (body temperature control) and 41°C (heat shock) for 4 h. Heat shock reduced sperm motility after 3 and 4 h incubation at 41°C as compared to 35

and 38.5°C. Sperm mitochondrial activity was reduced by 38.5 and 41°C when compared to control. Heat shock also increased sperm ROS production and caspase activity as compared to 35°C and control. The percentage of oocytes fertilized, cleaved and that reached the 2-cell and blastocyst stage was reduced by 41°C as compared to 35°C and control. There was no difference between 38.5 and 41°C for these variables. In conclusion, exposure of Holstein sperm to heat shock during 4 h reduced sperm function as compared to sperm at testicular temperature.

Key words: oxidative stress, sperm motility, mitochondrial and caspase activity, fertilization, embryo developmental kinetics.

1. INTRODUCTION

The fully mature spermatozoa is a highly differentiated and quiescent cell. During the final process of spermatogenesis the structure of the sperm chromatin becomes highly condensed and transcriptionally silent (Dadoune, 2003; Meistrich *et al.*, 2003; Bukowska *et al.*, 2011). Such unique chromatin architecture has suggested that the mature sperm has reduced ability to respond to environmental insults such as elevated temperature, cryopreservation, and oxidative stress (González-Marín *et al.*, 2012).

The sperm cell is very susceptible to elevated temperature. Environmental stress has been shown to damage pre- and post-ejaculatory bull spermatozoa (Hendricks and Hansen, 2009; Hendricks *et al.*, 2009). Studies using scrotal insulation models demonstrated that increased scrotal temperature leads to spermatogenesis errors, production of abnormal sperm, reduced sperm motility, maturation (Setchell, 1998) as well as reduced embryonic development following fertilization (Fernandes *et al.*, 2008). It is also possible that insemination of heat stressed cows during the summer affects sperm function in the female reproductive tract. Moreover, direct exposure of post-ejaculatory bovine spermatozoa to heat shock at 41-43°C for 3-4 h reduced sperm motility, plasma membrane integrity (Monterroso *et al.*, 1995; Chandolia *et al.*, 1999), mitochondrial membrane potential (MMP) and subsequent embryonic development as compared to non-incubated control (Rahman *et al.*, 2014).

There is evidence that scrotal hyperthermia (42°C/30 minutes) during mice spermatogenesis increased ROS production and induced apoptosis in spermatocytes,

round spermatids and elongated spermatids (Kaur and Bansal, 2015), indicating that elevated temperature exerted a direct and ROS-mediated deleterious effect in these cells. The sperm cell is prone to oxidative damage. The small amount of cytoplasm limits sperm enzymatic antioxidant system (Mazur et al., 2000) and the abundance of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in sperm membranes (Parks and Hammerstedt, 1985) turns this cell more vulnerable to ROS. Cellular ROS unbalance damages DNA, proteins, lipids and other cellular components (Benchaib et al., 2003) leading to sperm poor functionality (Du Plessis et al., 2010). Moreover, increased mitochondrial ROS generation (Koppers *et al.*, 2011) causes mitochondrial pore opening, release of pro-apoptotic factors (Liu *et al.*, 1996; Du, C *et al.*, 2000), activation of caspases and caspase-dependent DNases leading to apoptosis.

The susceptibility of mature spermatozoa to heat shock-induced mitochondrial alteration and apoptosis is controversial. Hendricks and Hansen (2009) demonstrated that incubation of ejaculated bovine sperm at 41°C for 4 h did not affect mitochondrial polarity or induce apoptosis (TUNEL-positive sperm). This study indicated refractoriness of the mitochondria to heat shock-induced depolarization, lack of procaspase-9 and procaspase-3. On contrast, Rahman *et al.* (2014) demonstrated that MMP was reduced by 41°C heat shock for 4 h as compared to 38.5°C and non-incubated control. Other studies have also demonstrated that the susceptibility of ejaculated spermatozoa to mitochondrial-associated apoptosis is due to MMP alteration and caspase activation. This has been shown after sperm exposure to specific mitochondrial-apoptosis inducer that triggered caspase-9 activation, MMP damage and activation of the downstream effector caspase-3 (Paasch, Grunewald, Agarwal, *et al.*, 2004). Similar events were also noted after sperm cryopreservation (Marchetti *et al.*, 2004; Paasch, Grunewald, Dathe, *et al.*, 2004; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008).

Therefore, it was hypothesized that exposure of ejaculated Holstein spermatozoa to heat shock induces ROS production affecting sperm motility, mitochondrial activity caspase activity and fertilizing capacity. In order to test this hypothesis, experiments were conducted to determine the effect of incubation temperature (testicular temperature control: 35°C, body temperature physiological control: 38.5°C and heat shock: 41°C) on bovine sperm motility and fertilizing ability, oxidative stress, mitochondrial and caspase activity as well as embryonic developmental potential and kinetics.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Unless otherwise stated all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). MitoTracker[®]Red CMX-Ros was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, 132 USA), Philphilux[®]G₁D₂ from OncoImmunit, Inc (Gaithersburg, MD, USA) and CellROX[®] Green from Molecular Probes (Eugene, OP,U.S.A). Most of the media was as described before (Rodrigues *et al.*, 2016). Oocyte collection medium (OCM) was tissue culture medium-199 (TCM-199) containing L-glutamine and phenol red (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA) supplemented with 2.2 mg/ml sodium bicarbonate, 1% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (GIBCO[®]) (containing 2 U/ml heparin), 0.01 µg/ml streptomycin, 0.01 U/ml penicillin-G. Pre-IVM medium was TCM-199 HEPES with Hanks salts (GIBCO[®]), supplemented with 10% (v/v) FBS, 50 µg/ml gentamicin and 0.2 mM sodium pyruvate. Oocyte maturation medium (OMM) was TCM-199 sodium bicarbonate with earle's salts (GIBCO[®]) supplemented with 10% (v/v) FBS, 50 µg/ml gentamicin, 0.2 mM sodium pyruvate, 1 µg/ml estradiol 17-β, 10 µg/ml FSH (FOLLTROPIN-V[®] Bioniche Animal Health Canada Inc. - Belleville, Ontario, Canada) and 10 µg/ml luteinizing hormone (LH) (Chorulon[®] Intervet Schering Plough – Roseland, NJ). Pre-in vitro fertilization (IVF) medium was TCM-199 HEPES (GIBCO[®]) supplemented with 3 mg/ml bovine serum albumin fraction V (BSA-V), 50 µg/ml gentamicin and 0.2 mM sodium pyruvate. *In vitro* fertilization (IVF) medium was a modified Tyrode's albumin-lactate-pyruvate (TALP) medium (Parrish *et al.*, 1988) containing 6 mg/ml essentially fat acid free BSA (EFAF-BSA), 50 µg/ml gentamicin, 0.2 mM sodium pyruvate, 100 µg/ml heparin and 41.66 µl/ml PHE (penicillamine 2.7µg/ml, hipotaurine 1µg/ml, epinephrine 0.33 µg/ml in 0.9% (w/v) NaCl). SP-TALP medium used during sperm purification was as described by Parrish et al (Parrish *et al.*, 1988). Frozen semen was acquired from CRV Lagoa (Sertãozinho, São Paulo, Brazil). *In vitro* culture medium was a modified synthetic oviduct fluid (SOF)-CLEAV containing 0.4 mM pyruvate, 50 mg/ml amikacin sulphate and 0.04% (w/v) EFAF-BSA. SOF-IVC was supplemented 2.5% (v/v) FBS (Wells *et al.*, 1999).

3. Experimental design

Experiments were designed to determine the effect of heat shock on Holstein sperm function. In all experiments described sperm cells were subjected to percoll

gradient, evaluated immediately after Percoll purification (0 h non-incubation control) and incubated in SP-TALP for 4 h under the following temperature treatments: 35°C (testicular temperature control) and 38.5°C (cow body temperature control) in an atmosphere of 5% CO₂ (v/v) in humidified air and 41°C (heat shock: cow body temperature during hyperthermia) in an atmosphere of 7% CO₂ (v/v) in humidified air. The CO₂ concentration was adjusted due to temperature-dependent changes in gas solubility to maintain the same pH at all temperatures.

3.1 Experiment 1: The effect of heat shock on sperm motility of Holstein bulls

The objective of this study was to determine the effect of heat shock and time of exposure on sperm motility of Holstein bulls. Sperm motility was evaluated immediately after Percoll gradient (control) and after incubation at 35°C, 38.5°C and 41°C every h for 4 h. This experiment was replicated five times.

3.2 Experiment 2: The effect of heat shock on Holstein sperm oxidative stress

The objective of this study was to determine whether exposure of Holstein sperm to heat shock induces oxidative stress. Sperm oxidative stress was evaluated at control and after incubation at 35°C, 38.5 °C and 41°C for 4 h. This experiment was replicated four times.

3.3 Experiment 3: The effect of heat shock on mitochondrial activity of Holstein sperm

The objective of this study was to determine the effect of heat shock on mitochondrial activity of Holstein sperm. Sperm mitochondrial activity was evaluated at control and after incubation at 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h. This experiment was replicated five times.

3.4 Experiment 4: The effect of heat shock on caspase activity of Holstein sperm

The objective of this study was to determine the effect of heat shock on caspase activity of Holstein sperm. Sperm caspase activity was evaluated at control and after incubation at 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h. This experiment was replicated five times.

