



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA DO CEARÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**  
**DOUTORADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MAURÍCIO FRANCISCO VIEIRA NETO**

**ESTUDO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM BODES COM USO DA  
INSULAÇÃO INTERMITENTE ASSOCIADA À TERMOGRAFIA  
INFRAVERMELHA E ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO SÊMEN**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2020**

MAURÍCIO FRANCISCO VIEIRA NETO

ESTUDO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM BODES COM USO DA INSULAÇÃO  
INTERMITENTE ASSOCIADA À TERMOGRAFIA INFRAVERMELHA E ANÁLISE  
COMPUTADORIZADA DO SÊMEN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves

Orientador: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo

FORTALEZA- CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Estadual do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Vieira Neto, Mauricio Francisco.

Estudo da degeneração testicular em bodes com uso da insulação intermitente associada à termografia infravermelha e análise computadorizada do sêmen [recurso eletrônico] / Mauricio Francisco Vieira Neto. - 2020.  
91 f. : il.

Tese (DOUTORADO ACADÊMICO) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Ciências Veterinárias - Doutorado, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Ailton Alencar de Araujo.

Coorientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Gorete Flores Salles.

1. Caprinos. 2. Qualidade seminal. 3. Exame andrológico. 4. Diagnóstico por imagem. I.

## MAURÍCIO FRANCISCO VIEIRA NETO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 14 de dezembro de 2020.

### BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Ferreira Nunes  
Universidade Estadual do Ceará

(Examinador)



Profa. Dra. Jamile Andréa Rodrigues da  
Silva

Universidade Federal Rural da Amazônia  
(UFRA)

(Examinador)



Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas  
Universidade Estadual do Ceará

(Examinador)



Prof. Dr. Maurício Fraga Van Tilburg  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido

(Examinador)



Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo  
Universidade Estadual do Ceará

(Orientador)

Aos pais que guiaram o menino que sonhou ser Veterinário, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, onde tive a oportunidade de me capacitar.

A Deus, soberano mestre, fonte de toda a sabedoria e ciência, que me conduziu até mesmo quando eu achava não querer seguir em frente: meu principal agradecimento!

Aos meus pais, João Alves Vieira e Maria Celma de Lima Vieira, que não mediram esforços em me educar, mesmo com todas as limitações financeiras, sociais, emocionais e as intempéries advindas da distância entre pais e filho único.

Ao meu orientador, Airton Alencar de Araújo, pelos ensinamentos sociais, técnicos e científicos e pelos momentos de descontração que vivenciamos.

À FAVET UECE, onde me formei e trabalhei durante quatro anos, e pude aprender lições valiosas sobre a vida pessoal e profissional.

Ao apoio financeiro PRONEX (FUNCAP), que viabilizou a aquisição de insumos para a pesquisa realizada.

Aos membros da banca examinadora, pelas diversas sugestões enriquecedoras a este trabalho.

Ao ser humano especial que muito tem me ajudado desde o início do mestrado, sendo uma inspiração humana e profissional: Dra. Maria Gorete Flores Salles.

À minha amiga inseparável Camila Goersch Barroso, com quem sempre pude dividir perdas e vitórias, e que sempre esteve ao meu lado.

Aos meus amigos queridos, de longas datas: Maria Joélia Carlota Amorim, Francisca Vieira Alves, Christiany Melo Cambraia, Aline Maia Silva, Adalia Freitas de Oliveira Lopes, Sebastian Holanda Lobão, Fágner Cavalcante Patrocínio do Santos, Lina Raquel Santos Araújo, Franciane Gomes de Lima, Nagyla Maria Lima de Oliveira, Francisco José Moreira Lima, Isac Gabriel Abrahão Bonfim, Carlos Eduardo Azevedo Souza, Keilla Moreira Maia, Danielle Kely Saraiva de Lima, Celso Lourenço de Arruda Neto, Fabiana Aparecida Santilli Brandão, Monalisa Sousa Dias Lima, Samara Silva de Souza, Marcimar Silva Sousa, Bruna Farias Brito e Monalyza Cadori Gongalves.

Aos amigos recentes, mas que logo se tornaram especiais durante meu atual trabalho na UFC: Augusto César Oliveira, Maria Luzete Costa, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves, Marcus Vinicius Saraiva Martins Filho e Pedro Watanabe.

Aos professores Dr Vicente José de Figueiredo Freitas (LFCR), Dr José Ferreira Nunes (NIB) e Dr. Isaac Goes Neto (VETTINGS) por disponibilizarem seus laboratórios, equipamentos e pessoal necessários à conclusão deste trabalho.

Aos animais, por todo o trabalho prestado, a alimentação conferida e o bem-estar proporcionado à humanidade: o mais nobre obrigado!

## RESUMO

A reprodução animal depende das condições nutricionais e status sanitário de matrizes e reprodutores e, para os pequenos ruminantes domésticos machos, a degeneração testicular (DT) é uma das principais responsáveis pela subfertilidade. Uma importante causa de DT é a ocorrência de estresse térmico, decorrente das altas temperaturas da região que eles vivem, assim, o presente trabalho foi realizado objetivando testar um protocolo de estresse térmico induzido por insulação testicular intermitente, que mimetizasse os efeitos do estresse térmico natural, monitorando variáveis seminais, testiculares e hormonal, correlacionando-as às imagens termais escrotais produzidas no decorrer do experimento, bem como acompanhar o processo de retorno à condição de normalidade. Para tanto, após um período de adaptação, 10 machos caprinos de 18 meses de idade foram submetidos a um protocolo intermitente de insulação testicular por quatro noites consecutivas e avaliou-se os parâmetros seminais, circunferência escrotal, e imagens termais da superfície escrotal, comparando os momentos antes, durante e após o estresse térmico induzido. Os dados obtidos foram tabulados e expressos na forma de média e erro padrão, e aqueles que não apresentaram normalidade no teste de Shapiro-Wilk foram transformados por arcoseno ou  $(\log(x+1))$  e submetidos à ANOVA a 5% de probabilidade, e comparados pelo teste de Tukey. Após a insulação testicular, não ocorreu alteração significativa nos valores de circunferência escrotal ou temperatura retal, todavia, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) na testosteronemia e parâmetros seminais avaliados. Assim, a insulação testicular intermitente se mostrou eficaz em causar um quadro de degeneração testicular em curto período de tempo, com reversão mais precoce que o observado em protocolos contínuos, e os termogramas obtidos permitiram estabelecer padrões de imagens dentro e fora da normalidade térmica da superfície escrotal, sendo uma técnica auxiliar ao exame clínico andrológico para diagnóstico de degenerações variadas que comprometem a qualidade seminal em caprinos.

**Palavras-chave:** Caprinos. Qualidade seminal. Exame andrológico. Diagnóstico por imagem.

## ABSTRACT

Animal reproduction depends on the nutritional conditions and health status of breeders and breeders and, for small male domestic ruminants, testicular degeneration (TD) is one of the main factors responsible for subfertility. An important cause of TD is the occurrence of thermal stress, due to the high temperatures in the region where these animals live. Thus, the present work was carried out aiming to test a thermal stress protocol induced by intermittent testicular insulation that mimics the effects of natural thermal stress, monitoring seminal, testicular and hormonal variables correlating them to the scrotal thermal images produced during the experiment. Then, the process of returning to normal condition was monitored. For this purpose, after an adaptation period, 10 male goats of 18 months of age were submitted to an intermittent testicular insulation protocol for four consecutive nights and the seminal parameters, scrotal circumference, and thermal images of the scrotal surface were evaluated, comparing the moments before, during and after the induced thermal stress. The data obtained were tabulated and expressed as mean and standard error. Those that did not show normality in the Shapiro-Wilk test were transformed by arcsene or  $[\log (x + 1)]$  and submitted to ANOVA at 5% probability and compared by the Tukey test. After testicular insulation, there was no significant change in relation to the scrotal circumference or rectal temperature values. However, there was a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in testosterone and evaluated seminal parameters. Thus, intermittent testicular insulation proved to be effective in causing testicular degeneration in a short period of time, with earlier reversal than that observed in continuous protocols. In addition, the obtained thermograms made it possible to establish imaging patterns inside and outside of the thermal normality of the scrotal surface, being an auxiliary technique for the andrological clinical examination to diagnose various degenerations that compromise the seminal quality in goats.

**Key-words:** Goats. Seminal quality. Andrological examination. Diagnostic imaging.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Mensuração da CE através de fita métrica graduada em milímetro	19
Figura 2	A) Cenário e equipe de colheita de sêmen por eletroejaculação; B) Cone de silicone acoplado a tubo Falcon graduado.....	20
Figura 3	Esfregação seminal em lâmina corada com azul de bromofenol.....	21
Figura 4	Modelo de bolsa escrotal; B) Animal em processo de insulação testicular .....	23
Figura 5	Obtenção de imagem termal através de câmera termográfica.....	25
Figura 6	Termograma testicular de bode marcando as regiões proximal, medial e distal.....	25

### CAPÍTULO 2

Figura 1	Diagrama de representação esquemática do delineamento experimental .....	49
Figura 2	Termograma testicular obtido durante a colheita de sêmen, mostrando os pontos proximal (1), medial (2) e distal (3) da região posterior de ambos os testículos .....	49
Figura 3	Imagens termográficas da região posterior dos testículos em visão frontal, obtidas durante os diversos momentos do procedimento experimental.....	51
Figura 4	Gráficos ilustrando evolução da Temperatura Testicular Média e Temperatura Retal no decorrer dos dias do experimento.....	53
Figura 5	Variáveis seminais acompanhadas no decorrer dos 60 dias de experimentação .....	54

### CAPÍTULO 3

Figura 1	Gráficos com o comportamento dos dados analisados durante o experimento.....	81
----------	--	----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1</b>	<b>Temperaturas obtidas por termografia nos diferentes pontos dos testículos estudados .....</b>	<b>52</b>
-----------------	--	-----------

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1</b>	<b>Temperatura Superficial do Escroto e Alterações espermáticas, em diferentes momentos, de bodes com testículos insulados.....</b>	<b>82</b>
<b>Tabela 2</b>	<b>Correlações entre a testosteronemia, volume e temperatura escrotal e características espermáticas de bodes submetidos a insulação testicular intermitente em clima tropical.....</b>	<b>82</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>CE</b>	<b>Circunferência Escrotal</b>
<b>cm</b>	<b>Centímetro</b>
<b>DiT</b>	<b>Diâmetro Testicular</b>
<b>DT</b>	<b>Degeneração Testicular</b>
<b>IBGE</b>	<b>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</b>
<b>Kg</b>	<b>Quilograma</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>SPRD</b>	<b>Sem Padrão de Raça Definido</b>
<b>TIF</b>	<b>Termografia Infravermelha</b>
<b>VT</b>	<b>Volume Testicular</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1	DINÂMICA DA PRODUÇÃO SEMINAL EM PEQUENOS RUMINANTES DOMÉSTICOS .....	14
2.2	OCORRÊNCIA DE DEGENERAÇÃO TESTICULAR E SUAS CONSEQUÊNCIAS.....	16
2.3	TESTOSTERONEMIA E COMPORTAMENTO SEXUAL MASCULINO .....	17
2.4	MONITORAMENTO CONVENCIONAL DA QUALIDADE SEMINAL	18
2.5	A INSULAÇÃO ESCROTAL E A MIMETIZAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR.....	22
2.6	IMAGIOLOGIA COMO MONITORAMENTO NÃO INVASIVO DA QUALIDADE REPRODUTIVA DE MACHOS RUMINANTES.....	23
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 1 - CONSEQUÊNCIAS DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR POR ESTRESSE TÉRMICO SOBRE A QUALIDADE DO EJACULADO DE PEQUENOS RUMINANTES DOMÉSTICOS .....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO 2 - TERMOGRAFIA TESTICULAR E QUALIDADE SEMINAL EM BODES SUBMETIDOS À INSULAÇÃO TESTICULAR INTERMITENTE EM CLIMA TROPICAL .....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>CAPÍTULO 3 - ESTUDO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR INSULAÇÃO ESCROTAL INTERMITENTE E CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS TESTICULARES, SEMINAIS E HORMONAL DE BODES, EM CLIMA TROPICAL SEMIÚMIDO.....</b>	<b>59</b>
	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O efetivo nacional de caprinos é da ordem de 11.301.481 animais (SIDRA-IBGE, 2019), sendo que destes, aproximadamente 10.687.777 (94,56%) está difundido na região nordeste brasileira. Esta espécie é conhecida pela sua facilidade de adaptação a diferentes condições hostis, onde seria impossível se perpetuar espécies mais exigentes no tocante à ambiência e condições nutricionais.

No entanto, mesmo sendo uma espécie bastante adaptada, cabras e bodes podem ter sua reprodução comprometida devido à insalubridade de diferentes estresses, como o estresse térmico (SOUZA; SALLES; ARAUJO, 2012; VIEIRA-NETO *et al.*, 2017), o alimentar, as doenças infecciosas, intoxicações, e à idade avançada (VIEIRA-NETO, 2017).

Nos pequenos ruminantes domésticos machos, a principal causa de redução da qualidade reprodutiva é a degeneração testicular (DT) (VIEIRA-NETO *et al.*, 2019), um processo multifatorial que culmina em redução da qualidade seminal em caprinos (BRAZ *et al.*, 2019), onde ocorrem alterações na estrutura macro e microscópica testicular (CAVALCANTE *et al.*, 2014b) e redução dos níveis séricos de testosterona, o que pode ocasionar alteração do comportamento reprodutivo fisiológico do reprodutor (ALVES *et al.*, 2016, CAMARA *et al.*, 2016; HAFEZ; HAFEZ, 2004; SOUZA *et al.*, 2010).

