

## Atualização sobre o estresse térmico testicular

*Updates on testicular heat stress*

Guilherme Rizzoto<sup>1</sup>, Abdallah Mohamed Shahat<sup>2</sup>, John Patrick Kastelic<sup>2</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal - UNESP - FMVZ, Botucatu, SP, Brasil. <sup>2</sup> Department of Production Animal Health - UCVM, University of Calgary, Calgary, AB, Canada.

### Resumo

Os testículos, são mantidos no escroto a uma temperatura ~3-5°C abaixo da corporal. Quando a temperatura das gônadas se eleva, instala-se um quadro de estresse térmico (ET) testicular. O ET afeta a espermatogênese, e observam-se, já na primeira semana pós-ET, impactos na cinética, concentração e morfologia espermática. Classicamente, tais efeitos eram creditados à incapacidade da circulação local de atender ao aumento do metabolismo testicular devido ao aumento da temperatura local. Contudo, estudos recentes demonstraram que a hipóxia não era a causa da degeneração testicular. Atualmente, credita-se os efeitos deletérios do ET ao aumento local das espécies reativas de O<sub>2</sub>. Nesta situação, apesar da ativação de mecanismos antioxidantes (aumento das HSP e GPX1) e de proteção do DNA (aumento da P53), estes não são suficientes, sendo desencadeada a apoptose. Os efeitos deletérios do ET testicular podem ser mitigados pela melatonina, que pode ser tanto administrada aos animais ou adicionada ao sêmen para que desencadeie seus efeitos protetores.

**Palavras-chave:** Termorregulação escrotal; estresse térmico; escroto; testículos

### Abstract

*The testes are kept in the scrotum at a ~3-5°C below body core temperature. When the temperature of the gonads increases, a process called heat stress (HS) takes place. The HS impairs spermatogenesis, and in the first week post-HS, impacts in sperm kinetics, concentration, and morphology are observed. Classically, such effects were credited to the incapacity of the local circulation to sustain the higher testicular metabolism due to the increased temperature. However, recent studies demonstrated that it was not the cause of testicular degeneration. The novel perspective credits the deleterious impacts of the HS to the local increase of the reactive oxygen species. Importantly, although there's an activation of antioxidant defenses (increase in HSP and GPX1) and DNA protection (increase in P53), such mechanisms are not sufficient, unfolding the apoptotic cascade. Lastly, some of the negative effects of HS can be mitigated by melatonin, which can either be given to the animals or added to the sperm to exert its protective effects.*

**Keywords:** Scrotal thermoregulation; heat stress; scrotum; testes.

### Introdução

Os testículos dos mamíferos, predominantemente situam-se no escroto, a uma temperatura ~3-5°C abaixo da corporal, condição indispensável à espermatogênese (Rizzoto e Kastelic, 2019). A manutenção desta condição depende de mecanismos termorregulatórios que envolvem a bolsa testicular externa, que facilita as trocas de calor com o ambiente, glândulas sudoríparas, que permitem o resfriamento cutâneo por evaporação, além da túnica muscular escrotal subcutânea dartus e músculo cremaster, presente no cordão espermático, que ao contraírem-se ou relaxarem-se, aproximam ou afastam os testículos do corpo, segundo a necessidade de aquecê-los ou resfriá-los. Outro importante processo ocorre no cone vascular, onde a convoluta artéria testicular, antes de chegar ao testículo, passa em íntimo contato com o sistema de retorno venoso testicular, formado pelas vênulas extremamente ramificadas e finas do plexo pampiniforme. Este arranjo permite que o sangue arterial seja resfriado pelo sangue venoso, à medida que avança em direção ao testículo. Para maiores detalhes sobre termorregulação testicular consulte Senger (2015) e Rizzoto e Kastelick (2019).

Quando os mecanismos termorregulatórios falham e a temperatura testicular eleva-se acima da fisiológica, ocorre o estresse térmico (ET) que promove rápidas mudanças na perfusão sanguínea e

\*Correspondência: joao.cp.ferreira@unesp.br

Recebido: 7 de maio de 2022

Aceito: 17 de maio de 2022

expressão gênica testiculares (Rizzoto et al., 2020a,b, 2020c), seguidas pela deterioração da qualidade seminal (Alves et al., 2016; Rossi et al., 2021; Rizzoto et al., 2020b).