3.5 Experiment 5: The effect of Holstein sperm heat shock on sperm fertilization potential and subsequent early embryonic development

The objective of this study was to determine the effect of Holstein sperm heat shock on fertilization potential and embryonic development to the 2-cell stage. A preliminary study was conducted to determine the best timing for 2-cell embryo evaluation. In this preliminary experiment cumulus-oocyte complexes (COCs) were subjected to standard in vitro maturation, fertilization and culture. The percentage of 2-cell embryos was determined at 29, 32, 35, 38 and 41 h post insemination (hpi). This experiment was replicated 5 times using 115 to 150 oocytes/treatment. For the next experiment, in vitro matured oocytes were fertilized with sperm subjected to control, 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h. Fertilization rate [(number of cleaved embryos + number of penetrated oocytes)/total number of oocytes] and embryonic development to the 2-cell was assessed at 35 hpi to determine the 2-cell rate at every temperature. This experiment was replicated 7 times using 140 to 210 oocytes/treatment.

3.6 Experiment 6: The effect of Holstein sperm heat shock on early embryo developmental kinetics

The objective of this study was to determine the effect of Holstein sperm heat shock on developmental kinetics of early preimplantation embryos. In vitro matured oocytes were fertilized with sperm subjected to control, 35°C, 38.5°C and 41°C treatment for 4 h. The percentage of 2-cell embryo and early cleavage rate was evaluated at 29, 32, 35, 38 and 41 hpi. Cleavage rate was also evaluated at D3 post insemination. Oocytes fertilized with sperm from different treatments were placed in different culture dishes so that the same embryos could be evaluated in each time point after fertilization. An IVF laboratorial control was also conducted in each replicate. This experiment was replicated 4 times using 84 to 120 oocytes/treatment.

3.7 Experiment 7: Developmental competence of bovine embryo derived from Holstein sperm exposed to heat shock

The objective of this study was to determine the developmental competence of bovine embryos derived from heat-shocked sperm. After 22-24 h maturation, COCs were fertilized with sperm from control, 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h. Cleavage rate was evaluated at day 3. Development to blastocyst stage was assessed at day 8 post insemination. This experiment was replicated 7 times using 140 to 210 oocytes/treatment.

4. Methods

4.1 Sperm sample preparation

The experiments were performed with cryopreserved Holstein bull semen stored in liquid nitrogen at -196°C. Five bulls were used in order to neutralize the individual effect of bull and semen date ensuring greater statistical robustness. In each replicate 2 straws of semen from different bulls were randomly selected from a pool of 5 Holstein bulls. The straws were thawed in a semen electronic defroster at 36°C for 30 seconds. The semen was subjected to sperm separation in Percoll[®] gradient. To this end, 400 µl of 90% Percoll was deposited on the bottom of the microcentrifuge tube and 400 µl of 45% Percoll was deposited on the top of the tube for further centrifugation at 9000 x g for 5 minutes. After centrifugation, 200 to 250 µl of the spermatid pellet was removed from Percoll gradient, transferred to microcentrifuge tubes containing 400 µL of wash medium (SP-TALP) and centrifuged at 9000 x g for 2.5 minutes. After this procedure, 200 to 250 µL of last pellet was removed from the microcentrifuge tube. A 5 µL sperm sample was used to evaluate sperm motility and 5 µL for sperm concentration. Sperm concentration was adjusted to 1×10^6 spermatozoa/ml. Sperm samples were evaluated immediately after Percoll purification (non-incubated control) and incubated in 2 ml of SP-TALP at different temperature treatments.

4.2 Sperm motility

Frozen-thawed spermatozoa were subjected to Percoll gradient. Sperm motility was evaluated immediately after Percoll gradient purification (0 h non-incubation control) and after incubation in SP-TALP at 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h. After incubation, a 5-10 µL drop of semen was placed on microscopy glass slides mounted

with coverslips. Sperm motility was examined at 100x magnification using an inverted microscope (Carl Zeiss Primo Vert™ Inverted Microscope) and expressed as the percentage of mobile sperm.

4.3 Reactive oxygen species (ROS)

Sperm ROS was determined using CellROX® Green. In this assay sperm ROS oxidizes the probe producing green fluorescence. After Percoll gradient, the sperm pellet was resuspended in SP-TALP to a concentration of 1×10^6 sperm/ml. Sperm oxidative stress was evaluated immediately after Percoll gradient purification (0 h non-incubation control) and after incubation in SP-TALP at 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h. For oxidative stress assay, fresh sperm were incubated in CellROX® Green - 5 µM for 30 min in the dark at 37°C. Samples were washed by centrifugation (9000 x g) in 10 mM PBS containing 1 mg/ml polyvinylpyrrolidone (PBS-PVP) for 5 minutes at 37°C, fixed in 3.7% (v/v) formaldehyde and transferred to 10% (v/v) poly-L-lysine-coated slides mounted with coverslips. Samples were analyzed by epifluorescence microscope Axio Imager.A2 - Carl Zeiss equipped with fluorescein isothiocyanate filter (FITC emission 520 nm, excitation 460–490 nm) Images were analyzed using ImageJ software 1.45s. Sperm fluorescence intensity was quantified using a “free hand” tool to delimit de region of interest (ROI - sperm). This experiment was replicated 4 times using 1×10^6 sperm/treatment.

4.4 Sperm mitochondrial activity

Sperm mitochondrial activity was evaluated by Mitotraker®Red CMXRos combined with Hoechst 33342. Mitotracker®Red is absorbed by functional mitochondria. The chloromethyl group reacts with thiol nucleophile of peptides and proteins composing an aggregate capable to emit red fluorescence (Martin *et al.*, 2007). Hoechst 33342 was used to identify sperm DNA avoiding technical artefacts (Celeghini *et al.*, 2007). After Percoll gradient, the sperm pellet was resuspended in SP-TALP to a concentration of 1×10^6 sperm/ml. In this experiment, 0 h non-incubation control sample was evaluated immediately after Percoll gradient and samples were incubated in SP-TALP at 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h. For Mitotracker assay, all samples were incubated in 10 mM PBS containing 1 mg/ml PVP (PBS-PVP) containing Hoechst 33342 (5 µg/ml) and Mitotraker®Red CMXRos (0.05 mg/ml) for 8 min in the dark at

37°C. Samples were washed by centrifugation (9000 x g) in 10 mM PBS containing 1 mg/ml PVP (PBS-PVP) for 5 minutes at 37°C and transferred to 10% (v/v) poly-L-lysine-coated slides mounted with coverslips. Samples were analyzed by epifluorescence microscope Axio Imager.A2 - Carl Zeiss equipped with a Texas red filter (emission 590 nm, excitation 510–550 nm) and DAPI filter (emission 420 nm, excitation 330–385 nm). Images were analyzed using ImageJ software 1.45s. Sperm tail fluorescence intensity was quantified using a “free hand” tool to delimit de region of interest (ROI - sperm tail). One hundred sperm were evaluated per treatment in each replicate. 10 mM PBS containing 1 mg/ml PVP (PBS-PVP). This experiment was replicated 5 times using 1×10^6 sperm/treatment.

4.5 Sperm caspase activity

Group II caspase activity (caspase -3, -7 e -2) was evaluated using PhiPhiLux[®]G₁D₂ as fluorogenic substrate. After Percoll gradient, the sperm pellet was resuspended in SP-TALP to a concentration of 1×10^6 sperm/ml. In this experiment 0 h control sample was evaluated immediately after semen purification by Pecoll gradient and samples incubated at 35°C, 38.5°C and 41°C were evaluated after 4 hours incubation. For caspase assay, samples were incubated in 1.5 ml SP-TALP containing HEPES and 1 mg/ml polyvinylalcohol (PVA) (TCM-199 HEPES-PVA) and 5 µM PhiPhiLux-G₁D₂ during 40 minutes at 39°C in humid chamber in the dark. Negative control sperm was incubated in the absence of PhiPhiLux-G₁D₂. Sperm were washed by centrifugation in 1 ml TCM-HEPES-PVA, transferred to poly-L-lysine coated slides and mounted with a coverslip. Samples were analyzed with epifluorescence microscope Axio Imager A2 - Carl Zeiss equipped with an FITC filter (emission 520 nm, excitation 460–490 nm). Images were analyzed using ImageJ software 1.45s. Sperm fluorescence intensity was quantified using a “free hand” tool to delimit de region of interest (ROI - sperm). This experiment was replicated 5 times using 1×10^6 sperm/treatment.

4.6 *In vitro* maturation, fertilization and culture

Slaughterhouse ovaries from crossbred cattle were transported to the laboratory in sterile saline [0.9% (w/v) NaCl containing 100 U/ml penicillin-G and 100 µg/ml streptomycin] at 37°C for 2 h. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected by slicing 2 to 8 mm follicles in OCM (Rodrigues *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2016). Grade I

and II COCs were selected as previously described (Leibfried e First, 1979) and washed once in Pre-IVM medium. Groups of 10 COCs were transferred to 50 μ l drop of OMM overlaid with mineral oil for 22 to 24 h at 38.5°C in an atmosphere of 5% CO₂ (v/v) in humidified air. After IVM, COCs were washed once in pre-IVF medium. Groups of 10 COCs were transferred to 90 μ l drop IVF-TALP.