Uma das principais causas de DT é o estresse térmico (MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001; VIEIRA-NETO *et al.*, 2019), por isso, na tentativa de melhor conhecer as alterações testiculares e seminais, sua duração e reversibilidade, diversos protocolos tem sido empregados para simular experimentalmente as condições de estresse térmico em ambiente de pesquisa (ARMENGOL *et al.*, 2015; ALVES, 2016; ROCHA *et al.*, 2015). Tais situações experimentais mimetizam o que ocorre em animais de climas temperados quando submetidos ao clima tropical ou mesmo em animais nativos, ao serem mantidos em instalações sem condições adequadas de ambiência.

O monitoramento e estudo da DT tem sido realizado a partir de exames clínico-andrológicos (VIEIRA-NETO *et al.*, 2017; CBRA, 2013) rotineiros, associados a exames complementares laboratoriais (SOUZA *et al.*, 2010). Atualmente, métodos não invasivos tem auxiliado o diagnóstico e monitoramento da evolução clínica desta patologia, sendo a ultrassonografia e a Termografia de Infravermelho (TIV) duas técnicas formadoras de imagens e promissoras no processo de conhecimento da fisiopatologia da DT

(CAVALCANTE *et al.*, 2014b; BRAZ *et al.*, 2019), que pode vir a ser muito importante para a espécie caprina, onde é pouco frequente a realização de exames andrológicos antes das estações de monta.

Assim, fazem-se necessários verificar se a TIV é um método útil no monitoramento da DT, e avaliar a eficácia de um modelo de estresse térmico testicular induzido de forma intermitente, que simule as condições de estresse térmico natural que pode ocorrer em animais criados em regiões de clima tropical semiúmido, bem como verificar a reversibilidade dos danos gerados por este insulto.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DINÂMICA DA PRODUÇÃO SEMINAL EM PEQUENOS RUMINANTES DOMÉSTICOS

Os testículos são um par de órgãos reprodutivos, que em ruminantes saudáveis estão localizados fora da cavidade abdominal, dentro da bolsa escrotal, situada na região inguinal. Fisiologicamente, estas estruturas são classificadas como mistas, por apresentarem atividade endócrina na produção de testosterona, e exócrina, na função reprodutiva, onde são produzidos gametas masculinos e secreções testiculares que compõem o plasma seminal (HAFFEZ; HAFFEZ, 2004).

A localização anatômica da bolsa escrotal facilita a aeração dos órgãos e manutenção da termorregulação testicular, por dissipar o calor e facilitar a redução da temperatura das estruturas escrotais. Em acréscimo, a funcionalidade do músculo cremáster auxilia na manutenção de uma temperatura adequada, uma vez que seu relaxamento ou contração podem, respectivamente, afastar ou aproximar a bolsa escrotal da parede abdominal (HAFFEZ; HAFFEZ, 2004; RODRIGUES, 2016). Este equilíbrio térmico se faz necessário, pois para que ocorra a espermatogênese de forma eficaz, os testículos devem permanecer entre 2 e 6°C abaixo da temperatura corporal do reprodutor (GABALDI; WOLF, 2002).

A espécie caprina apresenta uma peculiaridade que favorece a termorregulação escrotal de alguns de seus exemplares machos, pois alguns animais apresentam um processo de bipartição testicular (BRAZ *et al.*, 2019), o que favorece a perda de calor por diversos mecanismos, pois o aumento da superfície de contato favorece a aeração na extremidade do testículo (RODRIGUES, 2016), além de elevar significativamente o número de glândulas sudoríparas, aumentando a área de evaporação (NUNES *et al.*, 1983). Em tais animais, além de serem evidenciadas menores alterações na qualidade seminal no decorrer do ano, ainda costumam-se obter ejaculados com melhores índices de cinética espermática (VIEIRA *et al.*, 2008).

A partir da puberdade do macho, os testículos produzem elevados níveis de testosterona, células espermáticas e uma fração do plasma seminal. A síntese de testosterona pelas células intersticiais de Leydig está ligada a estímulos hipofisários e locais. Este hormônio, por sua vez, é relacionado ao comportamento sexual masculino (libido) e à produção espermática nos túbulos seminíferos (HAFEZ; HAFEZ, 2004; SOUZA *et al.*, 2010). Estudos recentes mostram que a administração de análogos deste hormônio ao macho caprino

pode influenciar em seu comportamento sexual, independente de interferir ou não na qualidade seminal (CAMARA *et al.*, 2016).

Vinculada à testosterona, a espermatogênese está relacionada ao peso da glândula, onde diariamente são produzidos 19 milhões de espermatozoides para cada grama de parênquima testicular (JONES; DACHEUX, 2007). Caso incida algum processo patológico, como os decorrentes do estresse térmico, inicialmente podem ocorrer algumas patologias espermáticas (defeitos de ordem maior), reduzindo a qualidade seminal (MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001). Nestes casos, o órgão pode se recuperar ou ser acometido de fibrose e calcificação, o que pode reduzir a área de parênquima funcional da glândula e a produção de gametas (CAVALCANTE *et al.*, 2014b; GABALDI; WOLF, 2002; JONES; DACHEUX, 2007).

Uma vez produzidos, os espermatozoides seguem o trânsito epididimário por um período de 13 a 16 dias, onde ocorrem alterações celulares que caracterizam a maturação espermática, como reorganização de organelas e cromatina nuclear, migração e perda da gota citoplasmática, mudanças acrossomais e aquisição de potencial para a motilidade (HAFEZ; HAFEZ, 2004; JONES; DACHEUX, 2007). Após esses processos, os espermatozoides podem ser armazenados na porção terminal do epidídimo, que atua como uma reserva que mantém a viabilidade espermática por até 15 dias (MURADÁS *et al.*, 2006).

Assim como ocorre no testículo, perante o estresse térmico, há alterações no funcionamento normal do epidídimo, resultando em encurtamento do trânsito epididimário, o que reduz o tempo de maturação espermática, culminando com grande número de espermatozoides imóveis (RAO *et al.*, 2015). Essa redução no tempo de maturação compromete diretamente a integridade e funcionalidade espermática (MARTINS *et al.*, 2010).

Genericamente, diversas funções são atribuídas ao epidídimo, como a reabsorção de fluídos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração do sêmen, o transporte dos espermatozoides, a eliminação das células espermáticas defeituosas, a maturação e o armazenamento dos gametas masculinos (MURADÁS *et al.*, 2006). A eliminação de espermatozoides defeituosos é uma importante função deste órgão, que também é citada por Moreira, Moura e Araújo (2001). Além disso, o epidídimo é sítio de atuação dos efeitos do estresse térmico, onde costumam surgir defeitos espermáticos de ordem menor nas células espermáticas, acarretando menor qualidade seminal e viabilidade espermática (MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001; CBRA, 2013).

O resultante das secreções liberadas e reabsorvidas no decorrer do trato reprodutivo do macho compõe o plasma seminal, um componente de fundamental



importância à capacidade fecundante do sêmen (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Esta fração do ejaculado contém íons inorgânicos, açúcares, lipídios, enzimas, prostaglandinas e uma série de proteínas de ocorrência natural (SOLEILHAVOUP *et al.*, 2014). O restante das secreções que compõem o sêmen é adicionado no decorrer do trânsito da porção pélvica da uretra, em que as glândulas sexuais acessórias secretam nutrientes e até prostaglandinas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

## 2.2 OCORRÊNCIA DE DEGENERAÇÃO TESTICULAR E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Como previamente introduzido, a principal causa de subfertilidade nos machos ruminantes domésticos é a degeneração testicular (CAVALCANTE *et al.*, 2014b), um processo multifatorial que pode ocorrer por exposição a toxinas, ocorrência de distúrbios endócrinos, infecções, estresse térmico (OYEYEMI *et al.*, 2011), desordens nutricionais, excesso de gordura escrotal, varicocele e iatrogenias medicamentosas (GARCIA, 2017).

Em machos com idade hábil à reprodução, a falta de adaptação ambiental ou termorregulação testicular são causas importantes da ocorrência da patologia (CAVALCANTE *et al.*, 2014b; MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001), o que justifica a ocorrência de baixa qualidade espermática em bodes de raças europeias, quando criados em condições semiáridas (SALLES *et al.*, 2009), uma vez que os testículos dos ruminantes domésticos precisam ser mantidos entre 2 e 6° C abaixo da temperatura corporal para uma espermatogênese adequada (KASTELIC; COOK; COULTER, 1996). Para os animais em idade avançada, esses processos de DT podem ser identificados em virtude da senilidade, independente de raça ou intempéries ambientais (VIEIRA-NETO *et al.*, 2017).

Este processo pode afetar a morfologia testicular (CAVALCANTE *et al.*, 2014b) e estar associado à redução da motilidade espermática e ocorrência de anormalidades nos gametas, estresse oxidativo, fragmentação do DNA, morte embrionária, alteração na concentração de testosterona (VIANA-NETO, 2018) e redução considerável na espermatogênese (JONES; DACHEUX, 2007).

Isto se dá porque ocorrem diversas alterações histológicas testiculares, onde pode-se evidenciar vacuolização e desprendimento de células germinativas (GARCIA, 2017), além de lesões nos túbulos seminíferos (vacúolos, núcleos picnóticos e células gigantes multinucleadas) e das células de Sertoli (DEVKOTA *et al.*, 2010), acumulando células da linhagem espermática à luz do tubo. Em casos avançados, há desprendimento de grande

percentual de células do epitélio germinativo e discreta assimetria ou redução das dimensões testiculares (MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001), acompanhada de flacidez à palpação, o que culmina em redução do volume e peso testicular (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Segundo DURAIRAJANAYAGAM AGARWAL e ONG (2015), em situações de termorregulação testicular insuficiente, o ciclo espermatogênico é comprometido por aumento na taxa de apoptose das células germinativas e na concentração de espécies reativas a oxigênio (ROS). Este excesso de espécies reativas a oxigênio interage com a membrana dos espermatozoides restantes (HAMILTON *et al.*, 2016), prejudicando sua motilidade e o potencial fecundante seminal (AGARWAL *et al.*, 2014).

Paralelo ao que ocorre no testículo mediante degeneração, em situações de estresse pelo calor, o plasma seminal apresenta alterações em sua composição proteica. Tem-se observado que após o insulto térmico o ejaculado destes animais passa a apresentar maior quantidade de albumina, uma proteína de choque térmico de 70 kDa, proteína DJ-1, o precursor da proteína C-reativa (presente em casos de inflamação), e duas isoformas de actina (ROCHA *et al.*, 2015), sendo que, em touros, a  $\alpha$ -actina está associada a lesões nos túbulos seminíferos (DEVKOTA *et al.*, 2010).

A avaliação da composição proteica do plasma seminal de bodes, isoladamente, não é suficiente para prever a qualidade do ejaculado do animal (MATINS *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2010). Mas, quando comparada aos parâmetros do espermograma, pode ser associada a inúmeros aspectos da função reprodutiva em ruminantes (BELLIN *et al.*, 1994; SPROTT *et al.*, 2000; MOURA, 2005), o que ocorre tanto em períodos de variações climáticas sazonais (LA FALCI *et al.*, 2002) quanto em situações de estresse térmico induzido por insulto testicular (ROCHA *et al.*, 2015; VIANA-NETO, 2018).

### 2.3 TESTOSTERONEMIA E COMPORTAMENTO SEXUAL MASCULINO

A reprodução está associada ao desempenho sexual de fêmeas e machos, sendo que para estes, a boa qualidade sexual e apresentação de libido são características indispensáveis, e ambas são dependentes dos níveis séricos adequados de testosterona (HAFEZ; HAFEZ, 2004; NUNES, 1982).

A partir da puberdade, este hormônio é secretado pelas células intersticiais testiculares em níveis elevados, sob estímulo hipofisário. Sua secreção apresenta um caráter pulsátil, ocorrendo diversas variações nos níveis séricos de um indivíduo no decorrer de um

dia (SOUZA *et al.*, 2010; HAFEZ;HAFEZ, 2004; CAMARA *et al.*, 2016). Há, ainda, variações em função da raça, clima da região onde ocorre a criação, tipo de alimentação e influência de outros indivíduos do rebanho sobre a produção individual (BARKAWI *et al.*, 2006).

A produção e manutenção de níveis séricos adequados deste hormônio são caracteres essenciais às atividades reprodutivas dos machos, em virtude de seu papel modulador na espermatogênese, na fisiologia epididimária, na manutenção de características sexuais secundárias masculinas e na modulação da libido, o que está diretamente ligado ao desempenho sexual do reprodutor no rebanho e número de serviços por estação de cobertura (CAMARA *et al.*, 2016; TODINI *et al.*, 2007). Deste modo, caso o animal apresente redução significativa em sua concentração de testosterona sanguínea, espera-se que ocorra pouca ou nenhuma expressão de sua libido (BEARDEN e FURQUAY, 1997).

Diversos trabalhos tem monitorado a testosteronemia de pequenos ruminantes domésticos, tanto durante o acompanhamento do crescimento do reprodutor (SOUZA *et al.*, 2010) quanto em protocolos de adição de análogos do hormônio (CAMARA *et al.*, 2016), e após processos de estresse térmico testicular induzido, verificando o quão agressivo o insulto testicular pode ser no desempenho do órgão e sua função endócrina (ALVES *et al.*, 2016).

#### 2.4 MONITORAMENTO CONVENCIONAL DA QUALIDADE SEMINAL

A qualidade reprodutiva do macho é evidenciada a partir de exames andrológicos periódicos (CBRA, 2013), que são acrescidos de fatores inerentes ao estado geral de saúde e desempenho sexual do animal (NUNES, 1982; VIEIRA-NETO *et al.*, 2017; CAMARA *et al.*, 2016). Desse modo, o exame clínico andrológico abrange a saúde geral do indivíduo, a avaliação macroscópica testicular e as características seminais propriamente ditas.