A eficiência termorregulatória varia entre animais e raças (Skinner and Louw et al., 1966). Por exemplo, raças zebuínas (*B. indicus*), são mais eficientes que raças bovinas europeias (*B. taurus*), sendo, portanto, mais resistentes aos impactos nocivos do ET (Nichi et al., 2006). Touros *B. indicus*, ao serem submetidos a elevadas temperaturas ambientais (~40°C) têm ejaculados com maior percentual de espermatozoides móveis e de morfologia normal e menor tempo de recuperação da qualidade espermática pós-ET, quando comparados aos *B. taurus* (Skinner and Louw, 1966). Da mesma forma, apesar das elevadas temperaturas do verão diminuírem a qualidade espermática de *B. taurus* e *B. indicus*, os primeiros apresentam maior grau de peroxidação lipídica e maior porcentagem de espermatozoides defeituosos no ejaculado (Nichi et al., 2006).

A maior eficiência termorregulatória notadamente relaciona-se com características anatômicas. A maior resistência ao ET testicular das raças bovinas zebuínas está associada a presença de longas pregas cutâneas, maior densidade de glândulas sudoríparas escrotais (Carvalho et al., 1995) e menor espessura da parede da artéria testicular, o que facilita a troca de calor entre o sangue arterial e venoso no cone vascular testicular (Brito et al., 2004).

Com a intensificação do aquecimento global projetado para os próximos anos, há a expectativa de que os efeitos deletérios do ET sobre os animais sejam exacerbados (Groen et al., 1997). Esse cenário, que terá grande impacto nos processos produtivos, sinaliza para a necessidade de se entender melhor o ET e seus impactos testiculares, e de desenvolvimento de novas estratégias de enfrentamento desta realidade. Esta revisão sumariza alguns achados recentes sobre os relacionados ao ET testicular.

## Estresse térmico testicular

### *Alterações seminais*

As células da linhagem espermatogênica são sensíveis ao ET, sendo os espermátocitos primários e as espermátides iniciais os mais suscetíveis (Cataldo et al., 1997). Em carneiros, nos primeiros 4-10 d pós-ET testicular já se observa a redução da motilidade, concentração, e de células morfologicamente normais no ejaculado (Rocha et al., 2015; Rossi et al., 2021), enquanto que em *B. taurus* (Vogler et al., 1993) e *B. indicus* (Garcia-Oliveros et al., 2020), isto é observado 9 e 18d pós-ET. Em murinos, 8h pós-ET escrotal (40°C/20 min) já ocorre dano espermático e acrossomal, evidenciando a sensibilidade dos espermatozoides epididimários (Rizzoto et al., 2020b).

O impacto do ET sobre as características espermáticas depende do grau de elevação da temperatura testicular. Em ovinos, o aumento ~1,68°C reduz a motilidade espermática para ~46%, no dia (D) 21 pós-ET e aumenta as formas anormal no ejaculado para ~60% no D35 (Alves et al., 2018). Modelos mais agressivos, com aumento de 4-6°C, levam a diminuições drásticas da concentração e ausência de motilidade espermática entre D14 e 21 pós-ET (Rocha et al., 2015; Rossi et al., 2021).

A espermatogênese fisiológica em carneiros dura ~47d (Senger, 2015). O tempo de recuperação das características espermáticas pós-ET varia em função do gradiente da temperatura e gravidade do insulto. O momento da recuperação da qualidade espermática está relacionado às temperaturas da superfície escrotal durante o ET. Maiores temperaturas (~38°C~) resultam em recuperação mais tardia (60-100 d, Rocha et al., 2015) que menores (~32,5°C; 49 d, Alves et al., 2018).

### *Respostas fisiológicas adaptativas ao ET testicular*

O dogma central da degeneração testicular era que sob ET, elevava-se a taxa metabólica do testículo sem que houvesse um aumento correspondente do seu fluxo, o que gerava hipóxia e morte celular (Waites and Setchell, 1964). Contudo, estudos recentes vêm mudando essa concepção (Kastelic et al., 2017, 2019; Barros Adwell., 2018; Rizzoto et al., 2020a).

Em carneiros submetidos ao ET testicular sob três diferentes concentrações ambientais de O<sub>2</sub> (hiperóxia, normóxia e hipóxia), os impactos reprodutivos causados pelo ET, não foram replicados pela hipóxia e nem prevenidos pela hiperóxia, evidenciando, que os efeitos deletérios eram consequências do aumento da temperatura por si só, e não da hipóxia testicular (Kastelic et al., 2017). Por outro lado, em touros expostos a ambientes de 35 ou 5°C, observou-se pela primeira vez o maior fluxo sanguíneo testicular naqueles mantidos a 35°C (Barros Adwell et al., 2018).