At the time of fertilization, 2 straws of semen from different randomly selected bulls were thawed and purified in Percoll gradient. Control sperm was used to fertilize oocytes immediately after Percoll purification. After Percoll gradient, sperm from the other treatments were incubated at 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h. Oocytes were fertilized with an insemination dose of 1×10^6 sperm/ml for 8 h at 38.5°C and 5% (v/v) CO₂ in humidified air. Presumptive zygotes were removed from fertilization drops, denuded of cumulus cells by vortexing in Pre-IVF medium for 5 minutes and washed once in SOF-CLEAV. Groups of 25-30 presumptive zygotes were transferred to 100 μ l drop of SOF-CLEAV covered in mineral oil at 38.5°C and 5% (v/v) CO₂ in humidified air. After 42 hs of the culture, 80 μ l of SOF-CLEAV was removed from the culture drops and replaced with 80 μ l of fresh SOF-IVC medium. The percentage of 2-cell embryos (number of embryos at the 2-cell stage \times 100 /total number of oocytes) was determined at 29, 32, 35, 38 and 41 hpi. Depending on the experiment, cleavage rate (percentage of cleaved embryos: number of embryos \geq 2-cell \times 100 /total number of oocytes) was evaluated at 29, 32, 35, 38 and 41 hpi or at day 3 after fertilization. Development to blastocyst stage was determined at day 8 after fertilization, respectively.

4.7 Sperm penetration and fertilization rates

In order to determine sperm penetration rate at 35 hpi presumptive zygotes that did not cleave were washed three times in 10 mM PBS containing 1 mg/ml PVP (PBS-PVP), fixed in 3.7% (v/v) formaldehyde for 30 minutes and washed in PBS-PVP. Non-cleaved presumptive zygotes were stained with Hoechst 33342 (5 μ g/mL) for 15 min, washed in PBS-PVP and transferred to 10% (v/v) poly-l-lysine-coated slides mounted with coverslips. Samples were analyzed in epifluorescence microscope Axio Imager.A2 - Carl Zeiss equipped with a DAPI filter (emission 420 nm, excitation 330–385 nm). Penetration rate was evaluated as the number of oocytes with 2 pronucleus (PN). Oocytes considered as fertilized were the ones that cleaved or did not cleave but showed

the presence of male and female pronucleus. Sperm fertilization rate [(number of cleaved embryos + 2 PN/total number of oocytes)] was also determined.

4.8 Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) assumptions (normally distributed data and homogeneity of variance) were initially determined by SAS (SAS, 1989). Parametric data were analyzed by least-squares analysis of variance using general linear model and mixed model procedures of SAS. Dependent variables were percentage of sperm mitochondrial activity, percentage of oocytes fertilized, cleaved, and that developed to the 2-cell stage. Independent variables were temperature and replicate. The statistical model considered all the main effects. PDIFF procedure of SAS was used to establish significant comparisons among means. Non-parametric data (sperm motility, caspase activity, ROS, embryo developmental kinetics, cleavage in each time and the percentage of oocytes that reached the blastocyst stage) were analyzed by Wilcoxon test. Data were shown as least-squares means \pm SEM.

5 RESULTS

5.1 The effect of heat shock on Holstein sperm motility

Sperm motility was affected by temperature and time of incubation. There was no effect of temperature on sperm motility during the first two h of incubation. However, exposure of sperm to heat shock (41°C) reduced ($P < 0.02$) motility at 3 and 4 h incubation as compared to 35 and 38.5°C (Fig. 1). Similarly, motility was affected by incubation time. A 4 h incubation period reduced motility ($P < 0.05$) for all temperatures examined while a period of 3 h incubation only reduced ($P < 0.02$) motility at 41°C (Fig. 2).

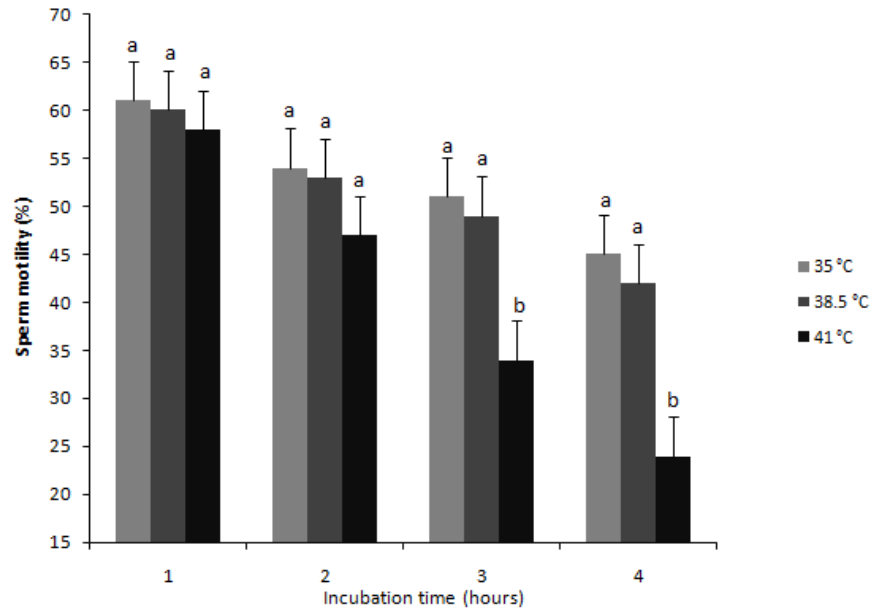


Figure 1: Effect of incubation temperature on motility of Holstein sperm exposed to heat shock. Results are least-squares means \pm SEM of 5 replicates using 1×10^6 sperm/treatment. Different letters in each bar represents significant difference ($P < 0.05$).

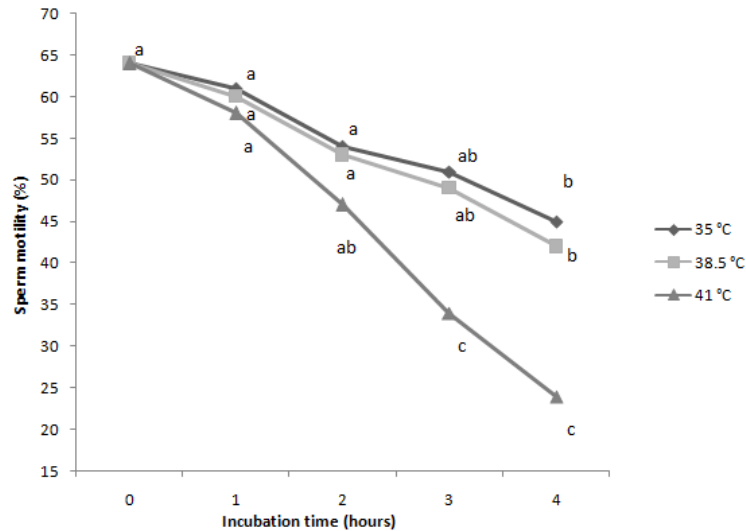


Figure 2: Effect of time of incubation on motility of Holstein sperm exposed to heat shock. Results are least-squares means \pm SEM of 5 replicates using 1×10^6

sperm/treatment. Different letters within each line represents significant difference ($P < 0.05$).

5.2 The effect of heat shock on Holstein sperm oxidative stress

Exposure of Holstein sperm to heat shock for 4 h increased ROS as compared to control ($P < 0.001$), 35°C ($P < 0.001$) and 38.5°C ($P < 0.001$). The amount of ROS increased as temperature of incubation increased (Fig. 3 and Fig. 4).

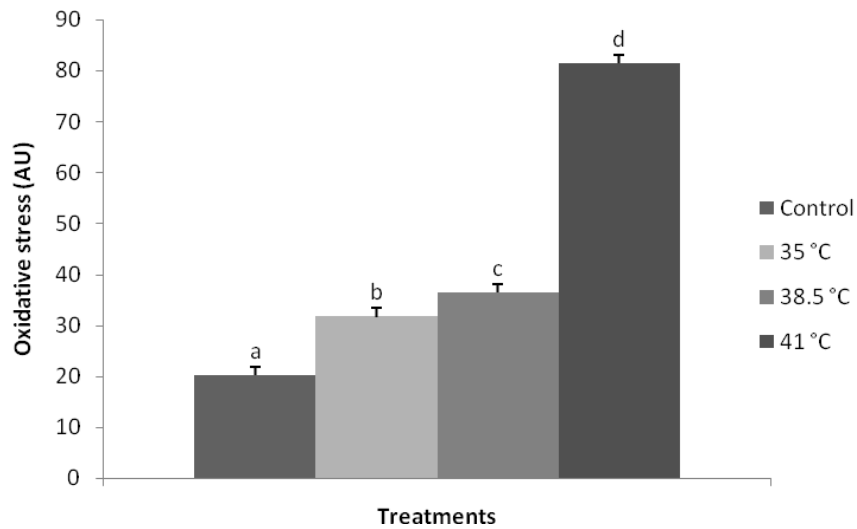


Figure 3: The effect of heat shock on Holstein sperm oxidative stress. Results are least-squares means \pm SEM of 4 replicates using 1×10^6 sperm/treatment. Different letters in each bar represents significant difference ($P < 0.05$).