A manipulação testicular confere informações sobre a consistência e textura do órgão, assim como indicativo de fibrose e calcificação (CBRA, 2013; CAVALCANTE *et al.*, 2014b). É durante essa inspeção que se pode aferir o diâmetro testicular (DiT) e da circunferência escrotal (CE) (Figura 01), com o auxílio de um paquímetro digital e fita métrica, possibilitam a mensuração do volume testicular (VT). Segundo Jones e Dacheux (2007) o conhecimento do volume do testículo é importante para a estimativa da capacidade

de produção espermática do órgão e, em virtude desta necessidade, tem-se usado a fórmula sugerida por Lunsta e Gregory (1998), que associa que  $VT = 0,0396 \times DiT \times CE^2$ .

**Figura 1 - Mensuração da CE através de fita métrica graduada em milímetro.**



Fonte: Arquivo pessoal do autor (2018).

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (2013), a colheita de sêmen em pequenos ruminantes pode ser realizada através de vagina artificial ou eletroejaculação. Esta última é associada a uma maior diluição do ejaculado, por estimular a secreção das glândulas acessórias, aumentando o volume do plasma seminal (RODRIGUES, 1997), no entanto, em situações de degeneração testicular, alguns reprodutores não apresentam libido e bom desempenho em monta, sendo preferível escolhê-la como método de colheita seminal (Figura 02) (VIEIRA-NETO, 2017; VIANA-NETO, 2018).

**Figura 2 - A) Cenário e equipe de colheita de sêmen por eletroejaculação; B) Cone de silicone acoplado a tubo Falcon graduado.**



Fonte: Arquivo pessoal do autor (2018).

Logo após a colheita, o sêmen deve ser mantido em banho-maria, para que permaneça a 37° C (MAIA, 2010). Nesse momento inicial, as primeiras características observadas são macroscópicas (volume do ejaculado, cor e aspecto), seguidas de avaliações microscópicas de parâmetros de cinética espermática (turbilhonamento, motilidade, vigor), concentração espermática (VIEIRA-NETO *et al.*, 2017) e características morfológicas, por meio de esfregaço corado em lâmina (CBRA, 2013).

O sêmen fresco pode ser fracionado para a avaliação microscópica de motilidade massal (0-5), vigor (0-5) e percentual de espermatozoides móveis, em aumento de 400X (EVANS *et al.*, 1990; CBRA, 2013; VIEIRA-NETO *et al.*, 2017).

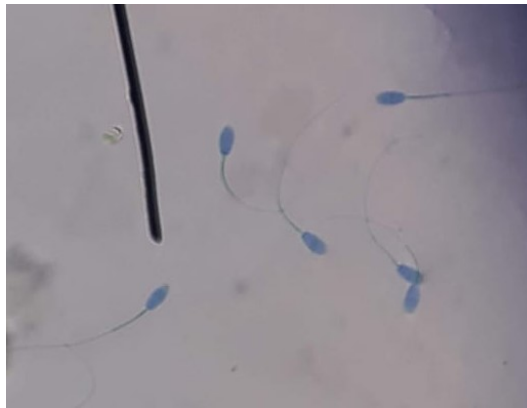
O turbilhonamento, ou motilidade massal (CBRA, 2013), pode ser avaliado ao microscópio óptico com uma gota de sêmen puro sobre uma lâmina de vidro (pré-aquecida a 37 °C) e analisado em ampliação de 100 vezes (MAIA, 2015). Para demais parâmetros de cinética espermática, programas computadorizados são recomendados, visando uma maior fidedignidade nos resultados (SANTOS *et al.*, 2012; CAVALCANTE *et al.*, 2014a).

De acordo com o CBRA (2013), a concentração espermática representa o número de espermatozoides por milímetro (mm) ou centímetro (cm) cúbico ( $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$ ). Segundo Viana-Neto (2018), este dado pode ser obtido através de uma alíquota de sêmen diluída (1:200) em formol salino tamponado em espectrofotômetro, através da transmitância sob comprimento de onda de 490 nm. Uma maneira alternativa de realizar este cálculo é através

da câmara de Neubauer (VIEIRA-NETO *et al.*, 2017), ou métodos computadorizados. A diluição para a mensuração da concentração espermática pode ser variável de 1:100 a 1:400 e o número total de espermatozoides do ejaculado é calculado pelo produto do volume pela concentração espermática (CBRA, 2013).

A avaliação das características morfológicas dos espermatozoides é feita a partir de esfregaços corados ao microscópio óptico ou preparação úmida, em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial, associados ou não (CBRA, 2013). Para Maia (2015), a avaliação da morfologia espermática deve ser realizada com lâminas de esfregaço coradas em eosina-nigrosina. Contudo, uma alternativa interessante é utilizar o azul de bromofenol (Figura 03), que se assemelha à eosina-nigrosina na avaliação do percentual de células e vivas e mortas e de patologias espermáticas, sendo que se mostra mais eficiente à temperatura ambiente, além de fornecer lâminas de melhor qualidade para a visualização de alterações de cabeça espermática e integridade de membrana (MEDEIROS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009), sendo importante que se avalie 200 células espermáticas por lâmina realizada (ARMENGOL *et al.*, 2015; VIEIRA-NETO *et al.*, 2017).

**Figura 3 - Esfregaço seminal em lâmina corada com azul de bromofenol.**



Fonte: Arquivo pessoal do autor (2018).

O Manual do CBRA (2013) descreve que as patologias espermáticas podem ser enquadradas na classificação de Blom, onde os defeitos são categorizados em maiores ou menores e são, ainda, citadas a presença de células de descamação, leucócitos etc. Nesse modelo de avaliação das células espermáticas, são considerados defeitos de ordem maior algumas anomalias de cabeça e acrossomo, das peças intermediária e principal, e algumas formas espermáticas teratológicas visualizadas no momento da leitura da lâmina (VIEIRA-NETO *et al.*, 2017).

Assim, são consideradas alterações de cabeça e acrosso (subdesenvolvimento, cabeça isolada de formato anormal, contorno anormal da célula, cabeça estreita na base, piriforme, pequena anormal e as chamadas “*pouch formation*”-vacuolizações), de peça intermediária (gota citoplasmática proximal, peça rudimentar, fibrilação, edema, pseudogota etc.) e um defeito da peça principal (cauda fortemente dobrada). Toda e qualquer forma teratológica espermática é um defeito maior (CBRA, 2013).

São considerados defeitos de ordem menor as apresentações de cabeça delgada, gigante, curta larga e pequena normal (CLGP), cabeça isolada normal, defeitos de implantação, cauda dobrada (“*bent-tail*”), gota citoplasmática distal e cauda enrolada na porção terminal (CBRA, 2013; VIENIRA-NETO et al., 2017).

## 2.5 A INSULAÇÃO ESCROTAL E A MIMETIZAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR

Ao longo dos últimos anos, diversas pesquisas tem sido realizadas em machos ruminantes, com a intenção de conhecer os efeitos deletérios do estresse térmico testicular sobre a qualidade espermática (SALLES *et al.*, 2009; SALLES *et al.*, 2020), estrutura testicular, libido e testosteronemia (MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001; ALVES *et al.*, 2016).

Tem-se utilizado desde a introdução de animais em câmaras de aquecimento (ARMENGOL *et al.*, 2015) até protocolos com o estresse térmico localizado, onde uma bolsa térmica é adicionada, envolvendo o escroto, e aquecendo as estruturas internas a ele (MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001).

Esta última técnica já fora empregada com sucesso em protocolos ininterruptos, onde o insulto térmico testicular é inserido e permanece em período integral por 05 a 07 dias, nas espécies bovina (ROMANELLO *et al.*, 2018; BARCA *et al.*, 2020) bubalina (YADAV *et al.*, 2019), Ovina (ROCHA *et al.*, 2015) e caprina (BRAZ *et al.*, 2019) e, recentemente, em protocolo intermitente, onde o estresse é induzido apenas durante a noite (12 horas diárias), permitindo que no restante do dia o órgão resfrie, o que simula em ovinos uma situação equivalente ao que ocorre em animais que sofrem estresse térmico durante o período diurno (VIANA-NETO, 2018)

O princípio da técnica de insulação testicular (Figura 04) é bem simples, e consiste em adicionar a bolsa térmica (um dispositivo que pode ser confeccionado com uma manta de algodão revestida bilateralmente por um plástico impermeável) (VIANA-NETO,

2018), de modo a envolver o testículo e comprometer até exaurir os mecanismos naturais de termorregulação (ação do cremáster, aeração da superfície testicular, dissipação do calor através da vasculatura periférica e sudorese) (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001; BRAZ *et al.*, 2019).

**Figura 4 - A) Modelo de bolsa escrotal; B) Animal em processo de insulação testicular.**



Fonte: Arquivo pessoal do autor (2018).

## 2.6 IMAGIOLOGIA COMO MONITORAMENTO NÃO INVASIVO DA QUALIDADE REPRODUTIVA DE MACHOS RUMINANTES

É fundamental que os testículos estejam hígidos para que ocorra uma boa produção espermática (HAFPEZ; HAFPEZ, 2004) e, obviamente, ocorra uma menor pressão de seleção e descarte de espermatozoides durante o trânsito epididimário (JONES; DACHEUX, 2007). No entanto, não é convencional se realizar biópsias nos tecidos testiculares de reprodutores vivos, visto que além de dor e desconforto, poderiam ocasionar focos de fibrose e calcificação, como nos processos de degeneração do órgão (Cavalcante *et al.* 2014b, VIEIRA-NETO, 2017).

Assim, a avaliação estrutural de tecidos gonadais masculinos costuma ser realizada através de métodos não invasivos, como as ferramentas de diagnóstico por imagem. Para tanto, costuma-se utilizar a ultrassonografia, em seus modos B (CAVALCANTE *et al.*, 2014b) e Doppler (CUNHA *et al.*, 2019), que fornecem informações importantes acerca da qualidade das estruturas testiculares (inclusive focos sugestivos de degeneração, fibrose e



calcificação) e qualidade de fluxo sanguíneo e vascularização, respectivamente. Contudo, este método requer contato direto com o animal e adoção de práticas de contenção animal (CUNHA *et al.*, 2019).

Um método inovador que vem sendo bastante utilizado na avaliação da temperatura superficial dos animais é a chamada termografia de infravermelho (TIV), uma ferramenta que mensura em imagens termais (termogramas) a radiação térmica emitida pelos corpos com temperatura acima do zero absoluto ( $-273^{\circ}\text{C}$  ou  $0^{\circ}\text{K}$ ) (ROBERTO; SOUZA, 2014; RODRIGUES, 2016).

Nesse contexto, a TIV se constitui como uma técnica não invasiva de sensoriamento remoto, que culmina na formação de imagens térmicas, através das quais é possível se monitorar a resposta dos animais à temperatura ambiental e seus mecanismos de termorregulação, sendo indispensável quando se monitora a ocorrência de estresse térmico (KOTRBA *et al.*, 2007, RODRIGUES, 2016).

Os termogramas obtidos na TIV são representativos da distribuição da temperatura sobre a superfície avaliada, que fornece informações da distribuição dos vasos sanguíneos, uma vez que a radiação infravermelha no animal está diretamente relacionada à perfusão e metabolismo dos tecidos (RODRIGUES, 2016). Assim, a ocorrência de patologias como neoplasias, processos inflamatórios agudos e infecções, causam elevação da temperatura sistêmica e/ou local, ocasionando uma maior emissão infravermelha que aparecerão como áreas mais vermelhas ou brancas na imagem termográfica, enquanto que processos degenerativos crônicos, hipoperfusão sanguínea e atrofia tecidual se apresentarão como zonas frias, representadas em faixas em tons de verde e amarelo, na imagem termográfica (BRIOSCHI 2010, NAAS; GARCIA; CALDARA, 2014; ROBERTO; SOUZA 2014).

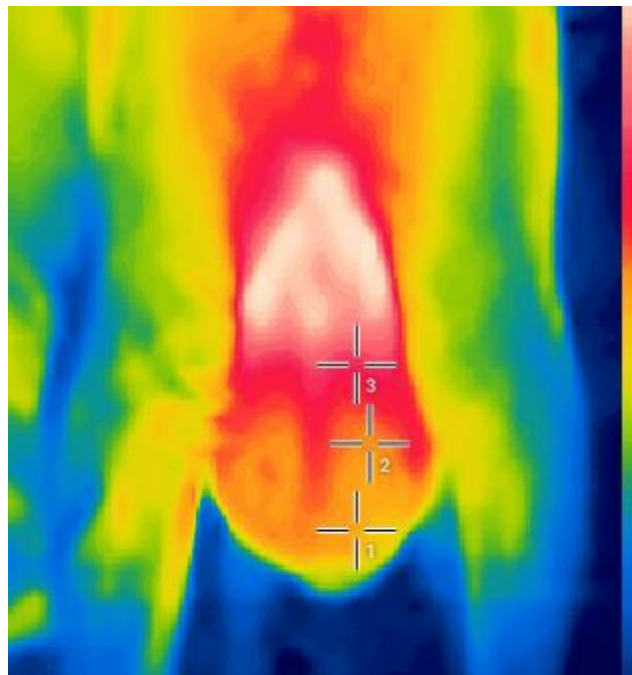
Este dispositivo tem sido utilizado com aplicação clínica na avaliação da sanidade da glândula mamária de vacas leiteiras (PORCINATO *et al.*, 2009), da manifestação de estro em cabras (FAÇANHA *et al.*, 2018), no monitoramento de conforto térmico (Figura 05) (RODRIGUES, 2016) e termorregulação testicular em carneiros (ALVES *et al.*, 2016), bodes (Figura 06) (BRAZ *et al.*, 2019) e touros (PORTUGAL, 2014; BARCA *et al.*, 2020).