Determinado que o fluxo sanguíneo testicular era modulado pela temperatura ambiente, em três estudos inovadores foram elucidadas as adaptações testiculares a diferentes concentrações de O<sub>2</sub> e

temperaturas. Nestes, foi mensurado o fluxo sanguíneo na artéria testicular (flowprobe 2SB1551; Transonic®, NY, USA) e colhidas amostras do sangue arterial sistêmico e do sangue venoso do plexo pampiniforme. No primeiro (Rizzoto et al., 2018), em carneiros mantidos sob diferentes concentrações de O<sub>2</sub> (100, 21 e 13%), o tratamento hipóxico (13%) elevou a taxa de extração de O<sub>2</sub> e o fluxo sanguíneo testiculares, suprindo a demanda O<sub>2</sub> (Rizzoto et al., 2018). No segundo e no terceiro (Rizzoto et al., 2019, 2020a), respectivamente, em carneiros e touros submetidos a diferentes temperaturas testiculares (35, 37 e 40°C), observou-se que o aumento da temperatura elevou o fluxo sanguíneo e a extração testicular de O<sub>2</sub>, atendendo a demanda metabólica. Da mesma forma, a ausência de alteração dos marcadores metabólicos (pH, lactato sanguíneo), evidenciou que a resposta vascular manteve a homeostase testicular. Estes achados se opõem firmemente ao dogma de que a degeneração testicular era causada pela reduzida circulação e hipóxia consequentes ao ET. Para mais detalhes consultar Rizzoto e Kastelic (2019).

#### *Fisiopatogenia da degeneração testicular pós-estresse térmico*

Para avaliar os possíveis mecanismos endócrinos e moleculares relacionados ao ET testicular, touros Nelore foram submetidos à insulação testicular por 12, 24 ou 48 h e subsequentemente castrados. A seguir foram avaliados alguns transcritos gênicos (RT-PCR) e concentração de testosterona (Rizzoto et al., 2020c) testiculares. Nas primeiras 12h sob ET observou-se aumento ( $P < 0,05$ ) dos transcritos do antioxidante Glutathione peroxidase-1 (GPX1-a) e da chaperona Heat shock protein 70 (HSP70). Como os sistemas antioxidantes são fundamentais para neutralizar o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Lewis et al., 2006) e as chaperonas têm função primária de realizar o dobramento e redobramento das proteínas (Bukau et al., 2006), estes dois achados sinalizam que a primeira resposta ao ET é o aumento intracelular das EROS (Gu et al., 2015), que, por sua vez, devem estar envolvidas com o acúmulo intracelular de proteínas não dobradas ou mal dobradas (Read and Schröder, 2021).

Ainda, no estudo em Nelore (Rizzoto et al., 2020c), observou-se redução dos transcritos da StAR às 12 h e a redução da concentração de testosterona testicular, que foi ~10x menor nos touros após 48h de insulação, comparada a dos não insulados ( $295,5 \pm 122,8$  vs  $3119 \pm 973,3$  ng/g de tecido,  $P < 0,05$ ). Outros fatores, como a morte de células de Leydig e menor produção de enzimas do processo esteroidogênico (CYP17, Bozkaya et al., 2017), também parecem contribuir para a redução da testosterona.

Nos touros Nelore (Rizzoto et al., 2020c), também se observou, após 24h de insulação, a redução dos transcritos de BCL2 (antiapoptótico). Em murinos (Rizzoto et al., 2020b), a avaliação testicular pós-ET (40 °C/20 min) revelou o aumento dos transcritos da HSP70 (7x; 8h), GPX1 (10x; 24 h), P53 (8x; 14 d) e Casp 8 (4 x; 14 d) e redução dos transcritos de BCL2 (7 x; 14d).