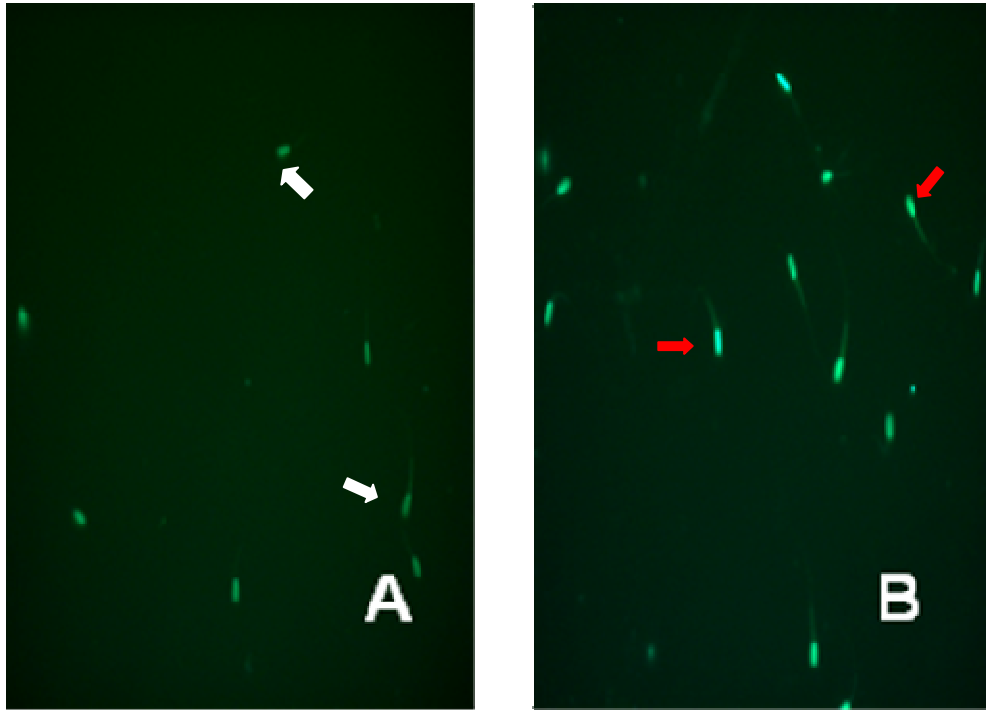


Figure 4: Representative image illustrating bovine sperm subjected to CellROX Green assay as a marker of oxidative stress. Panel A and B are Control and heat-shocked sperm, respectively. White arrows indicate low fluorescence intensity and low ROS generation. Red arrows indicate high fluorescence intensity and high ROS generation.

5.3 The effect of heat shock on mitochondrial activity of Holstein sperm

Exposure of Holstein sperm to heat-shock (41°C) for 4 h reduced ($P < 0.05$) mitochondrial activity as compared to control (Fig. 5 and 6). However, mitochondrial activity was similar among sperm cells exposed to control, 35, 38.5 and 41°C (Fig. 5).

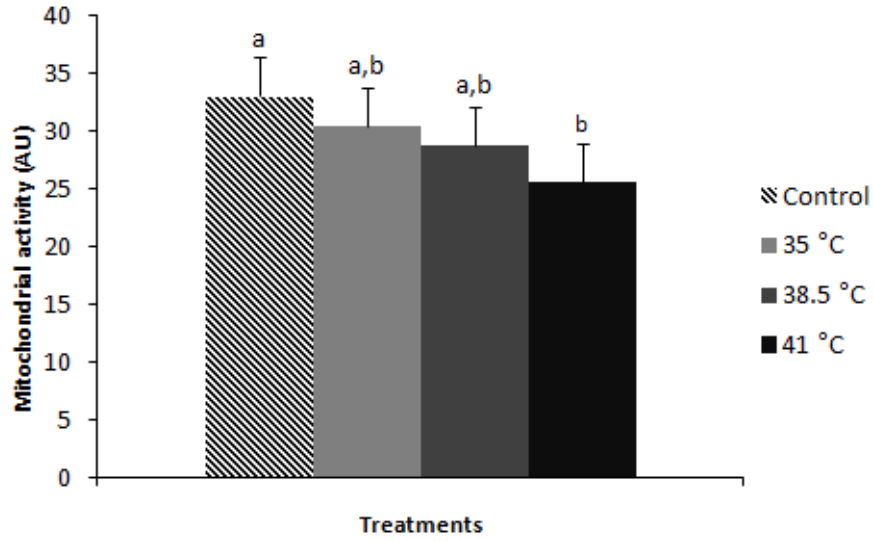


Figure 5: Effect of heat shock on mitochondrial activity of Holstein sperm. Results are least-squares means \pm SEM of 5 replicates using 1×10^6 sperm/treatment. Different letters in each bar represents significant difference ($P < 0.05$).

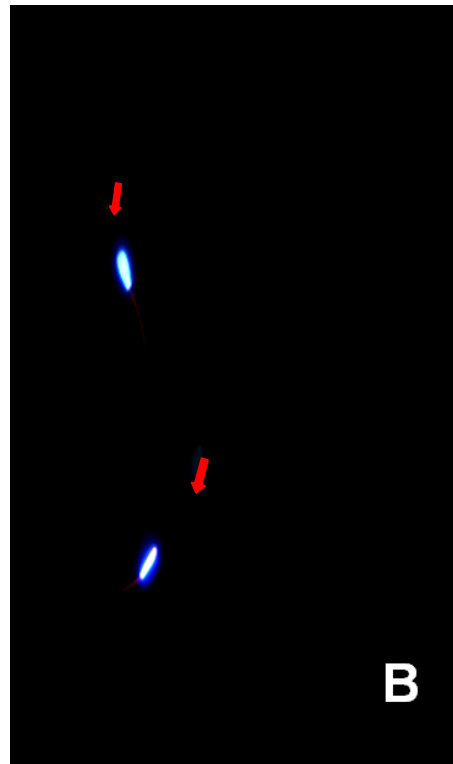
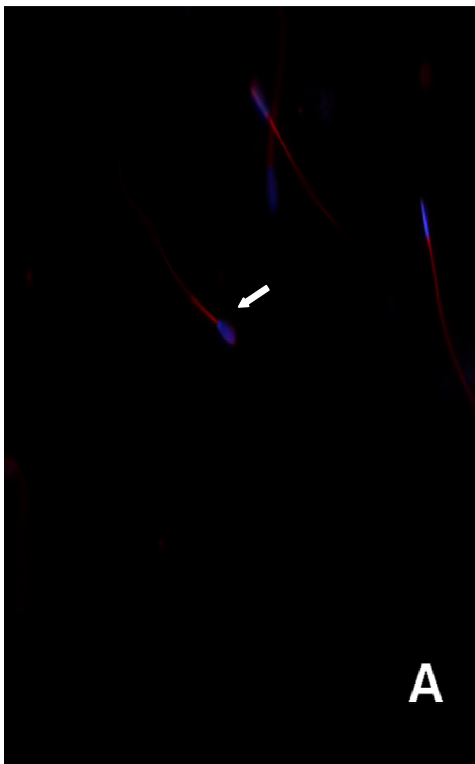


Figure 6: Representative image illustrating bovine sperm subjected to Mitotraker Red CMXRos combined with Hoechst 33342 as a marker of sperm mitochondrial activity (red) and DNA (blue). White arrows indicate mitochondrial activity and red arrows low mitochondrial activity

5.4 The effect of heat shock on caspase activity of Holstein sperm

Exposure of Holstein sperm to 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 h increased ($P < 0.0001$) caspase activity as compared to control (Fig. 7; Fig. 8). Moreover, 41°C heat shock increased ($P < 0.01$) caspase activity as compared to control and 35 °C.

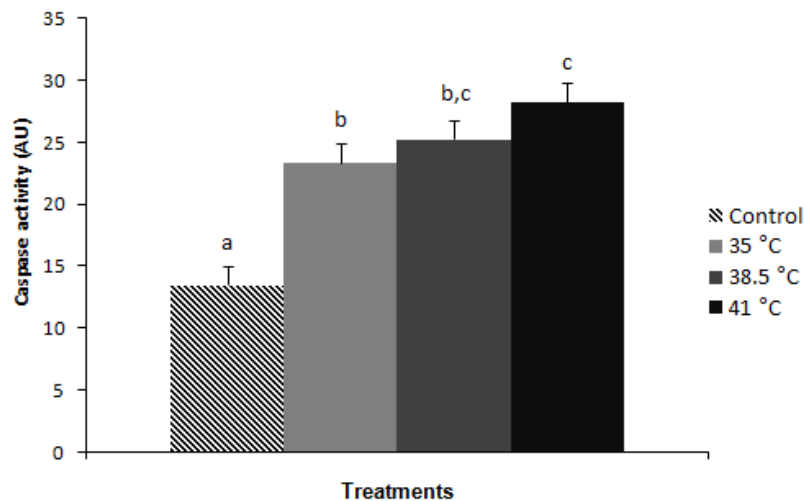


Figure 7: Effect of heat shock on caspase activity of Holstein sperm. Results are least-squares means \pm SEM of 5 replicates using 1×10^6 sperm/treatment. Different letters in each bar represents significant difference ($P < 0.05$).