**Figura 5 - Obtenção de imagem termal através de câmera termográfica**



Fonte: RODRIGUES (2016).

**Figura 6 - Termograma testicular de bode marcando as regiões proximal, medial e distal.**



Fonte: Arquivo pessoal do autor (2018).

É importante frisar que a temperatura irradiada pelo organismo do animal pode variar em função da presença ou não de pelo e lã (RODRIGUES, 2016), porém não é recomendável que a cobertura pilosa seja removida momentos antes da aferição, sendo preferível que não ocorra, ou seja realizada com antecedência (ALVES, 2014).

### 3 JUSTIFICATIVA

A literatura mostra que em condições de estresse térmico testicular os pequenos ruminantes domésticos machos apresentam redução da qualidade seminal e alterações comportamentais compatíveis com quadros em que há redução dos níveis séricos de testosterona.

Contudo, os modelos comumente empregados para se simular o estresse térmico testicular acabam sendo agressivos e levam a danos muito intensos, às vezes até culminando em degeneração testicular grave por muito tempo. Em acréscimo, ainda não há um método de avaliação visual da higidez testicular de forma não invasiva, sendo utilizados apenas procedimentos ultrassonográficos (que requerem contato e contenção animal mais precisa) ou requerida a biópsia tecidual, que, por ser um procedimento invasivo, pode resultar em lesões locais e até mesmo fibrose.

Neste contexto, há necessidade de se verificar um protocolo de insulação testicular intermitente que cause lesões compatíveis com estresse térmico natural, porém menos agressivo que os tradicionais, para que seja compatível com as intempéries climáticas às quais os animais são submetidos quando criados em clima tropical semiúmido e, aliado a isso, monitorar a evolução da termorregulação testicular e suas correlações com a qualidade seminal e os níveis séricos de testosterona, que são variáveis fundamentais para o bom desempenho do reprodutor durante a estação de monta.

#### **4 HIPÓTESES**

A) A insulação testicular intermitente causa danos testiculares, seminais e hormonais reversíveis mais discretos que os descritos nos protocolos ininterruptos, simulando uma condição próxima à degeneração testicular por altas temperaturas ambientes;

B) O termograma testicular pode ser utilizado como uma ferramenta de monitoramento do processo de degeneração testicular induzida por estresse térmico, tendo como referência imagens padrões de testículos hígidos, comparadas com imagens de vários graus de degeneração obtidas pela TIV.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 GERAL

Avaliar um protocolo de insulação testicular intermitente em machos caprinos, capaz de mimetizar efeitos do estresse térmico natural em animais criados em condições de clima tropical semiúmido.

### 5.2 ESPECÍFICOS

- A) Monitorar as variáveis seminais antes e após o procedimento de insulação testicular intermitente, verificando possíveis alterações no quadro espermático e acompanhando o retorno à condição de normalidade;
- B) Avaliar a evolução da cinética espermática através de programa computadorizado (CASA) durante todas as etapas do estudo;
- C) Verificar se as alterações evidenciadas apresentam caráter reversível, monitorando o tempo necessário até que o retorno à condição inicial seja constatado;
- D) Monitorar vários graus de degeneração testicular nos animais, associando o uso da termografia e avaliação da qualidade seminal por análise computadorizada, em momentos antes, durante e após o processo de insulação;
- E) Verificar se as imagens obtidas nos termogramas são sugestivas do processo (em vários graus) de degeneração testicular, de modo que a técnica possa ser empregada em situações práticas de rotina clínico-andrológica;
- F) Avaliar a evolução dos níveis séricos de testosterona nos momentos antes, durante e após a insulação intermitente, correlacionando-a com a evolução das variáveis de cinéticas espermática e testiculares.

## **6 CAPÍTULO 1 - ARTIGO DE REVISÃO**

### **CONSEQUÊNCIAS DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR POR ESTRESSE TÉRMICO SOBRE A QUALIDADE DO EJACULADO DE PEQUENOS RUMINANTES DOMÉSTICOS**

Publicado no Periódico: Revista Ciência Animal

V.29, n.3, p.87-97, 2019.

Qualis CAPES: B3

**CONSEQUÊNCIAS DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR POR ESTRESSE  
TÉRMICO SOBRE A QUALIDADE DO EJACULADO DE PEQUENOS  
RUMINANTES DOMÉSTICOS**

*(Consequences of testicular degeneration due to heat stress on the ejaculate quality of small domestic ruminants)*

Maurício Francisco VIEIRA-NETO<sup>1\*</sup>, Carlos Eduardo Azevedo SOUZA<sup>2</sup>, Maria Gorete Flores SALLES<sup>3</sup>, Airton Alencar de ARAÚJO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, UECE, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup>Prof. da Faculdade Cisne, Quixadá, Ceará, Brasil.

<sup>3</sup>Profª. Adjunta, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, UNILAB, Redenção, CE, Brasil.

<sup>4</sup>Prof. Associado, Universidade Estadual do Ceará, UECE, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: mauricio.macejo@hotmail.com

**Resumo**

A produção animal depende da reprodução de machos e fêmeas domésticas. Em reprodutores ruminantes, o estresse térmico é a principal causa de degeneração testicular e, nesta, ocorrem desde mudanças anatômicas na gônada masculina até alterações microscópicas, do epitélio seminífero aos espermatozoides em trânsito no trato reprodutor masculino. Essas alterações microscópicas são simultâneas a diversas mudanças na composição proteica do plasma seminal dos reprodutores, o que está ligado a defeitos espermáticos de ordem maior (de origem primariamente testicular) ou menor (que surgem durante o trânsito epididimário) e, conseqüentemente, aos parâmetros de cinética espermática e à fecundidade do ejaculado. Assim, esta revisão objetiva descrever as alterações que ocorrem quando reprodutores ruminantes domésticos são acometidos de degeneração testicular por falha na termorregulação, correlacionando-as às mudanças encontradas no plasma seminal, na morfologia espermática e, paralelamente, aos parâmetros de motilidade espermática.

**Palavras-Chave:** Subfertilidade, estresse térmico, andrologia animal.

### Abstract

Animal production depends on the reproduction of domestic males and females. In ruminant breeding, heat stress is the main reason of testicular degeneration, causing anatomical changes in the male gonad even microscopic changes, from the seminiferous epithelium until the spermatozoa in transit in the male reproductive tract. These microscopic changes occur simultaneously to several changes in the protein composition of the seminal plasma of the reproductive tract, which is related to higher sperm defects (of primarily testicular origin) or minor defects (that arise during epididymal transit) and, consequently, to the parameters of sperm kinetics and ejaculate fecundity. Thus, this review aims to describe the changes that occur when domestic ruminants are affected by testicular degeneration due to failure in thermoregulation, correlating them to the changes found in seminal plasma, sperm morphology in parallel to sperm motility parameters.

**Keywords:** Subfertility, heat stress, animal andrology.

### INTRODUÇÃO

A produção animal depende do sucesso reprodutivo de machos e fêmeas. Nestas, as biotecnias estão avançando diariamente, com enfoque cada vez mais molecular. É indispensável que também se tenha controle da qualidade espermática dos reprodutores, uma vez que eles são os responsáveis pelo maior número de descendentes diretos dentro dos plantéis.

Apenas uma pequena fração dos rebanhos brasileiros emprega técnicas como a Inseminação Artificial, ocorrendo a reprodução nos demais através de monta natural. Assim, é importante conferir aos reprodutores um status sanitário e nutricional e evitar alguns fatores que podem reduzir a qualidade seminal e índices reprodutivos dos machos, como a criação em instalações inadequadas, uso de animais de idade avançada (VIEIRA-NETO *et al.*, 2017), exposição a agentes tóxicos, distúrbios hormonais (OYEYEMI *et al.*, 2011) e intempéries climáticas (SOUZA, SALLES e ARAUJO, 2012), como o estresse térmico.

Essas injúrias podem predispor a gônada masculina a diferentes graus de degeneração testicular (DT), e sendo este um importante órgão de função mista, é possível que o animais não só apresentem baixa qualidade de seu ejaculado, como também alterações



comportamentais como a redução de libido, devido à redução na produção de testosterona (SOUZA *et al.*, 2003; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Nesse contexto, a presente revisão objetiva descrever as principais alterações que ocorrem em pequenos ruminantes domésticos machos, submetidos a diferentes graus de degeneração testicular resultante de estresse térmico, correlacionando-as às mudanças encontradas no plasma seminal, na morfologia espermática e, paralelamente, aos parâmetros de cinética espermática.

### **DEGENERAÇÃO TESTICULAR E SUAS CONSEQUÊNCIAS**

A degeneração testicular (DT) é tida como a principal causa de subfertilidade em machos das espécies domésticas, sendo um desafio a ser contornado para se obter sucesso na reprodução (CAVALCANTE *et al.*, 2014; VIEIRA-NETO *et al.*, 2017).

Oyeyemi *et al.* (2011) citam que as principais causas da DT em touros são a exposição a toxinas, ocorrência de distúrbios endócrinos, infecções e o estresse térmico, sendo a última uma das merecedoras de maior destaque como fator predisponente à incidência da patologia. Já Garcia (2017) acrescenta as desordens nutricionais, excesso de gordura escrotal, varicocele e iatrogenias medicamentosas. Ademais, este autor postula que apesar de a DT apresentar múltiplas causas possíveis, como regra geral, essa condição patológica é observada como adquirida no decorrer da vida do reprodutor.

Gabaldi e Wolf (2002) citam que a elevação da temperatura ambiental pode alterar a termorregulação testicular, culminando em degeneração do órgão. Segundo eles, em países com temperaturas elevadas, é comum a ocorrência de alterações no epitélio seminífero de touros, com consequentes efeitos na qualidade do sêmen.

Quando a DT é ocasionada por injúrias térmicas é possível encontrar variações em sua intensidade, visto que a tolerância ao calor pode ser influenciada pela raça, aptidão, características do pelame e presença ou não de lã. Em ovinos, a presença de lã e o tamanho do velo tornam os machos menos tolerantes ao calor (ARMENGOL *et al.*, 2015). Já na espécie caprina, uma menor tolerância ao estresse térmico tem sido observada em raças europeias em condições de clima tropical no decorrer de todo o ano, sendo o período da tarde o mais crítico do dia, no tocante às falhas na termorregulação (SALLES *et al.*, 2009).

Para Gholami (2010), a sensibilidade dos bovinos taurinos perante ao estresse térmico resulta em baixa qualidade espermática. Gabaldi e Wolf (2002) citam que dentre os touros, os zebuínos apresentam uma superfície de pele mais extensa e com maior número de glândulas

sudoríparas e menor potencial à termogênese, o que os torna mais tolerantes ao calor que os primeiros. Também nessa espécie, Brito *et al.* (2012) associaram a termorregulação a particularidades anatômicas testiculares, como disposição de vasos sanguíneos e perfusão do órgão, independente do grupo étnico.

No início do processo de DT, em ruminantes, as principais alterações macroscópicas encontradas são relacionadas ao tamanho, peso e textura do órgão (GABALDI e WOLF, 2002), ocorrendo uma discreta assimetria ou redução das dimensões testiculares (MOREIRA *et al.*, 2001), acompanhada de flacidez à palpação (NASCIMENTO e SANTOS, 2003). Estes autores sugerem que, com o avançar do processo, pode ocorrer a redução do volume da gônada e aumento da consistência da estrutura testicular à palpação. Tal fato é associado à mineralização dos túbulos seminíferos, que aumenta a proporção de estroma no órgão, perceptível a olho nu, com presença de pontos focais esbranquiçados ou amarelados na superfície parenquimatosa do testículo (CAVALCANTE *et al.*, 2014).

Garcia (2017), concordando com os achados macroscópicos descritos, associa-os diretamente a uma progressiva redução na qualidade seminal. O autor cita que isto se deve às alterações histológicas que ocorrem, a partir da vacuolização e desprendimento de células germinativas. Nesses processos iniciais, Devkota *et al.* (2010) identificaram, na avaliação histopatológica de testículos bovinos após insulação escrotal, que podem ocorrer lesões nos túbulos seminíferos, com ocorrência de vacúolos, núcleos picnóticos e células gigantes multinucleadas em suas paredes tubulares.

Enquanto a DT progride, ocorre deformação da estrutura dos túbulos seminíferos, atrofia e perda de células de Sertoli, e redução significativa das células da linhagem espermática, desde espermatídes até espermatozoides (DEVKOTA *et al.*, 2010). Em seguida, a perda de células espermáticas é intensificada, podendo ocorrer seu acúmulo à luz do túbulo seminífero, reduzindo a concentração espermática (DEVKOTA *et al.*, 2010; GARCIA, 2017). Em casos avançados, há desprendimento de grande percentual de células do epitélio germinativo, que culminam em redução do volume e peso testicular (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Estudos apontam que o prognóstico e a possibilidade de recuperação da sanidade reprodutiva do animal nestas condições dependem de sua causa, intensidade e duração do processo agressor (GABALDI e WOLF, 2002). Em episódios curtos de estresse térmico, com pouca fibrose ou perda de parênquima, há possibilidade de reversão do quadro clínico, que evidencia certa resistência do epitélio seminífero a fatores estressantes (MOREIRA *et al.*,

2001). No entanto, mesmo com a retomada à normalidade morfológica, ainda pode ocorrer subfertilidade do sêmen e aumento na mortalidade embrionária (GABALDI e WOLF, 2002).