#### *Modelo teórico da fisiopatogenia do ET testicular*

Cada vez mais fica evidente que sob ET, existe um processo sequencial de ativações gênicas que deprime a esteroidogênese, e tenta proteger o ambiente testicular. O aumento das EROS e formação de proteínas defeituosas são os primeiros efeitos pós-ET. Como resposta, é ativada a via NRF2, que aumenta os transcritos dos antioxidantes GPX1 e SOD. Como as proteínas não- e mal dobradas não podem cumprir suas funções é ativada a transcrição das chaperonas (HSPs) para regular o meio intracelular. Contudo, mantendo-se o ET, estas respostas não são suficientes e células com alterações críticas do DNA e do meio interno são formadas ou mantidas, o que desencadeia a próxima etapa do processo, que é a transcrição do gene P53. A proteína P53, a guardiã do genoma, na incapacidade de reparar o DNA das células afetadas, ativa as vias apoptóticas intrínseca e extrínseca. Na intrínseca, a P53 aumenta a transcrição do gene BAX (BCL-2 associated x-protein), alterando a proporção BAX/BCL-2, liberando o citocromo C (CytC) pelas mitocôndrias. O CytC livre forma um complexo com o fator de ativação de protease apoptótica 1 (APAF1), ativando caspases apicais 2 e 9 (Casp 2 e 9), que subsequentemente, ativam a Casp 3 (efetora). No mecanismo extrínseco, a P53, estimula a transcrição gênica e formação do receptor de membrana celular FAS, que ao se unir ao seu ligante (FasL), produzidos pelos linfócitos T citotóxicos e células de Sertoli, ativa as Casp 8 e 10, que, subsequentemente, ativam as Casp efetoras 3, 6 e 7, induzindo a apoptose (Wang et al., 2018). Entretanto, apesar da apoptose reduzir a produção espermática sob ET, algumas células defeituosas escapam deste controle e espermatozoides defeituosos são formados (Sakkas and Alvarez, 2010).

#### *Novas abordagens para a mitigação dos efeitos do estresse térmico*

De forma geral, o ET impacta a função reprodutiva masculina afetando as células testiculares,

diminuindo a qualidade e a habilidade dos espermatozoides em fertilizar o oócito e manter o desenvolvimento embrionário (Lammas-Luceño, 2020). Vários compostos já foram utilizados para tratar animais ou adicionados aos ejaculados buscando protegê-los dos impactos do ET. Vários antioxidantes vêm sendo utilizados com estas finalidades, com destaque a melatonina, um neuro-hormônio produzido e secretado pela glândula pineal, mas também presente em outros tecidos.

A melatonina é um potente antioxidante que age principalmente através da inativação de radicais hidroxila (Reiter, 1998) e eliminação de várias espécies reativas de  $O_2$  e nitrogênio (ERO e ERN), incluindo,  $O_2$ , óxido nítrico (NO), o ânion ONOO e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Tan et al., 2002). A adição de melatonina ao diluente seminal gerou melhora na motilidade total e progressiva, viabilidade, integridade de DNA e de membrana espermática, além de reduzir a peroxidação lipídica das membranas espermáticas e modular a capacitação espermática (Zhao et al., 2021).

Em um estudo recente (Shahat et al., 2022), carneiros foram submetidos à insulação da região do cone vascular testicular por 3,5 d ou expostos ao aumento da temperatura ambiente ( $28^\circ C$  8 h/d por 4 dias consecutivos). Os ejaculados, colhidos antes e a cada 7 d por 5 semanas após o ET, foram imediatamente diluídos com diluentes seminais sem (CON), ou contendo 0.5 ou 1 mM de melatonina. A adição de melatonina aumentou a motilidade total (~5-10 %), reduziu o total de EROS e índice de fragmentação de DNA espermático, e o tratamento 1 mM reduziu as anormalidades morfológicas espermática e de integridade de acrossoma (~7 e 12 %, respectivamente).

Em um segundo estudo (Shahat et al., não publicado), investigou-se os efeitos da melatonina no fluxo sanguíneo testicular e qualidade espermática pós-ET ameno em carneiros. Os animais receberam uma aplicação subcutânea (orelha) de 36 mg de melatonina em 1 mL de óleo de milho (grupo MEL) ou 1 mL de óleo de milho (CO). Quinze dias após o tratamento, foi realizada a insulação do cone vascular testicular (96 h) em todos os animais. A seguir, os índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) do fluxo da artéria testicular foram avaliados por ultrassonografia Doppler e o sêmen colhido por eletroejaculação a cada 7 d por 7 semanas. Uma semana pós-ET observou-se a redução da motilidade progressiva e morfologia normal no ejaculado (CO). Porém, para o grupo MEL estas alterações foram mitigadas ( $P < 0,05$ ) a partir da segunda semana. Ainda, o grupo MEL apresentou menores IP e IR ( $P < 0,05$ ) que os do CO pós-ET. A motilidade espermática e morfologia normal (%) retornaram aos valores pré-ET no grupo MEL na quinta e sexta semana, respectivamente, enquanto o grupo CO não retornou aos valores pré-ET. Esses achados sugerem que a melatonina melhora o fluxo sanguíneo testicular, e a motilidade e morfologia espermáticas de carneiros expostos ao ET.