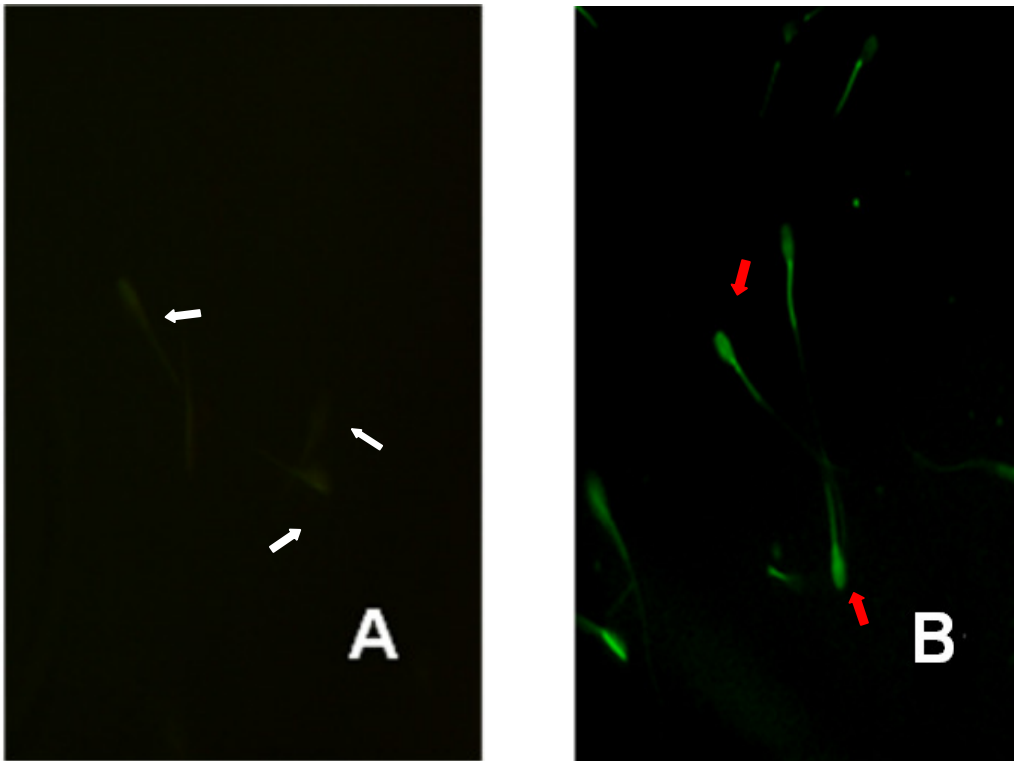


Figure 8: Representative image illustrating bovine sperm subjected to PhiPhiLux[®]G₁D₂. Green assay as a marker of caspase activity. Panel A and B are Control and heat-shocked sperm, respectively. White arrows indicate high caspase activity and red arrows low caspase activity

5.5 The effect of Holstein sperm heat shock on early embryonic development

A preliminary study was conducted to determine the best timing to evaluate the percentage of embryos that reached the 2-cell stage. The percentage of oocytes that reached the 2-cell stage was $9.2 \pm 1.11\%$, $10 \pm 1.11\%$, $24.8 \pm 1.11\%$, $25.2 \pm 1.11\%$ and $9.6 \pm 1.11\%$ at 29, 32, 35, 38 and 41 hpi, respectively. Development to the 2-cell stage was higher ($P < 0.011$) at 35 and 38 hpi. Therefore, the percentage of 2-cell embryos was evaluated at 35 hpi in the subsequent experiment.

The percentage of oocytes fertilized was reduced by sperm heat shock as compared to control ($P < 0.01$) and 35°C ($P < 0.01$), indicating a direct effect of heat shock on sperm penetration potential. Exposure of sperm to 41°C heat shock also reduced the percentage of oocytes that reached the 2-cell stage as compared to control

($P < 0.01$) and 35°C ($P < 0.05$). There was no difference between 38.5 and 41°C sperm incubation temperature on sperm fertilization rate and the percentage of oocytes that reached the 2-cell stage (Fig. 9).

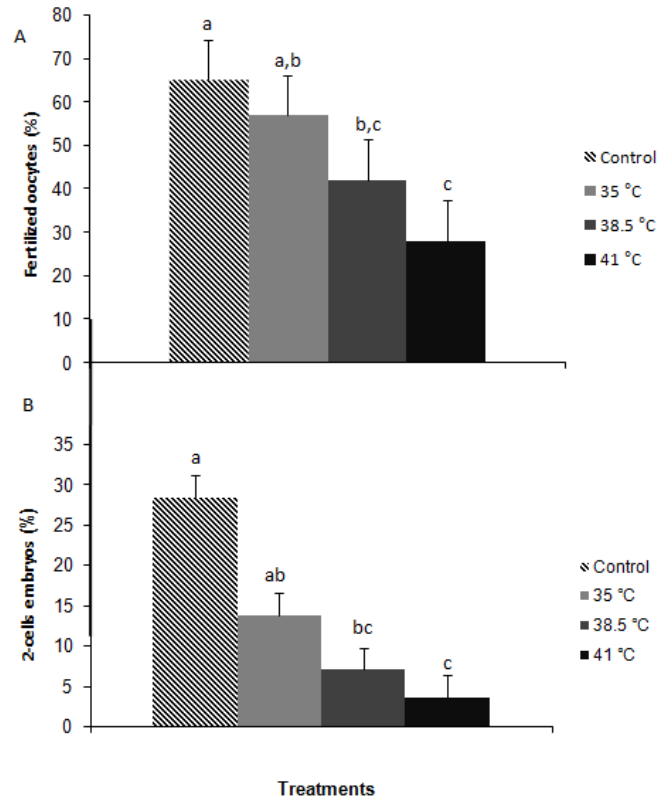


Figure 9: Effect of Holstein sperm heat shock on sperm fertilizing potential and subsequent embryonic development to the 2-cell stage. The percentage of oocytes fertilized (A) and that developed to the 2-cell stage (B) are shown. Results are least-squares means \pm SEM of 7 replicates using 140 to 210 oocytes/treatment. Different letters in each bar represents significant difference ($P < 0.05$).

5.6 The effect of Holstein sperm heat shock on early preimplantation embryo developmental kinetics

Exposure of sperm at 35°C , 38.5°C e 41°C affected 2-cell embryo development within each time evaluated. At 41°C the percentage of 2-cell embryos was reduced ($P < 0.001$) at all moments evaluated (Fig. 10 A). The proportion of oocytes that reached the 2-cell stage over time after fertilization with control and 35°C treated sperm increased over time from 29 ($P < 0.001$), 32 ($P < 0.001$) up to 35 hpi ($P < 0.01$) declining at 38 ($P < 0.001$) and 41 hpi ($P < 0.001$) (Fig. 10 A). In the other hand, the proportion of 2-cell

embryos derived from oocytes fertilized with sperm incubated at 38.5 and 41°C for 4 h was the same at 29, 32, 35, 38 and 41 hpi (Fig. 10 B).