### **Alterações identificadas no plasma seminal**

O plasma seminal é resultante das secreções testiculares, epididimárias e das glândulas sexuais acessórias (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Sua composição está relacionada à futura capacidade de fertilização espermática, e já há mais de 700 proteínas conhecidas em sua composição. Esse composto também contém íons inorgânicos, açúcares, sais orgânicos, lípidos, enzimas, prostaglandinas e vários outros componentes (SOLEILHAVOUP *et al.*, 2014).

Uma vez que o reprodutor é acometido de estresse térmico testicular, pode desenvolver algum grau de degeneração testicular (OYEYEMI *et al.*, 2011) e sofrer mudanças na composição do plasma de seu ejaculado, que terão implicações diretas na cinética, morfologia e qualidade seminal total (MOREIRA *et al.*, 2001; VIEIRA-NETO *et al.*, 2017).

Macroscopicamente, em touros acometidos por DT podem ocorrer diversas alterações na coloração de seu sêmen, que podem estar relacionadas à concentração espermática ou ocorrência de pigmentos e até células inflamatórias (OYEYEMI *et al.*, 2011; CBRA, 2013). Microscopicamente, algumas dessas mudanças podem ser concomitantes ao desprendimento excessivo de células do epitélio germinativo e sua disponibilização à luz do túbulo seminífero (GARCIA, 2017).

Vieira-Neto *et al.* (2017) sugerem que as células desprendidas do túbulo favoreçam o aumento de mediadores pró-inflamatórios no ejaculado, em especial as prostaglandinas. Já foi descrito por Archbald *et al.* (1990) que o teor de algumas delas no plasma seminal implica em redução da qualidade seminal, como a elevação de PGE<sub>2</sub>, que reduz a reação acrossomal do espermatozoide de ovinos.

Fayed (1996) expôs que a adição de prostaglandina F<sub>2α</sub> ao plasma seminal pode causar redução da fertilidade em touros, por causar danos acrossomais e liberação precoce das enzimas transaminase e lactato desidrogenase. Contudo, essa resposta se mostra variada a depender da espécie, tanto que, o mesmo autor evidenciou que esses danos e a liberação de enzimas transaminases não ocorrem na espécie ovina, evidenciando a resistência do espermatozoide do carneiro ao análogo da PGF<sub>2α</sub>.

Nos caprinos, em especial, quanto maior o número de células disponíveis como fonte de lipídios membranares, maior a probabilidade da ocorrência de prostaglandinas no ejaculado, visto que a espécie apresenta naturalmente frações proteicas com atividade fosfolipase A, secretadas pelas glândulas bulbouretrais (GIBBONS, 2002; NUNES, 1982), e capazes de desencadear a síntese de eicosanoides através da via do ácido araquidônico (VIEIRA-NETO, 2017).

Sabe-se que a composição protéica do plasma seminal está relacionada com a capacidade fecundante do ejaculado (SOLEILHAVOUP *et al.*, 2014). Em consonância com este fato, Moura (2005) evidenciou que a composição peptídica do ejaculado de touros está associada a aspectos fundamentais da função reprodutiva do macho.

Souza (2007) fez considerações semelhantes quanto à correlação entre proteômica e qualidade do sêmen de carneiros no início da atividade reprodutiva, sugerindo que as alterações no perfil proteico desse componente do ejaculado de ruminantes afetados pelo calor deve, também, ser sempre considerada quando da avaliação da qualidade seminal. Em acréscimo, Martins *et al.* (2010) concluíram que a concentração de proteínas solúveis do plasma seminal, apesar de ser fundamental, não pode ser utilizada como parâmetro isolado para prever a qualidade seminal de bodes da raça Parda Alpina.

Ao longo das fases da vida reprodutiva do carneiro, ocorrem diversas alterações na composição proteica de seu ejaculado (SOUZA, 2007). Todavia, de acordo com Rocha *et al.* (2015), tais alterações são mais bruscas quando da ocorrência de estresse térmico. Segundo estes, em casos de estresses intensos, a exemplo da introdução de insultos testiculares, são identificadas a proteína Dj-1 (PDJ-1) e a proteína de choque térmico HSP70.3, além da proteína C-reativa, que é encontrada quando ocorre dano celular e inflamação.

Estudos mostram que a ocorrência destes peptídeos no plasma seminal é concomitante às mudanças indesejáveis nos parâmetros do sêmen (ROCHA *et al.*, 2015). Enquanto isso, Van Tilburg *et al.* (2014), citam que a redução na qualidade espermática em períodos de estresse testicular está relacionada à redução na expressão de proteínas importantes à funcionalidade da membrana espermática, como a Trifosfato de Adenosina (ATP) sintetase.

Por fim, quando se trabalha com indução de estresse térmico testicular através da insulação, é possível que não ocorram consideráveis alterações no volume do ejaculado do ruminante pelo fato de as glândulas acessórias não serem afetadas diretamente pelo insulto (OYEYEMI, *et al.*, 2011). Todavia, em processos crônicos ou mais intensos, assim como em estresse térmico em condições ambientais, pode ocorrer uma considerável redução de volume

(GABALDI e WOLF, 2002; COELHO *et al.*, 2006), visto que ocorrem alterações nas dimensões testiculares (MOREIRA *et al.*, 2001; NASCIMENTO e SANTOS, 2003) e a produção espermática está associada ao volume testicular (JONES e DACHEUX, 2007).

### **Características morfológicas dos espermatozoides de reprodutores acometidos por estresse térmico testicular**

As alterações encontradas no plasma seminal são concomitantes a modificações na morfologia espermática, uma vez que o estresse térmico é capaz de interferir nesse parâmetro de forma direta e indireta (ROCHA *et al.*, 2015). Os efeitos encontrados podem ser decorrentes de sua ação intratesticular ou no decorrer do trato reprodutivo masculino, sendo que os espermatócitos são o tipo celular mais suscetível a danos e morte pela ausência de termorregulação testicular (OYEYEMI *et al.*, 2011).

Nesses casos, a espermatogênese sofre um efeito deletério, podendo ficar significativamente reduzida ou inclusive ocorrer anospermia, como é observado em animais criptorquídicos ou em animais submetidos à insulação escrotal (GABALDI e WOLF, 2002; MOREIRA *et al.*, 2001). Assim, de acordo com a extensão do dano causado ao testículo, pode ocorrer além dessa redução no número de células espermáticas no ejaculado, um aumento considerável no percentual de gametas com alterações morfológicas (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Em caprinos europeus, os melhores ejaculados foram colhidos nos meses de clima frio ou ameno (AHMED *et al.*, 1997). Nos demais períodos, a falha na termorregulação gonadal em pequenos ruminantes durante a fase espermática testicular é capaz de ocasionar alterações na espermatogênese, o que pode ser mais grave quando ocorre no período de multiplicação das espermatogônias e início da meiose, causando o aumento no percentual de células com defeitos maiores no ejaculado (CBRA, 2013; MOREIRA *et al.*, 2001). Em touros, isso também pode resultar em maior susceptibilidade à desnaturação de cromatina nos espermatozoides, que também está relacionado à redução da fertilidade do ejaculado (KARABINUS *et al.*, 1997).

Como o epidídimo também é sítio de danos espermáticos devido ao estresse térmico, nele pode ocorrer o aumento do percentual de células com defeitos menores, tanto por maior ocorrência desses espermatozoides quanto por redução da capacidade de eliminação epididimária das células defeituosas (JONES e DACHEUX, 2007).

Durante o percurso do trânsito espermático epididimário, o estresse térmico também tem a capacidade de influenciar na maturação da membrana do espermatozoide de caprinos, reduzindo sua integridade (MARTINS *et al.*, 2010). Van Tilburg *et al.* (2014) destacam que essas alterações eminentes na membrana espermática influenciam na qualidade do sêmen por interferir na futura interação entre espermatozoide e oócito.

Johnston e Branton (1953) atribuíam a baixa qualidade seminal de touros europeus em meses quentes aos efeitos do estresse térmico sobre o testículo e as respectivas alterações seminais ocorridas. Em seguida, Nunes *et al.* (1983) observaram em seus estudos que os ejaculados de bodes submetidos a algum grau de injúria térmica testicular eram abundantes em patologias como cabeça isolada normal, cauda enrolada, e gotas citoplasmáticas proximal e distal (CBRA, 2013).

Em concordância, Karabinus *et al.* (1997) reportaram que em touros holandeses a ocorrência de estresse térmico resulta em aumento na incidência de anormalidades espermáticas, concomitante à redução na produção de espermatozoides. Lunstra e Coulter (1997) e Brito *et al.* (2003), em trabalhos com touros de corte em desconforto térmico testicular, identificaram a maior ocorrência de anormalidades de cabeça (como isolada e defeitos de acrossoma), defeitos de peça intermediária e cauda, sendo destacada a ocorrência de gota citoplasmática proximal, que resultou em sêmen com menores índices de fecundidade.

Em uma síntese bibliográfica, Gabaldi e Wolf (2002) relataram que as principais patologias espermáticas de grandes ruminantes domésticos em processo de degeneração testicular são a ocorrência de células de descamação, presença de espermátides, formas medusoides, células gigantes, e/ou de núcleos picnóticos no ejaculado. Tais alterações justificam o fato de os problemas relacionados à qualidade seminal serem os principais responsáveis pela subfertilidade em touros (OYEYEMI *et al.*, 2011).

Numa pesquisa com indução ao estresse térmico por insulação escrotal em ovinos, foi corroborado que, em situações em que a termorregulação testicular é comprometida, o ejaculado do carneiro pode apresentar inicialmente maior número de defeitos de ordem menor (cabeças espermáticas normais livres e células com cauda dobrada ou enrolada), resultante do estresse térmico no momento do trânsito epididimário (MOREIRA *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2015; JONES e DACHEUX, 2007).

Adiante, pode ocorrer o aumento no número de defeitos de ordem maior (gota citoplasmática proximal, cabeça pequena anormal e células decapitadas), e isso pode prejudicar ainda mais a qualidade do ejaculado (MOREIRA *et al.*, 2001; CBRA, 2013), em conjunto com a redução da integridade acrossomal que ocorre nesses casos (De *et al.*, 2017).

Achados semelhantes a estes foram obtidos em um experimento realizado por Coelho *et al.* (2006), onde os autores ressaltaram que a redução na concentração espermática, assim como o aumento no percentual de células espermáticas mortas, pode ocorrer independente da ocorrência ou não de alterações morfológicas das células espermáticas obtidas no ejaculado desses animais.

Para se estimar o grau de alteração morfológica no espermatozoide desses animais, Armengol *et al.* (2015) desenvolveram um parâmetro que avalia indícios de estresse térmico no sêmen de carneiros. Para tanto, consideraram a razão entre comprimento e largura da cabeça dos espermatozoides como sendo a chamada elipticidade. Essa grandeza, segundo os autores, alcança valores acima de 2,0 em casos de estresse térmico mais intenso. Tais alterações ocorrem quando o gameta está ainda nos túbulos seminíferos, sendo, portanto, anormalidades primárias, da mesma forma que os defeitos de origem maior (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MOREIRA *et al.*, 2001).

Em síntese, nos processos iniciais de estresse térmico, a ocorrência de defeitos menores (de origem predominantemente epididimária) é um indicador de alta sensibilidade, tornando-se uma importante ferramenta no monitoramento andrológico de ruminantes. Aliada a esta avaliação, é indispensável a verificação dos parâmetros de cinética espermática, visto que eles antecedem quaisquer alterações significativas na biometria testicular (MOREIRA *et al.*, 2001).

### **Alterações evidenciadas nos parâmetros de cinética espermática**

Fora relatado por Garcia (2017) que em animais afetados pela degeneração testicular a morfologia espermática é uma das características mais afetadas. Esses defeitos nos espermatozoides de ruminantes domésticos estão correlacionados à redução da fecundidade dos ejaculados, associada à menor qualidade dos parâmetros de cinética espermática (GABALDI e WOLF, 2002; VIEIRA *et al.*, 2008; VAN TILBURG *et al.*, 2014; DE *et al.*, 2017). Tais parâmetros podem ser utilizados como um indicador sensível de injúrias térmicas testiculares, já em processos iniciais (MOREIRA *et al.*, 2001), o que pode ser útil para avaliar os efeitos do clima e estação do ano sobre a reprodução do macho (VIEIRA *et al.*, 2008).

Segundo Vieira *et al.* (2008), caprinos com bolsa escrotal bipartida apresentam maior dissipação de calor pelo aumento de área com pele e, conseqüentemente, mais glândulas sudoríparas para a termorregulação testicular, apresentando melhores parâmetros de cinética espermática e menor variação de qualidade seminal no decorrer do ano. No entanto, quando

estes animais são submetidos ao estresse térmico severo, com aumento na temperatura testicular, há significantes decréscimos do volume do ejaculado, da concentração espermática, e dos índices de cinética espermática (motilidade massal, progressiva e vigor espermático) (COELHO *et al.*, 2006).

Em concordância, estudos científicos tem mostrado que nos carneiros submetidos ao estresse térmico são encontrados índices indesejáveis de cinética espermática, o que também é associado ao maior número de defeitos espermáticos encontrado em seus ejaculados, comprometendo a motilidade dos espermatozoides (MOREIRA *et al.*, 2001; ARCHBALD, 2015).

Nos touros em situação de estresse térmico, esses achados são comuns. De acordo com os estudos de Lunstra e Coulter (1997) e Brito *et al.* (2003), o estresse térmico testicular nessa espécie tem a capacidade de afetar negativamente a morfologia espermática, interferindo de maneira indesejável na qualidade do ejaculado, no tocante aos parâmetros de cinética espermática. Oyeyemi *et al.* (2011) acrescentam que essa situação também pode ser atribuída à redução do número total de células espermáticas e do percentual de células vivas no ejaculado, que naturalmente influenciarão nos percentuais de motilidade espermática.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A degeneração testicular é um processo multifatorial que se comporta como um fator limitante na reprodução de machos ruminantes domésticos. Essa patologia, independente de sua gênese, está intimamente ligada à redução na fertilidade e qualidade seminal nessas espécies. Assim, é indispensável o conhecimento de sua fisiopatologia para que sejam evitados ou minimizados seus fatores predisponentes, assim como a estipulação de um prognóstico para o futuro reprodutivo do animal.