### Conclusão

Os recentes achados sobre as consequências do ET sobre a função testicular apontam para a existência de complexos mecanismos patofisiológicos, que são desencadeados pelo aumento da temperatura local. Estes mecanismos tentam proteger o tecido testicular, mas também promovem grandes impactos negativos na eficiência da espermatogênese e qualidade dos ejaculados. O entendimento destes mecanismos é fundamental para a compreensão dos processos de proteção e, conseqüentemente, para o estabelecimento de novas estratégias de proteção e recuperação da função reprodutiva masculina nos caos de ET testicular.

### Referências

- Alves MBR, Andrade AFC, Arruda RP, Batissaco L, Florez-Rodriguez SA, Oliveira BMM, Celeghini, ECC. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. *Theriogenology*, v.86, p.795–805, 2016.
- Barros-Adwell CMQ, Brito LFC, Oba E, Wilde RE, Rizzoto G, Thundathil JC, Kastelic JP. Arterial blood flow is the main source of testicular heat in bulls and higher ambient temperatures significantly increase testicular blood flow. *Theriogenology*, v.116, p.12–6, 2018.
- Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Kastelic JP. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos Taurus* bulls: Relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology*, v.61, p.511–28, 2004.
- Bozkaya F, Atli MO, Guzeloglu A, Kayis SA, Yildirim ME, Kurar E, Yilmaz R, Aydilek N. Effects of long-term heat stress and dietary restriction on the expression of genes of steroidogenic pathway and small heat-shock proteins in rat testicular tissue. *Andrologia*, v.49, p.12668, 2017.
- Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, v.125,

p.443–451, 2006.

**Carvalho FA, Lammoglia MA, Simoes MJ, Randel RD.** Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. *Journal of Animal Science*, v.73, p.3570-3, 1995.

**Cataldo L, Mastrangelo MA, Kleene KC.** Differential effects of heat shock on translation of normal mRNAs in primary spermatocytes, elongated spermatids, and Sertoli cells in seminiferous tubule culture. *Experimental Cellular Research*, v.231, p.206-13, 1997.

**Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C.** Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online*, v.30, p.14-27, 2015.

**Garcia-Oliveros LN, Arruda RP, Batissaco L, Gonzaga VHG, Nogueira VJM, Florez-Rodriguez SA, Almeida FS, Alves MBR, Pinto SCC, Nichi M, Losano JDA, Kawai GKV, Celeghini ECC.** Heat stress effects on bovine sperm cells: a chronological approach to early findings. *International Journal of Biometeorology*, v.64(8), p.1367-78, 2020.

**Gu ZT, Li L, Wu F, Zhao P, Yang H, Liu YS, Geng Y, Zhao M, Su L.** Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent P53, Ca(2+) dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Scientific Reports*, v.5, p.11497, 2015.

**Groen AF, Steine T, Colleau JJ, Pedersen J, Pribyl J, Reinsch N.** Economic values in dairy cattle breeding, with special reference to functional traits. Report of an EAAP-working group. *Livestock Production Science*, v.49, p.1–21, 1997.

**Kastelic J, Wilde R, Rizzoto G, Thundathil J.** Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. *Veterinarni Medicina (Praha)*, v.62, p.437–42, 2017.

**Kastelic JP, Wilde RE, Bielli A, Genovese P, Rizzoto G, Thundathil J.** Hyperthermia is more important than hypoxia as a cause of disrupted spermatogenesis and abnormal sperm. *Theriogenology*, v.131, p.177–81, 2019.

**Lammas-Luceño NL, Hosten M, Mullart E, Broekhuijse M, Lonergan P, Van Soom A.** High temperature-humidity index compromises sperm quality and fertility Holstein bulls temperate climates. *Journal of Dairy Sci*, v.103, p.9502-14, 2020.

**Lewis JB, Messer RL, McCloud VV, Lockwood, PE, Hsu SD, Wataha JC.** Ni(II) activates the Nrf2 signaling pathway in human monocytic cells. *Biomaterials*, v.27, p.5348–5356, 2006.