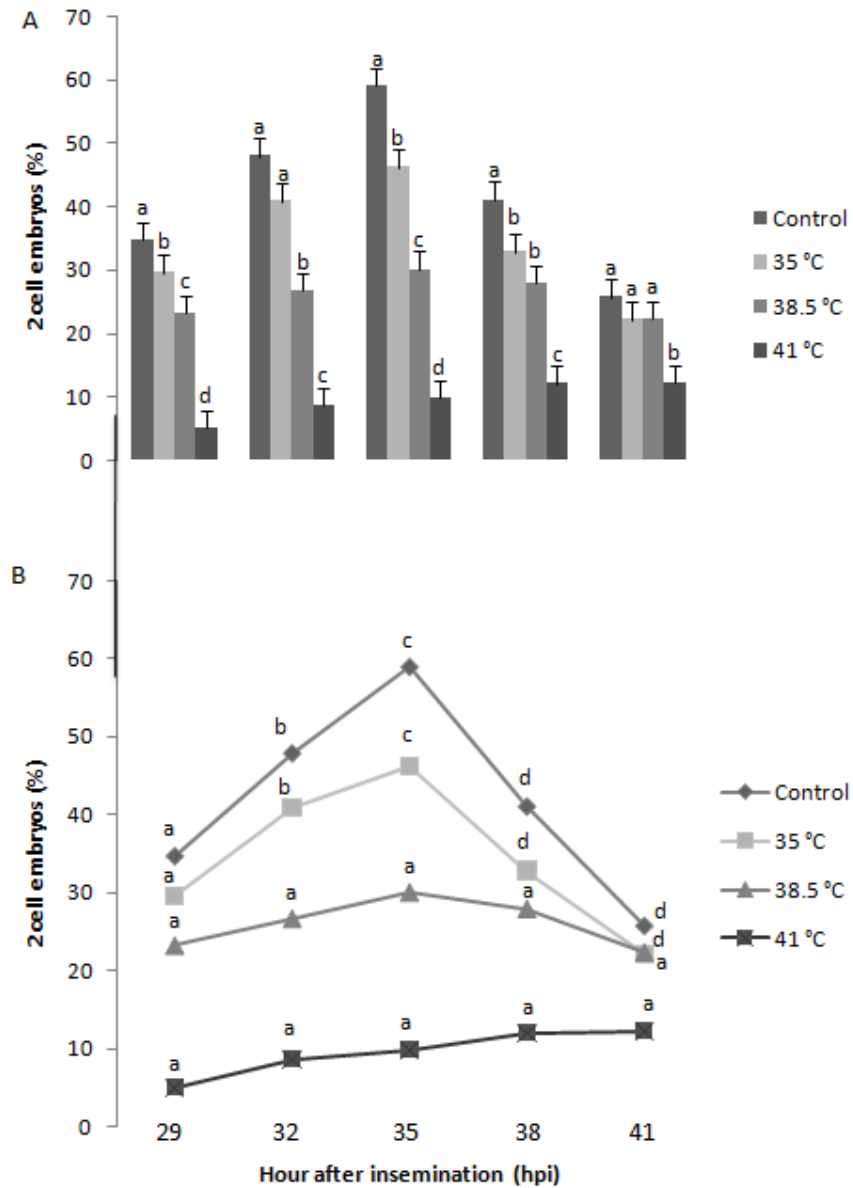


Figure 10: The effect of Holstein sperm heat shock on early preimplantation embryo developmental kinetics. The effect of temperature (A) and effect of time after insemination (B) on 2-cell embryo developmental kinetics are shown. Results are least-squares means \pm SEM of 4 replicates using 84 to 120 oocytes/treatment. Different letters in each bar represents significant difference ($P < 0.001$).

Cleavage rate was reduced by temperature of sperm incubation. Cleavage rate was similar over time for sperm incubated at 41°C. Cleavage rate at 29 (P< 0.01), 32 (P< 0.01), 35 (P< 0.01), 38 (P< 0.01) and 41 (P< 0.01) hpi was reduced for oocytes fertilized with sperm exposed to and 35°C, 38.5° C and 41°C as compared to control (Fig. 11 A).

However, cleavage rate was affected by time after insemination in each temperature. For oocytes fertilized with control sperm cleavage rate increased from 29 (P< 0.05) to 32 (P< 0.005) and 38 hpi (P< 0.001). Similarly, sperm exposure to 35°C increased cleavage rate over time from 29 (P< 0.001), 32 (P< 0.001), 38 hpi (P< 0.001) and 41 hpi (P< 0.001). Sperm incubation at 38.5°C increased cleavage rate at 35 (P< 0.002), 38 (P< 0.003) and 41 hpi (P< 0.001) (Fig. 11 B). On contrast, sperm heat shock arrested early cleavage divisions.

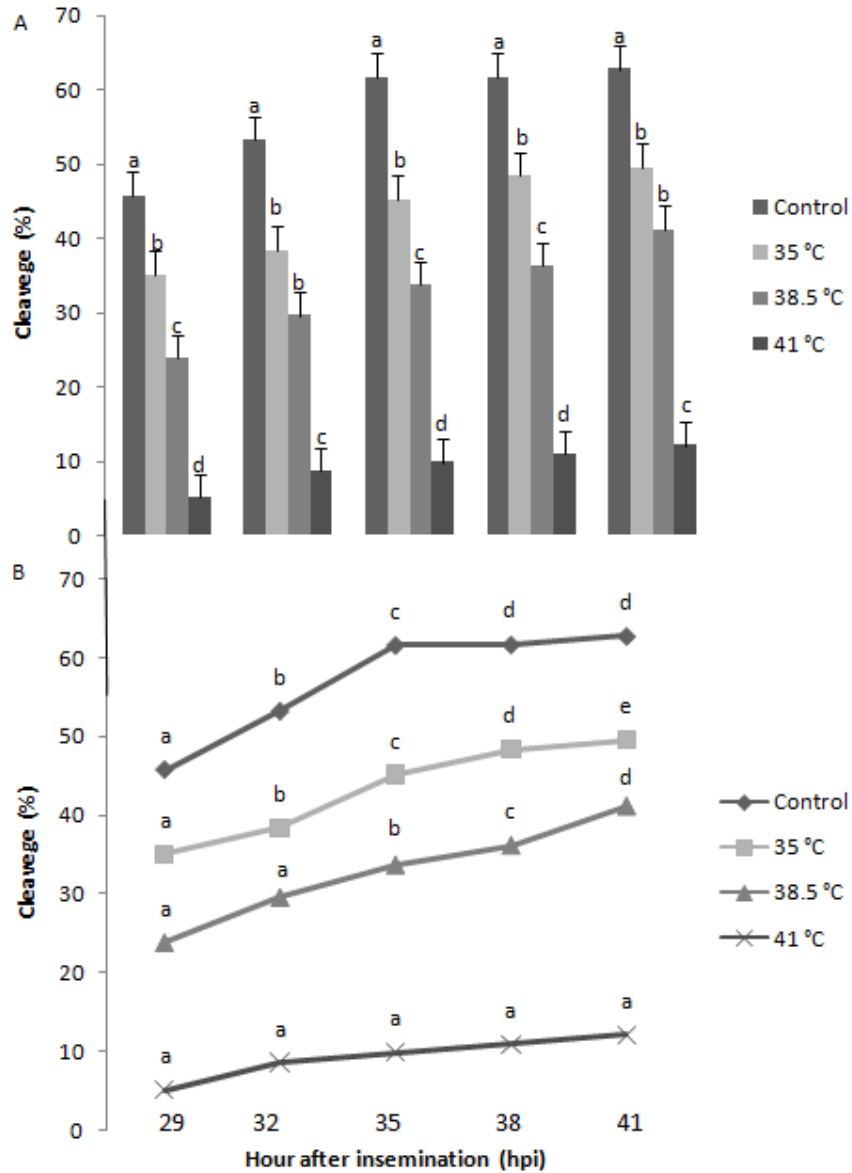


Figure 11: The effect of Holstein sperm heat shock on early preimplantation embryo developmental kinetics. The effect of temperature (A) and time after insemination (B) on cleavage rate are shown. Results are least-squares means \pm SEM of 4 replicates using 84 to 120 oocytes/treatment. Different letters in each bar represents significant difference ($P < 0.05$ -A) and ($P < 0.001$ -B).

5.7 Developmental competence of bovine embryos derived from Holstein sperm exposed to heat shock

Cleavage rate was inversely proportional to temperature of incubation as compared to control. The proportion of oocytes that cleaved at day 3 was reduced by sperm incubation at 35°C ($P < 0.0022$), 38.5°C ($P < 0.0001$) and 41°C ($P < 0.0001$) when compared to control. Heat shock also reduced cleavage rate as compared to 35°C ($P < 0.0002$) and control ($P < 0.0001$) (Fig. 12 A).

The percentage of oocytes that developed to the blastocyst stage at day 8 was reduced by sperm incubation at 35°C ($P < 0.02$), 38.5°C ($P < 0.002$) and 41°C ($P < 0.001$) when compared to control. The percentage of oocytes that developed to the blastocyst stage did not differ between embryos derived from sperm exposed to 41 and 38.5°C. However, 41°C sperm heat shock reduced blastocyst development as compared to embryos derived from control ($P < 0.001$) and 35°C ($P < 0.014$) treated sperm (Fig. 12 B). Similarly, the percentage of cleaved embryos that developed to the blastocyst stage did not differ between embryos derived from sperm exposed to 41 and 38.5°C. However, 41°C heat shock ($P < 0.002$) and 38.5°C ($P < 0.016$) reduced blastocyst development as compared to embryos derived from control-treated sperm (Fig. 12 C).

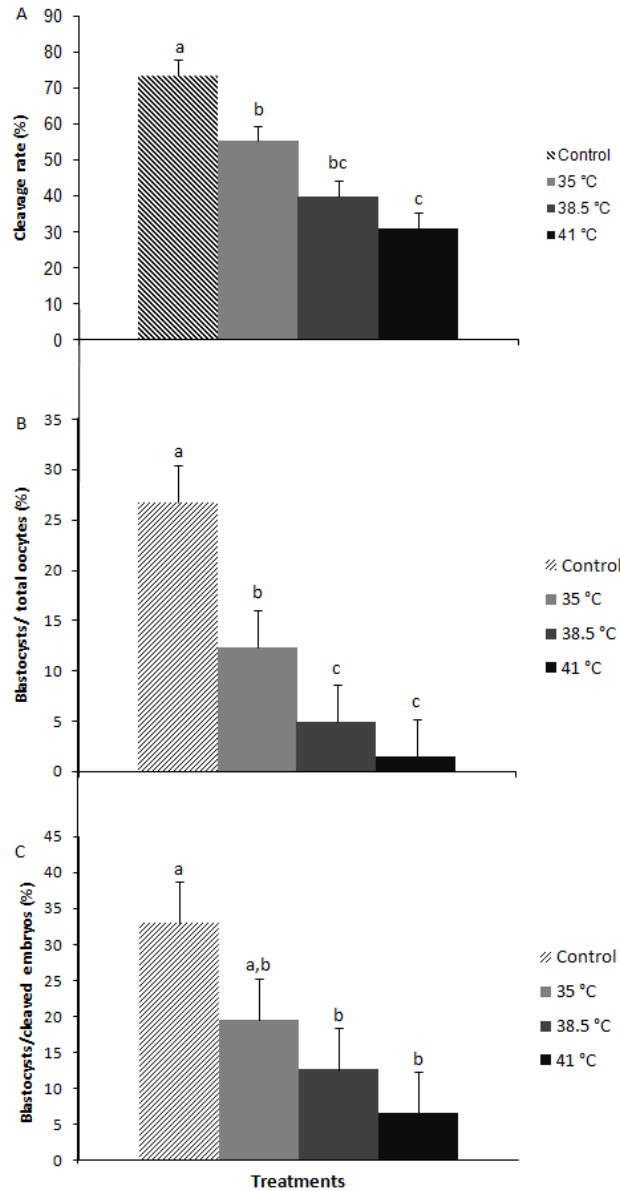


Figure 12: Effect of Holstein sperm heat shock on cleaved at day 3 (A), developmental potential of oocytes (B) and cleaved embryos (C) to the blastocyst stage. Results are least-squares means \pm SEM of 7 replicates using 140 to 210 oocytes/treatment. Different letters in each bar represents significant difference ($P < 0.001$ -A), ($P < 0.05$ -BC).