### **REFERÊNCIAS**

AHMED, M.M.M.; MAKAWI, S.A.; GADIR, A.A. Reproductive performance of Saanen bucks under tropical climate. *Small Ruminant Research*, v. 26, p. 151-155, 1997.



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

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

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; WILDE, R.E.; KASTELIC, J.P. Testicular vascular cone development and its association with scrotal temperature, semen quality, and sperm production in beef bulls. *Animal Reproduction Science*, v. 134, p. 135–140, 2012.

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; BARBOSA, R.T.; UNANIAN, M.M.; KASTELIC, J.P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. *Animal Reproduction Science*, v. 79, p. 1–15, 2015.

CAVALCANTE, J.M.M.; BRASIL, O.O.; OLIVEIRA, R.V.; PESSOA, A.W.P.; ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Ultrassonografia testicular em caprino com degeneração testicular associado a lesões escrotais: Relato de caso. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 08, p. 54-72, 2014.

COELHO, L.A.; SASA, L.; NADER, C.E.; CELEGUINI, E.C.C. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.4, p. 544-549, 2006.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013, p. 15-90.

DE, K.; KUMAR, D.; BALAGANUR, K.; SAXENA, V.K.; THIRUMURUGAN, P.; NAQVI, S.M.K. Effect of thermal exposure on physiological adaptability and seminal attributes of rams under semi-arid environment. *Journal of Thermal Biology*, v. 65, p. 113–118, 2017.

DEVKOTA, B.; SASAKI, M.; MATSUI, M.; TAKAHASHI, K.I.; MATSUZAKI, S.; KOSEKI, T.; MIYAKE, Y.I. Effects of scrotal insulation and pathological lesions on  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA and vimentin) in the bull testes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 56, n. 2, p. 187-190, 2010.

- FAYED, A.H.A. Effect of Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and Methylxanthines on enzymic release of bull epididymal spermatozoa in Vitro. *Contraception*, v. 53, p. 181-184, 1996.
- GABALDI, S.H.; WOLF, A. Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. *Ciências Agrárias*, v. 2, n. 2, p 66-70, 2002.
- GARCIA, A. R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, p.33-39, 2017.
- GHOLAMI, H.; CHAMANI, M.; TOWHIDI, A.; FAZELI, M. H. Improvement of semen quality in holstein bulls during heat stress by dietary supplementation of omega-3 fatty acids. *International Journal of Fertility and Sterility*, v. 4, p. 160-167, 2011.
- GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. *Revista Taurus*, v. 4, n. 16, p. 24-32, 2002.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7. ed., Barueri: Manole, p. 3-380, 2004.
- JOHNSTON, J.E.; BRANTON, C. Effects of seasonal climatic changes on certain Physiological reactions, semen production And fertility of dairy bulls. *Journal of Dairy Science*, v. 36, p. 934-942, 1953.
- JONES, R. C.; DACHEUX, J. L. Physiology of the epididymis In: KANDEL, F. R.; SWERDLOFF, R. S.; PRIOR, J. L. *Male reproductive dysfunction: pathophysiology and treatment*. Nova York: Informa Healthcare, 2007. cap. 6, p. 71-80.
- KARABINUS DS, VOGLER CJ, SAACKE RG, EVENSON DP. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *Journal of Anthology*, v. 18, n. 5, p. 549-555, 1997.
- LUNSTRA, D.D.; COULTER, G. H. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 767-774, 1997.
- MARTINS, L.F.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; GUIMARÃES, J. D.; GUIMARÃES, S.E F.; PINHO, R.O. Qualidade seminal e concentração das proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça Alpina. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.11, n.2, p. 547-554, 2010.

- MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A. N.; ARAÚJO, A. A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, p 1704-1711, 2001.
- MOURA, A. A. A. N. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2005.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 137p.
- NUNES, J. F. Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoides de bouc. 1982. 33f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Université Pierre et Marie Curie, Paris, 1982.
- NUNES, J.F.; RIERA, G.S.; SILVA, A.E.F.D.; PONCE DE LEON, F.A. Características espermáticas de caprinos Moxotó de acordo com a morfologia escrotal. Sobral: EMBRAPA/CNPCAPRINOS, 1983. 11p. (Circular Técnica, 6).
- OYEYEMI MO, ADENIJI DA, OLUGBEMI JB. The Spermogram of Mesterolone Treated West African Dwarf Bucks with Testicular Degeneration. *Nigerian Veterinary Journal*, v. 32, p. 54 – 59, 2011.
- ROCHA, D.R., MARTINS, J. A. M.; VAN TILBURG, M.F.; OLIVEIRA, R.V.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R. A.; ARAUJO, A. A.; MOURA, A. A. A. N. Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. *Theriogenology*, v. 84, n. 8, p. 1291-1305, 2015.
- SALLES, M. G. F.; SOUZA, C. E. A.; RONDINA, D.; MOURA, A. A. A. N.; ARAÚJO, A. A. Respostas fisiológicas ao estresse térmico de bodes saanen em clima tropical. *Ciência Animal*, v.19, p. 19-28, 2009.
- SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, C. G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G. KOHNKE, P. L.; DACHEUX, J. L.; GUÉRIN, Y.; GATTI, J. L.; GRAAF, S. P.; DRUART, X. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *Journal of Proteomics*, v. 109, p. 245 – 260, 2014.
- SOUZA, C. E. A. Análise proteômica do plasma seminal e secreções do epidídimo em ruminantes: potenciais associações com o desenvolvimento sexual, parâmetros seminais e função espermática. 2007. 185 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A. A. N.; ARAÚJO, A. A.; LIMA, A. C. B. Estudo das interações entre o desenvolvimento gonadal, produção espermática, concentrações de testosterona e aspectos ligados à puberdade em carneiros Santa Inês ao longo do primeiro ano de vida. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, p. 199-201, 2003.

SOUZA, P. T.; SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Impacto do estresse térmico sobre a fisiologia, reprodução e produção de caprinos. *Ciência Rural*, v. 42, p. 1888-1895, 2012.

VAN TILBURG, M. F.; SALLES, M. G. F.; SILVA, M. M.; MOREIRA, R. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MARTINS, J. A. M.; CÂNDIDO, M. J. D.; ARAÚJO, A. A.; MOURA, A. A. A. N. Semen variables and sperm membrane protein profile of Saanen bucks (*Capra hircus*) in dry and rainy seasons of the northeastern Brazil (3°S). *Int J Biometeorol*, v. 59, p. 561–573, 2014.

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

VIEIRA-NETO, M. F. EFEITO DA FLUNIXINA MEGLUMINE NA ATIVIDADE ESPERMÁTICA DE MACHOS OVINOS E CAPRINOS. 2017, 50 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.

VIEIRA-NETO, M.F.; RODRIGUES, I.C.S.; LELES, J.S.; ARAÚJO, E.P.; VIANA-NETO, A. M.; SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A.A. Efeito da administração de Flunixin Meglumine sobre as características seminais de machos ovinos e caprinos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 38, p. 3145-3154, 2017.

**7 CAPÍTULO 2 - ARTIGO TÉCNICO**

**TERMOGRAFIA TESTICULAR E QUALIDADE SEMINAL EM BODES  
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO TESTICULAR INTERMITENTE EM CLIMA  
TROPICAL**

Periódico – Semina: Ciências Agrárias (Aceito)

Qualis (CAPES): B1

ISSN: 1679-0359

E-mail: [semina.agrarias@uel.br](mailto:semina.agrarias@uel.br)

**Testicular thermography and seminal quality in bucks submitted to intermittent scrotal insulation in a tropical climate**

**Termografia testicular e qualidade seminal em bodes submetidos à insulação testicular intermitente em clima tropical**

Maurício Francisco Vieira Neto<sup>1\*</sup>; Bruna Farias Brito<sup>1</sup>; Marcimar Silva Sousa<sup>1</sup>; Maria Gorete Flores Salles<sup>2</sup>; Aderson Martins Viana Neto<sup>3</sup>; José Ferreira Nunes<sup>3</sup>; Vicente José de Figueiredo Freitas<sup>3</sup>; Airton Alencar de Araujo<sup>3</sup>

**Highlights:**

Intermittent testicular insulation compromised testicular thermoregulation in bucks.  
Intermittent insulation causes seminal damage similar to testicular degeneration.  
Thermograms were useful in the functional testicular evaluation after thermal stress.  
Associating TIV with CASA allowed an accurate assessment of testicular degeneration.

**Abstract:** Testicular degeneration is highly prevalent in ruminants reared in a tropical climate like Brazil. Therefore, it is necessary to assess semen quality periodically in these animals. This study aimed to define standard images (thermograms) using infrared thermography (TIV), associated with a computerized seminal evaluation (CASA), to predict testicular alterations noninvasively. For this, 10 male goats were selected and their testes were insulated to evaluate the seminal quality and superficial testicular temperature recorded at four different phases: before, during, and after (early and later) insulation. Semen collection, rectal temperature (TR) and superficial testis (TS) by TIV were assessed for 60 days after insulation. Data are expressed as median and standard errors and were analyzed using analysis of variation with comparison between the periods using Tukey's test at 5% probability. Changes in seminal quality followed the same standard of changes in TS, with no influence of the latter on TR. The mean testicular temperature increased by more than 2°C above the normal mean testis temperature, with a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the before and after insulation phases, and concomitantly reduced seminal parameters and almost returned to normal 60 days postinsulation. These changes in testis surface temperature associated with semen analysis allowed us to obtain pattern images of testicular degeneration, permitting prediction by TIV of testis alterations for later assessment of seminal quality.

**Key words:** Animal thermal confort. Testis thermoregulation. Buck semen evaluation.

**Resumo:** A degeneração testicular é altamente prevalente em ruminantes criados em clima tropical no Brasil. Portanto, é necessário avaliar a qualidade do sêmen periodicamente nesses animais. O objetivo deste trabalho foi definir imagens-padrão (termogramas) usando termografia por infravermelho (TIV), associada à avaliação seminal computadorizada (CASA) de maneira não invasiva, para diagnóstico de

<sup>1</sup> Discente do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, PPGCV, Universidade Estadual do Ceará, UECE, Fortaleza, CE, Brasil. E-mail: mauricio.macejo@hotmail.com; britobf@live.com; marcimarmv@hotmail.com

<sup>2</sup> Prof., Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, UNILAB, Redenção, CE, Brasil. E-mail: gorete@unilab.edu.br

<sup>3</sup> Profs., UECE, Fortaleza, CE, Brasil. E-mail: adersonv@gmail.com; ferreira.nunes@uece.br; vicente.freitas@uece.br; airton.alencar@uece.br

\*Author for correspondence

alterações testiculares. Para tanto, 10 machos caprinos foram selecionados e seus testículos insulados para avaliar a qualidade seminal e as temperaturas retal e testicular superficial, registradas em quatro momentos diferentes: antes, durante e cedo e tarde após a insulação. As coletas de sêmen e as temperaturas retal e testicular superficial pela TIV foram avaliadas por 60 dias após a insulação. Os dados foram expressos em média e erro padrão e submetido à análise de variância (ANOVA) com comparação entre os momentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As mudanças na qualidade seminal seguiram o mesmo padrão das mudanças na temperatura da TS, sem influência do último na temperatura retal. A temperatura testicular média aumentou mais de 2 graus acima da temperatura média normal do testículo ( $p < 0,05$ ) durante a insulação, em relação aos momentos antes e após a insulação, e concomitantemente redução nos parâmetros seminais com retorno a quase normalidade aos 60 dias após a insulação. Essas mudanças nas temperaturas da superfície do testículo associadas à análise do sêmen permitiram obter imagens padrões de degeneração testicular, possibilitando prever, por TIV, alterações testiculares para posterior avaliação da qualidade seminal.

**Palavras-chave:** Conforto térmico animal. Termorregulação testicular. Avaliação seminal caprina.

## Introduction

In northeastern Brazil, the reproduction of goats is influenced by the hard weather in the semi-arid climate of the hinterland or semi-humid climate of the coast, with significant daily variations in temperature and relative humidity (Rocha et al., 2015; Salles, Souza, Rondina, Moura, & Araujo, 2009). In these settings, male and female goats not accustomed to high thermal radiation may have low reproductive efficiency (I. C. S. Rodrigues, 2016; Souza et al., 2014).

In ruminants, the occurrence of thermal stress is one of the main factors involved in testicular degeneration, a multifactorial process that culminates in a reduction in seminal quantity and quality and increase in the number of sperm pathologies (Moreira, Moura, & Araujo, 2001; Rocha et al., 2015). This condition may occur naturally or be induced by testicular insults (Alves et al., 2016) and may be reversible, depending on the cause of its genesis (Vieira et al., 2017). The irreversible sequelae, such as the occurrence of testicular fibrosis, may remain (Cavalcante et al., 2014a; Gabaldi & Wolf, 2002).

Mild, moderate, and severe testicular degeneration have been frequently reported in animals reared in extensive and intensive systems in tropical climates, as in Brazil (Vieira, 2017). Controlled scrotal insulation has been used for the study of testicular changes caused by experimental conditions. This makes it possible to simulate in a short period of time changes that occur in natural conditions, allowing the evaluation of testicular and seminal changes and their return to normality (Santos & Simplicio, 2000; Moreira et al., 2001; Rocha et al., 2015).