**Nichi M, Bolsa PEJ, Zuge RM, Barnabe VH, Goovaerts GF, Barnabe RC, Cortada CNM.** Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, v.66, p.822-8, 2006.

**Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ, Koppisepi S.** Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Advances in Medical Science*, v.52, p.11-28, 2007.

**Read A and Schröder M.** The unfolded protein response: An overview. *Biology (Basel)*. v.10, p.1-10, 2010.

**Rizzoto G, Hall C, Tyberg JV, Thundathil JC, Caulkett NA, Kastelic JP.** Increased testicular blood flow maintains oxygen delivery and avoids testicular hypoxia in response to reduced oxygen content in inspired air. *Scientific Reports*, v.8, p.10905, 2018.

**Rizzoto G and Kastelic JP.** A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants? *Theriogenology*, v.147, p.166-75, 2019.

**Rizzoto G, Hall C, Tyberg JV, Thundathil JC, Caulkett NA, Kastelic JP.** Testicular hyperthermia increases blood flow that maintains aerobic metabolism in rams. *Reproduction Fertility and Development*, v.31, p.683-8, 2019.

**Rizzoto G, Ferreira JCP, Codognoto VM, Oliveira KC, Mogollón Garcia HD, Pupulim AGR, Teixeira-Neto FJ, Castilho A, Nunes SG, Thundathil JC, Kastelic JP.** Short-term testicular warming under anesthesia causes similar increases in testicular blood flow in *Bos taurus* versus *Bos indicus* bulls, but no apparent hypoxia. *Theriogenology*, v.145, p.94–9, 2020a.

**Rizzoto G, Boe-Hansen G, Klein C, Thundathil JC, Kastelic JP.** Acute mild heat stress strategically alters gene expression in testes and reduces sperm quality in mouse. *Theriogenology*, v.158, p.375-81, 2020b.

**Rizzoto G, Ferreira JCP, Codognoto VM, Oliveira KC, Mogollón Garcia HD, Pupulim AGR, Teixeira-Neto FJ, Castilho A, Nunes SG, Thundathil JC, Kastelic JP.** Testicular hyperthermia reduces testosterone concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls. *Theriogenology*, v.152, p.64-8, 2020c.

**Rocha DR, Martins JAM, Tilburg MF, Oliveira RV, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Moreira**

- RA, Araújo A, Moura AA.** Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. *Theriogenology*, v.84(8), p.1291-1305, 2015.
- Rossi ES, Rizzoto G, Pupilim AGR, Almeida MB, Carvalho JC, Rattes PZ, Uzae KZ, Campos ALS, Teixeira MB, Denadai R, Kastelic JP, Ferreira JCP.** A influência do estresse térmico na resistência do sêmen ovino (*Ovis Aries*) refrigerado a 4°C. Jornada de Pós-graduação JOIA, Unesp - 2021. (abstract)
- Sakkas D and Alvarez JG.** Sperm DNA fragmentation: Mechanisms of origin, impact on reproductive outcome and analysis. *Fertility and Sterility*, v.93, p.1027-36, 2010.
- Senger PL.** Pathways to pregnancy and parturition, 3rd ed., Current Conceptions, INC, Pullman, 2015.
- Shahat AM, Thundathil JTC, Kastelic JP.** Melatonin or L-arginine in semen extender mitigate reductions in quality of frozen-thawed sperm from heat-stressed rams. *Animal Reproduction Science*, v.238, p.106934, 2022.
- Skinner JD and Louw GN.** Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Journal of Applied Physiology*, v.21, p.1784-90, 1966.
- Tan D, Reiter RJ, Manchester LC, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra MC, Hardelan R.** Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.2(2), p.181-197, 2002.
- Vogler CJ, Bame JH, DeJarnette JM, McGilliard ML, Saacke RG.** Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology*, v.40, p.1207-19, 1993.
- Waites GMH and Setchell BP.** Effect of local heating on blood flow and metabolism in the testis of the conscious ram. *Reproduction*, v.8, p.339-49, 1964.
- Zhao J, Zhang Y, Hao L, Wang J, Zhang J, Liu S, Ren B.** Effects of a mild heat treatment on mouse testicular gene expression and sperm quality. *Animal Cells and Systems*, v.14, p.267-74, 2010.
- Wang M & Su P.** The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v.64(2), p.93-102, 2018.
-