6 DISCUSSION

Direct exposure of *Bos taurus taurus* sperm cells to 41°C heat shock for 4 h impaired sperm function. Sperm heat shock reduced sperm motility and fertilizing potential, altered the kinetics of early preimplantation embryonic development and

reduced the proportion of oocytes that reached the blastocyst stage following fertilization. These functional changes were accompanied by heat shock-induced sperm oxidative stress and caspase cascade.

The *in vitro* model used in this study has been broadly used to determine the direct effect of temperature in sperm cells (Chandolia *et al.*, 1999; Pérez-Crespo *et al.*, 2008; Hendricks *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2014). Moreover, the use of frozen-thawed ejaculated sperm under elevated temperature mimics the adverse environmental conditions caused by heat stress during natural breeding or artificial insemination (AI) in the summer. It is well known that summer heat stress leads to hyperthermia in the lactating dairy cow which can undergo body temperature oscillations above 40-41°C (Ealy *et al.*, 1993; Rivera and Hansen, 2001). Therefore, the sperm cell is subjected to these temperatures during transport, capacitation and fertilization in the female reproductive tract.

Indeed, sperm exposure to 41°C reduced motility in a time-dependent manner. While heat shock did not affect sperm motility during the first 2 hours of incubation, there was a great reduction in motility at 3 and 4 h incubation. Sperm motility is a key factor to determine semen quality and fertilizing capability (Petrunkina *et al.*, 2007). It is related to the availability of adenosine triphosphate (ATP): the frequency and amplitude of the tail movement of sperm is closely related to the dephosphorylation of ATP (Kim *et al.*, 2016). It is possible that heat-shocked sperm has a high energetic demand leading to ROS unbalance (Aitken *et al.*, 2012) compromising mitochondrial respiratory chain, reducing ATP synthesis and directly affecting sperm motility (Ferramosca *et al.*, 2013).

Other studies have investigated the effect of 38.5°C and 41°C incubation for 4 h demonstrating the negative effect of heat shock on motility at a single time point (Chandolia *et al.*, 1999; Pérez-Crespo *et al.*, 2008; Hendricks *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2014). In the current study the magnitude of the deleterious effects of temperature on sperm motility was greater over time. Moreover, the heat-shock induced reduction in motility was followed by a drop in sperm fertilizing potential. For example, heat shock during 4 hours reduced motility to < 25% and fertilizing potential to < 35%. On the other hand, sperm incubation at physiological body temperature (38.5°C) did not affect motility, but reduced sperm fertilizing potential to a level similar to heat-shocked sperm, indicating the deleterious effect of 38.5°C incubation on the sperm cell. This

may be due to the fact that this study was conducted with cryopreserved semen. It is possible that cryopreservation turned these cells more prone to damage. In fact, sperm incubation at 38.5°C increased ROS production as compared to 35°C and control. There is evidence that production of ROS causes lesions to the sperm DNA and interfere with the fertilizing capacity of spermatozoa (Irvine *et al.*, 2000).

The current study demonstrated that heat shock enhanced sperm oxidative stress indicating that at least part of the deleterious effect of temperature on sperm function is mediated by ROS. As temperature of sperm incubation increased, ROS generation also increased. Such heat-induced ROS production was greater in sperm cells subjected to 41°C as compared to other temperatures. The sperm cell is prone to oxidative damage. The small amount of cytoplasm limits sperm enzymatic antioxidant system (Mazur *et al.*, 2000). Moreover, the abundance of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in sperm membranes (Parks e Hammerstedt, 1985) turns this cell more vulnerable to ROS. Cellular ROS unbalance damages DNA, proteins, lipids and other cellular components (Benchaib *et al.*, 2003) leading to sperm poor functionality (Du Plessis *et al.*, 2010). For example, high ROS levels can negatively affect sperm cell leading to a reduction in motility and mitochondrial potential (Aitken *et al.*, 2012).

In the current study sperm mitochondrial activity was not different among sperm incubated at 35°C, 38.5°C and 41°C for 4 hours. This indicated that 41°C for 4 hours did not affect mitochondrial function as compared to other incubation temperatures. This result agrees with previous studies. Hendricks and Hansen (2009) demonstrated that exposure of sperm to heat shock for 4 hours did not affect mitochondrial membrane potential (MMP). On contrast, Rahman *et al.* (2014) demonstrated that MMP was reduced by 41°C heat shock for 4 hours as compared to 38.5°C and non-incubated control. Therefore, the ability of heat shock to alter sperm mitochondrial function still controversial. Interestingly, in the current study 41°C heat shock caused a minor reduction in sperm mitochondrial activity as compared to non-incubated control. This suggests that this drop on mitochondrial activity was caused by incubation other than temperature.

Group II caspase activity (caspase 2-, 3- and -7) was greater for heat-shocked sperm than sperm incubated at physiological testicular temperature and non-incubated control. This heat-induced increase in caspase activity is indicative that heat shock triggered the apoptotic cascade in sperm cells. The mitochondrial pathway of caspase

activation has been described to occur in response to cellular stresses in different cell types (Du, C. *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2000). Moreover, caspase-3, -7 and caspase-9 has been immunolocalized in fresh and frozen-thawed spermatozoa (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008). Even though heat shock-induced increase in caspase activity is suggestive that the mature sperm can undergo apoptosis, further studies are necessary to confirm this hypothesis. Previous studies have found controversial results on the ability of the mature sperm to undergo apoptosis after exposure to heat shock (Hendricks and Hansen, 2009; Rahman *et al.*, 2014). However, there is evidence that cryopreservation of ejaculated bull semen induced early stage of apoptosis as indicated by phosphatidylserine translocation across the plasma membranes (Anzar *et al.*, 2002), indicating the ability of mature sperm to initiate the apoptosis cascade.

The heat shock-induced reduction in sperm motility was accompanied by a reduction in sperm fertilizing potential. Sperm exposure to 41°C for 4 h reduced fertilization rate and the proportion of oocytes that reached the 2-cell and blastocyst stage as compared to sperm incubated at 35°C and non-incubated control. This suggests that heat shock can compromise the sperm ability to perform physiological processes in the female reproductive tract including the competence of the spermatozoa to penetrate the zona pellucida, undergo acrosome reaction, activate the oocyte and delivery the paternal genome during fertilization to generate a normal embryo and a healthy offspring (Anton and Krawetz, 2012; Henkel, 2012).

Sperm heat shock also altered 2-cell embryo and cleavage rate developmental kinetics reducing the proportion of oocytes that reached the 2-cell stage and cleaved at all the moments evaluated (29 to 41 hpi). This indicated that sperm heat shock compromised early cleavage divisions arresting early preimplantation embryonic development. During fertilization, sperm delivery PLC zeta into oocyte leading to a serial cytosolic $\text{Ca}^{(2+)}$ oscillations (Saunders *et al.*, 2002) that are prerequisite to oocyte activation and normal pre- and pos-implantation embryo development (Ozil *et al.*, 2005; 2006). Moreover, spermatozoa with lack and/or defect of PLC zeta fail to promote adequate pattern of $\text{Ca}^{(2+)}$ oscillations negatively affecting oocyte activation, pronucleus formation, cleavage and development to the blastocyst stage (Knott *et al.*, 2005). Therefore, it is reasonable that heat shock could compromise the PLC zeta, affecting subsequent oocyte activation, pronucleus formation and first cleavage.

The low cleavage rate from oocyte fertilized with heat-shocked spermatozoa could also be due the oxidative stress. In the present study, heat shock resulted in an increased level of ROS in spermatozoa. In agreement with this hypothesis, it has been described that sperm level of oxidative stress and/or susceptibility to oxidative stress affect the first cleavage and embryo development after bovine oocyte fertilization (Simões et al., 2013; de Castro et al., 2016). In this way, sperm oxidative stress induced by heat shock could be responsible for the low cleavage from oocytes fertilized with heat-shocked spermatozoa. Spermatozoa oxidative stress is associated with DNA fragmentation (Aitken et al., 2014). Interesting, mouse zygotes respond to sperm DNA damage delaying DNA replication in the paternal pronuclei, retarding embryonic development particularly in the first cell cycle at the G2/M and ultimately arresting embryo development (Gawecka et al., 2013). In the present study, sperm damage was not evaluated by DNA fragmentation, but by caspase activity instead. However, Rahman et al. (2014) detected an increase in DNA fragmentation in bovine heat-shocked spermatozoa. In this way, we speculate that that the increase in caspase activity in heat-shocked spermatozoa observed in the present study, could have resulted in sperm DNA fragmentation leading to cleavage delay and embryonic arrest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Brazilian research funding agencies: Coordination for the Improvement of Higher Level or Education Personnel (CAPES).