Since reproduction depends on the quality of the ejaculation, periodic seminal evaluations must be performed in domestic ruminants to select and monitor male species (Vieira, 2017). Semen collection is usually performed using an artificial vagina or electroejaculation (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [CBRA], 2013), and the evaluation can be performed by direct optical microscopy (Vieira et al., 2017) or modern methods such as computerized analysis (Cavalcante, Brasil, Salgueiro, Salmito-Vanderley & Nunes, 2014b).

Testicular activity monitoring can be done using noninvasive methods, such as Mode B Ultrasonography (Cavalcante et al., 2014a) and infrared thermography (Alves et al., 2016; Barca et al., 2020), which provides images that map areas of higher and lower temperatures on the body surface. This is useful for assessing the thermolysis and thermal adaptation capacity of the animal using thermogram maps (I. C. S. Rodrigues, 2016). Infrared thermography has already been used in other ruminant species, such as bulls (Romanello et al., 2018) and sheep (Alves et al., 2016; Kahwage et al., 2017).

Thus, this study aimed to evaluate testicular degeneration induced by intermittent scrotal insulation in goats, associating thermography with an evaluation of seminal quality by computerized analysis, in three phases: before, during, and after the process of insulation, which enabled better interpretation of thermographic maps in case of testicular degeneration that commonly occurs in animals reared in a tropical climate.

## **Materials and Methods**

This study was approved by the ethics committee for the use of animals in research at the State University of Ceará, under protocol number 4565073/2018, and occurred from August to December 2018.

### *Experiment execution location*

The experiment was carried out at the Integrated Nucleus of Biotechnology and Laboratory of Physiology and Reproduction Control of the Veterinary Faculty of the State University of Ceará, Itaperi campus, in the City of Fortaleza, located at 3° 47'37" S of latitude and 38° 33'30" S longitude south, with an altitude of 26.0 m above sea level. The local climate is type AW (tropical semi-humid), according to Köppen-Geiger, with an average ambient temperature varying between 26 and 28 °C and an average annual precipitation of 1448 mm. During the execution of the study, the average ambient temperature was 27.8 °C, and the relative air humidity was 71.1%. Such data characterize an average temperature and humidity index of 78.16, with a maximum value of 82 and a minimum of 76.5 (Thom, 1959).

### *Selection and management of experimental animals*

Ten 18-month-old crossbred goats with an average weight of 40 kg were selected. The health condition of the animals was verified through clinical and andrological examinations, associated with complementary laboratory tests (coproparasitological, blood analysis, and serum biochemistry). Each animal was kept in an individual (3 × 2 m) covered area with access to a solarium; they received good quality water and specific commercial mineral salt for goats *ad libitum*. The feed consisted of Tifton 85 hay (*Cynodon dactylon*) and balanced, concentrated feed, meeting the nutritional requirements



recommended by the National Research Council [NRC] (2007).

After 30 days of adaptation to the facility, feeding, and semen collection by electroejaculation, the animals were subjected to semen collection and measurement of the rectal temperature (TR) and superficial temperatures of the testicles. This seminal collection method was adopted because the sexual behavior of male goats is unpredictable after the process of testicular insulation (Viana, 2018). This ensured that during the entire experimental period, there was continuous semen collection, according to the CBRA procedure manual (2013).

### *Experimental design*

Initially, data collection was performed once a week (TR, seminal parameters, and testicular infrared thermography) for 3 consecutive weeks (D-17, D-10, and D-3) to verify and document the normal condition of the animals before insulation. Testicular insults (thermal bags) recommended by Rocha et al. (2015) and Alves et al. (2016) were placed over the animals' scrotums on day D0, initiating the insulation (during phase).

For 4 consecutive nights, the thermal bag was placed at 6:00 pm and removed at 6:00 am the following morning, following the protocol used in sheep by Viana (2018), adapted from Moreira, Moura, and Araujo (2001). This procedure is used to compromise testicular thermoregulation and simulate a condition of natural testicular thermal stress, which can alter the seminal quality already verified in rams (Moreira et al., 2001; Rocha et al., 2015) and goats (Santos & Simplicio, 2000; Salles et al., 2009).

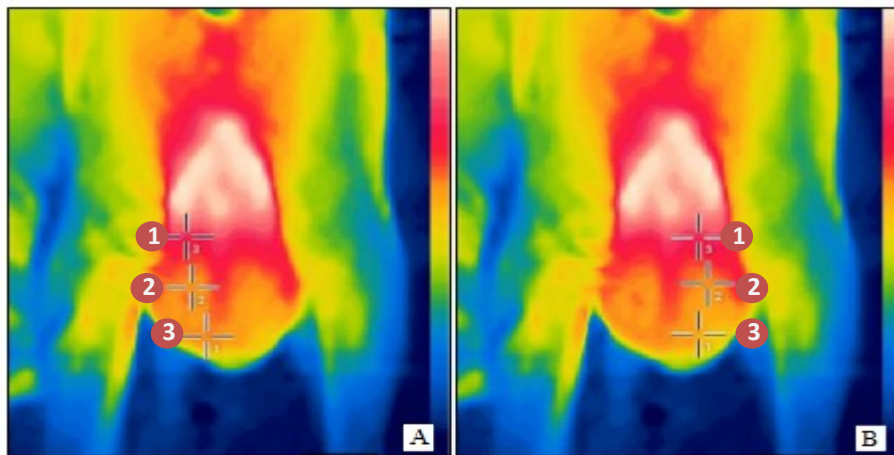
As shown in Figure 1, every day, during the period from D1 to D4, thermal bags were removed and the TR and testicular scrotal surface temperatures were assessed. However, only at D4 was the semen collection resumed; as the method adopted (electroejaculation) is invasive (L. F. S. Rodrigues, 1997; Vieira, 2017), it was decided to minimize any additional stress and discomfort that interfered with the animals welfare during the intermittent testicular insulation process. The postinsulation period was divided into an initial period (early), started at D4 and a posterior period (later), from D39 until the end of the experiment (D60).

	Days	Sunday	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday
Before	D(-17)					C		
	D(-10)					C		
	D(-3)					D(-3) = C		
During	D0-D4	D0 = I	D1 = T + I	D2 = T + I	D3 = T + I	D4 = C		
Early	D11					C		
	D28					C		
	D25					C		
	D32					C		
	D39					C		
Later	D46					C		
	D53					C		
	D60					C		

**Figure 1.** Schematic diagram of the experimental design. C: collection of seminal data and thermography; T: testicular thermography; I: intermittent testicular insulation  
*TR and infrared thermography of the testicular region*

On each semen collection day, the animals were properly restrained to measure the TR with a digital thermometer. The superficial temperature evaluation of the scrotal sac was performed using a method similar to that used by Alves et al. (2016) on each side of the scrotum, measuring the temperature at three different areas in the proximal, medial, and distal regions of the testicles.

Testicular thermograms were obtained using a thermographic camera that generated images of  $640 \times 480$  pixels, located 1 m from the animal and with emissivity adjusted to 0.90. The images were evaluated using the FLIR Quick Report program (FLIR Systems, USA), to obtain temperature data at the three areas of each testicle, as shown in Figure 2.



**Figure 2.** Testicular thermogram obtained during semen collection, showing the proximal (1), medial (2), and distal (3) areas of the posterior region of both testicles.  
A: Left side; B: Right side. 1-Proximal area; 2-Medial area; 3-Distal area.

#### *Collection and processing of seminal samples*

Semen was collected weekly at 8:00 a.m. using a 12 V automatic electroejaculator that emitted stimuli between 200 and 300 mA at intervals of 2–5 s (CBRA, 2013; Vieira et al., 2017). The collected ejaculate was immediately incubated in a water bath at 37°C. Then, using a calibrated pipette, the total semen volume was measured and a 5  $\mu$ L aliquot was separated to stain the slides with an equal amount of bromophenol blue, according to the methodology used by Medeiros et al. (2011), for counting the normal and abnormal cells.

Immediately after collection, sperm kinetics were assessed by computer analysis (CASA) using the Sperm Class Analyzer program (Microptic S. L, Barcelona, Spain), according to the methodology employed by Cavalcante et al. (2014b). Therefore, a 10  $\mu$ L sample of fresh semen from each ejaculate was diluted in 1 mL (1:100) of a solution containing coconut water powder (ACP), prepared in ultrapurified water, according to the manufacturer's recommendations (ACP

Biotecnologia, Fortaleza, Brazil). Ten microliters of this dilution were placed in a Makler chamber (Sefi Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) and preheated to 37°C to evaluate the percentage of mobile and progressive sperms.

To assess sperm concentration, 10 µL of fresh semen in 4.0 mL of formaldehyde saline (1:400) was used, measured with a micropipette, according to the recommendation by CBRA (2013). Cell counting was performed in a Neubauer chamber, following the recommendation by Chemineau, Cognie and Guerin (1991) for rams and bucks.

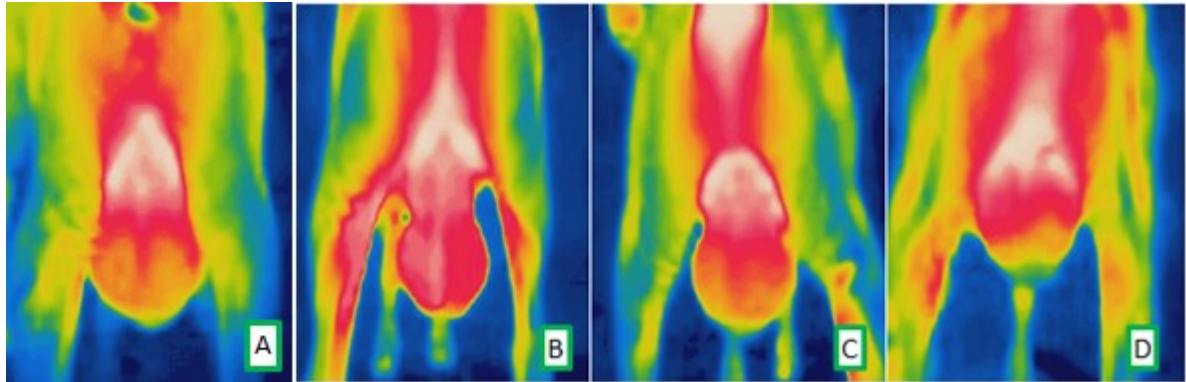
### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using SYSTAT software version 13 (USA). Data at different phases: before, during and after insulation were expressed as mean and standard error and submitted to the Shapiro-Wilk normality test. Those with abnormal distribution were transformed by  $(\log(x + 1))$  and those expressed as percentages transformed by the arccosine function (ACS). Then, data were evaluated using ANOVA with a 5% probability. When significant differences were found, the comparisons between the phases were performed using Tukey's test with multiple comparisons (two-by-two comparison probability matrix).

## **Results and Discussion**

Infrared thermography (TIV) has been used as a method for assessing changes in testicular temperature in ruminant males, including rams (Alves et al., 2016; Kahwage et al., 2017), bulls (Kastelic, Coulter, & Cook, 1995; Romanello et al., 2018; Barca et al., 2020), buffalos (Yadav et al., 2019), and bucks (Braz et al., 2019). However, most authors were restricted to the evaluation of the testicular surface temperature without considering a detailed evaluation of the thermal maps obtained from photographs. This study aimed to understand the clinical applicability of the thermograms obtained at different phases of this research, making it possible to monitor the testicular degeneration process, which is highly incident in reproducers reared in a tropical climate. This analysis of thermal maps obtained by TIV is similar to the evaluation of ultrasound or X-ray images, where the identification and diagnosis of probable alterations have, as a reference, the images of a healthy organ.

The thermograms in Figure 3 represent a variation in the spectrum according to the intensity of the emission of infrared waves (heat emission) at three different areas of the testis (proximal, medial, and distal). Variations between white and red indicate higher temperatures, that is, greater heat emission. The yellow, green, blue, and lilac spectra gradually indicate the lowest temperatures, thus allowing a color gradient to be formed to interpret the thermograms (I. C. S. Rodrigues, 2016). There is a variation in the thermograms between the phases of the experiment and variation in the heat distribution on the testicular surface, according to the emission areas.



**Figure 3.** Thermographic images of the testicle posterior region in frontal view, obtained during the different phases of the experimental procedure.

A: thermographic representation of the before insulation phase; B: last day of the during insulation phase on D4; C and D: after insulation phase, with C just after insulation on D11 (early) and D an image on D39 (later).

Figure 3A represents the thermal image before insulation, in animals with healthy testicles, image 3B during the testicular insulation process, and 3C and 3D after insulation (C: early and D: later). In the 3A image, there are three distinct thermal regions on the scrotal surface of the testicle not yet insulated, with the proximal red region representing a higher temperature ( $33.12^{\circ}\text{C}$ ). The medial region is yellow, with an intermediate thermal band ( $31.92^{\circ}\text{C}$ ) with a green halo in the most distal region of the testis (tail region of the epididymis), where the lowest temperature ( $30.55^{\circ}\text{C}$ ) was measured.

This testicular temperature gradient is explained by the fact that the proximal region is close to the pampiniform plexus, where the arterial blood reaches temperatures close to that of the body ( $38.13^{\circ}\text{C}$ ) (Hafez & Hafez, 2004), as included in Table 1. In the medial region, the temperature is lower, since the arterial blood that reaches the testis has already been cooled by the venous return blood in the pampiniform plexus due to a countercurrent relationship between the testicular veins and arteries, lowering the temperature in this region. This represents most of the testicular mass, favoring spermatogenesis that requires a temperature of  $2\text{--}6^{\circ}\text{C}$  below systemic temperature (Gabaldi & Wolf, 2002).