REFERENCES

Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2010;16:3-13.

Aitken RJ, Gibb Z, Mitchell LA, Lambourne SR, Connaughton HS, De Iuliis GN. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod.* 2012;87:110.

Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, 16, 31-38, 2014.

Anzar M, He L, Buhr M M., Kroetsch T G, Pauls K P. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Biol. Reprod.* 66, 354–360 (2002)

Amaral A, Ramalho-Santos J. The male gamete is not a somatic cell--the possible meaning of varying sperm RNA levels. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18:179-80.

Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, García JF, Paredes SD, Rodríguez AB, et al. Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril.* 2008;90:1340-7.

Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003;18:1023-8.

Celeghini EC, de Arruda RP, de Andrade AF, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim.* 2007;42:479-88.

Chandolia RK, Reinertsen EM, Hansen PJ. Short communication: lack of breed differences in responses of bovine spermatozoa to heat shock. *J Dairy Sci.* 1999;82:2617-9.

de Castro LS, Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Losano JDA, Nichi M, VH, Visintin JA, Assumpção MEO. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation., 1-11, 2016.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102:33-42.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102:33-42.

Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol.* 2010;7:153-61.

Ealy, A.D.; Drost, M.; Hansen, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 2899-2905, 1993

Fernandes CE, Dode MA, Pereira D, Silva AE. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology.* 2008;70:1560-8.

Ferramosca A, Pinto Provenzano S, Montagna DD, Coppola L, Zara V. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology.* 2013;82:78-83.

Gottlieb RA. Role of mitochondria in apoptosis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2000;10:231-9.

Hendricks KE, Hansen PJ. Can programmed cell death be induced in post-ejaculatory bull and stallion spermatozoa? *Theriogenology.* 2009;71:1138-46.

Hendricks KE, Martins L, Hansen PJ. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to post-ejaculatory aging and heat shock: development to the blastocyst stage and sex ratio. *J Reprod Dev.* 2009;55:69-74.

Hickman CF, Clinton M, Ainslie A, Ashworth CJ, Rooke JA. Heat shock induces interferon-TAU gene expression by In vitro- produced bovine blastocysts. *Am J of Reprod Immunol.* 2013.

Huang SY, Kuo YH, Tsou HL, Lee YP, King YT, Huang HC, et al. The decline of porcine sperm motility by geldanamycin, a specific inhibitor of heat-shock protein 90 (HSP90). *Theriogenology.* 2000;53:1177-84.

Hussain NS, Conaway CC, Guo N, Asaad W, Fiala ES. Oxidative DNA and RNA damage in rat liver due to acetoxime: similarity to effects of 2-nitropropane. *Carcinogenesis.* 1990;11:1013-6.

Jedrzejczak P, Pawelczyk L, Taszarek-Hauke G, Kotwicka M, Warchoń W, Kurpisz M. Predictive value of selected sperm parameters for classical in vitro fertilization procedure of oocyte fertilization. *Andrologia*. 2005;37:72-82.

Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1997;13:271-82.

Kim S, Hoope S, Agca C, Agca Y. Post-thaw ATP supplementation enhances cryoprotective effect of iodixanol in rat spermatozoa *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1-4:5, 2016.

Kong Q, Lin CL. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:1817-29.

Knott, J.G., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Schultz, R.M., Williams, C.J., 2005. Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase C ζ in triggering Ca²⁺ oscillations during fertilization. *Biol. Reprod.* 72, 992–996.

Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J*. 2011;436:687-98.

Larsson B, Rodríguez-Martínez H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci*. 2000;60-61:327-36.

Lechniak D, Strabel T, Bousquet D, King AW. Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim*. 2003;38:224-7.

Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*. 1979;48:76-86.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.

Lima RS, Risolia PH, Ispada J, Assumpção ME, Visintin JA, Orlandi C, et al. Role of insulin-like growth factor 1 on cross-bred *Bos indicus* cattle germinal vesicle oocytes exposed to heat shock. *Reprod Fertil Dev*. 2016.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86:147-57.

Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod*. 2004;19:2267-76.

Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, Grizard G, Durand P, et al. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum Reprod*. 2007;22:380-8.

Mazur P, Katkov II, Katkova N, Critser JK. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*. 2000;40:187-209.

Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*. 2010;139:287-301.

Mondou E, Dufort I, Gohin M, Fournier E, Sirard MA. Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. *Mol Hum Reprod*. 2012;18:425-34.

Monterroso VH, Drury KC, Ealy AD, Edwards JL, Hansen PJ. Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. *Theriogenology*. 1995;44:947-61.

Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galán Y, Varela-Fernández E, Gallardo-Bolaños JM, Muriel A, González-Fernández L, et al. Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl*. 2008;29:213-21.

Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*. 2004;429:154.

Ozil JP, Banrezesa B, Tótha S, Panb H, Schultzb RM. Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev. Biol*. 300-2, 534–544, 2006.

Ozil, JP, Markoulak, S, Toth S, Matson S, Banrezes B., Knott JG, Schultz RM, Huneau D, Ducibella T. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained [Ca²⁺]_{cyt} signal in the mouse. *Dev. Biol*. 282, 39–54, 2005.

Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2004;81 Suppl 1:802-9.

Paasch U, Grunewald S, Dathe S, Glander HJ. Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1030:403-9.

Parks JE, Hammerstedt RH. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod*. 1985;32:653-68.

Parrish J, Susko-Parrish J, Winer M, First N. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*. 1988:1171-80.

Patterson SD, Spahr CS, Daugas E, Susin SA, Irinopoulou T, Koehler C, et al. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ*. 2000;7:137-44.

Pérez-Crespo M, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev*. 2008;75:40-7.

Pratt WB. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998;217:420-34.

Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*. 2007; 134: 3–17).

Rahman MB, Vandaele L, Rijsselaere T, El-Deen MS, Maes D, Shamsuddin M, et al. Bovine spermatozoa react to in vitro heat stress by activating the mitogen-activated protein kinase 14 signalling pathway. *Reprod Fertil Dev*. 2014;26:245-57.

Rivera R M, Hansen P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* (2001) 121, 107–115

Rodrigues TA, Ispada J, Risolia PH, Rodrigues MT, Lima RS, Assumpção ME, et al. Thermoprotective effect of insulin-like growth factor 1 on in vitro matured bovine oocyte exposed to heat shock. *Theriogenology*. 2016.

Sabés-Alsina M, Tallo-Parra O, Mogas MT, Morrell JM, Lopez-Bejar M. Heat stress has an effect on motility and metabolic activity of rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2016;173:18-23.

Saunders CM., Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533-3544, 2002.

Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11:837-43.

Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004;82:378-83.

Setchell BP. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil.* 1998;114:179-94.

Simões R, Feitosa WB, Siqueira AFP, Nichi M, Paula-Lopes FF, Groke M M, Peres MA, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção MEO. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome *Reproduction and Fertility*, 1741–7899, 2013.

Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol.* 2000;195:1-65.

Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod.* 2009;24:2061-70.

Van Langendonck A, Donnay I, Schuurbiens N, Auquier P, Carolan C, Massip A, et al. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J Reprod Fertil.* 1997;109:87-93.

Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology.* 1992;38:905-19.

Waites GMH. *The testis.* Academic Press ed. New York 1970.

Wang P, Wang YF, Wang H, Wang CW, Zan LS, Hu JH, et al. HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm. *Zygote.* 2014;22:239-45.

Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol.* 1998;275:L110-7.

Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 1992;72:1063-81.

Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod.* 1999;60:996-1005.

Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:984-91.

Yadav BR, King WA, Betteridge KJ. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1993;36:434-9.

7. CONCLUDING REMARKS

This study aimed to mimic the effect of heat stress on sperm behavior in the reproductive tract of the cow. It is well known that heat stress in the lactating dairy cow leads to a hyperthermia with body temperatures ranging from 40-41°C. Exposure of

mature sperm to heat shock (41°C for 4h) reduced sperm motility and fertilizing potential, altered the kinetics of 2-cell embryo development and cleavage rate and reduced the proportion of oocytes that reached the blastocyst stage following fertilization. These functional changes were accompanied by heat shock-induced sperm oxidative stress and induction of caspase cascade. Even though sperm incubation at body temperature physiological control (38.5°C) did not affect sperm motility, it increased ROS production, compromised sperm fertilizing potential and subsequent preimplantation embryonic development, suggesting a negative effect of this physiological temperature. Such negative effect of 38.5°C may be because this study was conducted with cryopreserved semen. It is possible that cryopreservation turned the sperm cell prone to further temperature stress. Even though cryopreservation is advantageous to preserve sperm for undetermined time, it reduces sperm metabolism, motility and integrity compromising sperm fertilizing ability.