**Table 1**  
**Temperatures obtained by thermography at different phases and areas of the testicles**

Phases	PRT	PLT	MRT	MLT	DRT	DLT
Before	$33.11 + 0.31^{\text{A}}$	$33.14 + 0.31^{\text{A}}$	$31.87 + 0.32^{\text{Ab}}$	$31.98 + 0.33^{\text{Ab}}$	$30.51 + 0.23^{\text{Ac}}$	$30.58 + 0.27^{\text{Ac}}$
During	$34.48 + 0.23^{\text{B}}$	$34.67 + 0.22^{\text{B}}$	$34.42 + 0.22^{\text{B}}$	$34.56 + 0.24^{\text{B}}$	$33.68 + 0.23^{\text{B}}$	$33.82 + 0.24^{\text{B}}$
Early	$33.23 + 0.19^{\text{A}}$	$33.19 + 0.17^{\text{A}}$	$31.76 + 0.20^{\text{A}}$	$31.60 + 0.21^{\text{A}}$	$30.35 + 0.23^{\text{A}}$	$30.52 + 0.18^{\text{A}}$
After	$32.94 + 0.13^{\text{A}}$	$32.88 + 0.14^{\text{A}}$	$32.00 + 0.17^{\text{A}}$	$32.07 + 0.17^{\text{A}}$	$30.87 + 0.20^{\text{A}}$	$30.81 + 0.17^{\text{A}}$

PRT: proximal right testis; PLT: proximal left testes; MRT: medial right testis; MLT: medial left testis; DRT: distal right testis; DLT: distal left testes. Different uppercase letters in the columns and lowercase letters in the lines indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

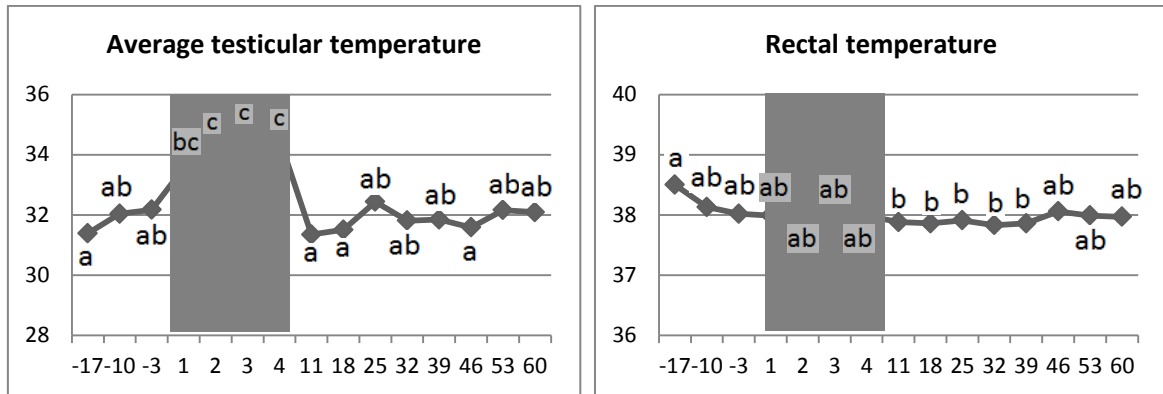
In the distal region of the testis, where the tail of the epididymis is located, the lower temperature is because this region is less irrigated in relation to the others and has a greater number of sweat glands, which allows greater heat loss (Blazquez et al., 1994). In bucks with healthy testicles, Figure 3A represents the standard for normal conditions, since in most animals this thermogram was visible at this phase, compatible with the findings of Viana (2018) in rams under the same conditions of intermittent testicular insulation. In Figure 3B, obtained on the last day of the insulation, there was a marked change in the thermal image of the testicles, mainly in the most proximal region of the scrotum, with a predominance of red and white in the background. This change in the thermogram is interpreted by the significant increase ( $p < 0.05$ ) in testicular temperature in the proximal region (34.58 °C), medial (34.49 °C), and distal (33.75 °C), as shown in Table 1.

It can be seen in Figure 3B that the testicles appear more bulky and in a lower and pendulous position than in Figure 3A, a consequence of the increase in testicular volume due to higher scrotal blood circulation with hyperemia, edema, and descent of the testicle due to relaxation of the cremaster muscle, bringing the testicles closer to the ground in an attempt to mitigate the thermal stress caused by thermal insult (Rocha et al., 2015; Viana, 2018). This shows that during the insulation process, there was severe impairment of testicular thermoregulation when compared to normality, as shown in Figure 3A.

Figure 3C shows the testicular thermogram immediately after the insulation; the red color is less intense in the presence of yellowish areas below the medial region, in which temperatures were below the during phase and similar to those of the early phase postinsulation (Figure 3A), thus revealing a cooling of the testicles, relieving the insult by intermittent insulation, as shown in Table 1 (proximal 34.58 °C, medial 31.68 °C, and distal 30.44 °C).

Figure 3D represents an image obtained in the later phase after insulation, and shows a different thermogram of 3C, with three distinct color regions: proximal in white (33 °C), medial in red (32 °C), and distal in yellow (31.8 °C), approaching the normal temperature shown in thermogram 3A, in which the testicles are healthy.

Figure 4 represents the mean testicular (graph A) and TR (graph B). It was observed that the evolution of the average testicular temperature increased significantly ( $p < 0.05$ ) at the time of insulation, with values above 34°C, that is, on average 2°C above the temperature of the phases before and after the insulation, interfering with the normal functioning of the testis and epididymis, resulting in a decrease in sperm quality at the phase after insulation (Figure 5). TR was not influenced by the insulation process and remained constant within the normal range in all phases of the study. These results are similar to those found by Braz et al. (2019), who used buck-insulated testicles.

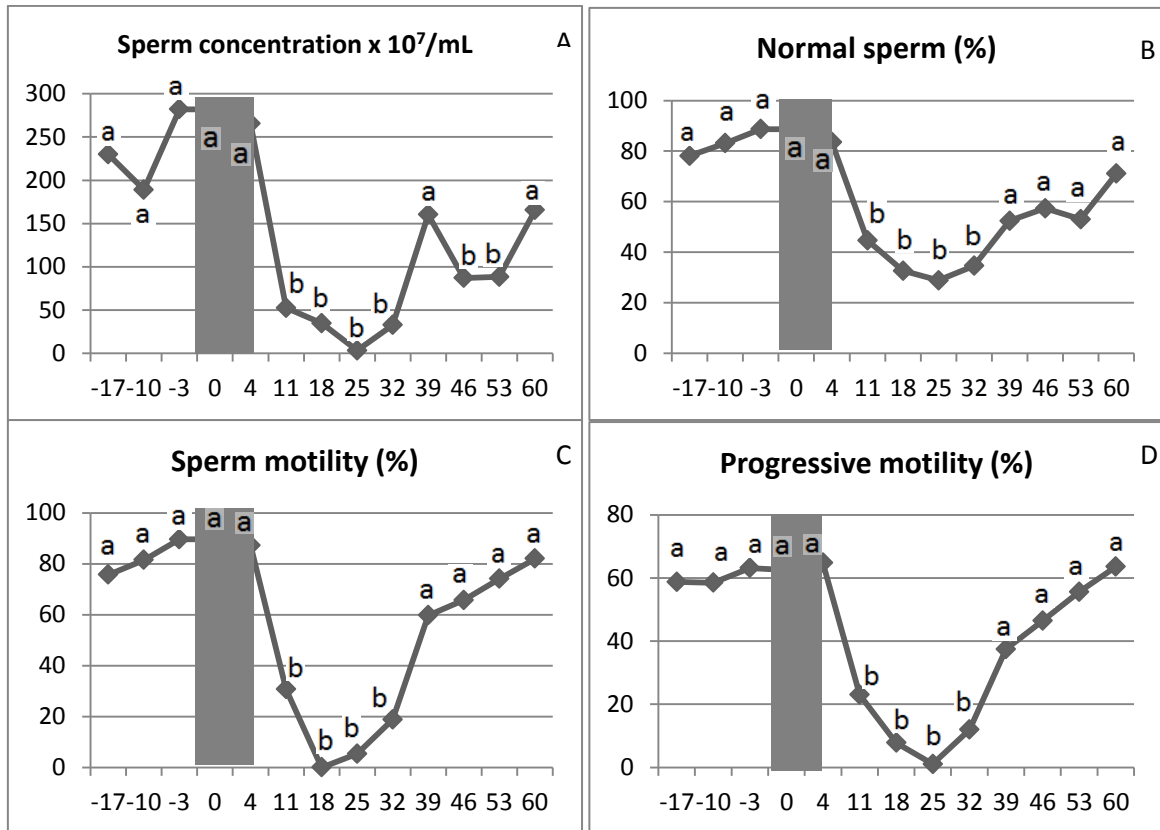


**Figure 4.** Graphs showing the evolution of average testicular temperature and rectal temperature over the days of the experiment.

Different lowercase letters indicate a statistically significant difference in the Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

According to Gabaldi and Wolf (2002), spermatogenesis occurs adequately at a temperature of 2–6 °C below body temperature, which remains constant within the normal range for goats, 38–39.5 (Salles et al., 2009). As there were no significant changes in TR during insulation, there was no influence of body temperature on the testicles or of the insulated testicle on the TR, corroborating the findings of Moreira et al. (2001), Rocha et al. (2015) and Viana (2018).

Analyzing the average testicular temperatures shown in Table 1, a significant increase ( $p < 0.05$ ) was observed during the insulation (D1 to D4) in relation to the phases before and after insulation, regardless of the position of the testicle (right or left) or the evaluated areas (proximal, medial, and distal). In addition, within each phase, comparing the areas assessed between the right and left testicles, there was no significant difference between the contralateral testicular areas. However, the analysis between the areas evaluated within each phase revealed a significant difference between the areas in each testis, with a significant reduction in the temperatures of the medial and distal areas in relation to the proximal, except during insulation, when the temperatures were similar in the proximal and medial areas and significantly lower in the distal areas (approximately 1°C lower,  $p < 0.05$ ).



**Figure 5.** Seminal variables monitored during the 60 days of experimentation. The gray stripe indicates the during insolation phase, when intermittent testicular insolation occurred. Different lowercase letters indicate a significant difference in the Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

All seminal parameters showed changes throughout the experiment, with a significant decrease from D11 to D32, considered the earliest time of the postinsulation period, significantly increasing from D39 until the 60th day, except for sperm concentration, which decreased significantly ( $p < 0.05$ ) between days 46 and 53 (later phase) and returned to normal on day 60 (Figure 5). Associating the thermograms with the seminal analyses at each phase, it was observed that before insolation (Figure 3A), the seminal parameters of sperm kinetics (percentage of mobile sperm and progressive motility), concentration, and percentage of normal sperm were within normal limits, following the recommendations of CBRA (2013). Day 4 (Figure 3B) represents the last day of insolation with removal of the insult, and the values, still within the normal range, can be explained by the maintenance of a viable sperm reserve in the tail of the epididymis, a result in accordance with those found by Moreira et al. (2001), Santos and Simplicio (2000), and Rocha et al. (2015).

The early phase thermogram (3C) corresponds to days D11, D18, D25, and D32 and refers to the period in which there was a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in seminal characteristics in relation to the before insolation phase. These values of motility, concentration, and percentage of sperm represent a severe progressive degeneration, since at the 25th day after insolation, their values reached zero. In the thermogram presented at this phase (Figure 3C), the testicles are predominantly red in color, indicating high heat emission and increased temperature in all regions of the organ (Table 1).

The reduction in the percentage of sperm motility (Figures 5C and 5D) can be explained by changes occurring in sperm cells during epididymal maturation (Hafez & Hafez, 2004; Jones & Dacheux, 2007; Vieira, 2017), since the thermal impact of the insulation during this period compromised sperm morphology by increasing the number of sperm defects (Moreira et al., 2001).

Figure 3D, equivalent to the later (postinsulation) phase (days 39 to 60), shows a quite different thermal image and is more heterogeneous than the previous (3C), approaching the thermogram (3A) just before insulation. The spermogram showed a rapid recovery of motility, sperm concentration, and a significant increase in the percentage of normal sperm cells, reaching values close to the phase before insulation with healthy testicles, but with mild signs of testicular degeneration that had not yet returned to normal concentration values and motility, as advocated by the CBRA (2013).

The early return of motility close to normal was probably due to the possibility that the thermal impact of the insulation was harmful only to sperm cells that were in the final stage of testicular spermatogenesis during the insulation phase (Moreira et al., 2001; Viana, 2018), besides the sperm selection performed by the epididymis, removing defective cells (Jones & Dacheux, 2007).

In general, the seminal parameters evaluated in the present study showed statistically significant differences in the second week after intermittent testicular insulation, showing a reduction in the quality of the ejaculates. However, most of them returned to normal condition after 4 weeks. This period was shorter than necessary to return to normal condition in bulls (Perumal, 2018) and rams subjected to full-time insulation (Moreira et al., 2001) or intermittent insulation (Viana, 2018) of the testes.

However, the values found are similar to those already obtained in goats (Oyeyemi, Adeniji, & Olugbemi, 2011; Santos & Simplicio, 2000), differing only in the early return to an almost normal condition justified by the intermittent insulation carried out here. This suggests that goats may have a greater tolerance to testicular thermal stress than sheep, considering that there may be an influence of the genotype even among breeds within the same species (Moura et al., 2019). However, additional studies need to be carried out on this subject, since the return to normality in bucks would require more observation time than used in this study.

In the present work, the analysis of thermograms (Figure 3 [A, B, C, and D]) at each phase shows different thermal images, allowing the identification of the condition of a healthy testicle (Figure 3A), in degeneration (Figure 3B), and finally, returning to an almost normal condition (Figures 3C and 3D). This shows a clinical analysis of abnormal physiological processes, since the thermogram allows a thermal description to identify sites with vascular changes. This technique becomes important because it does not require tactile manipulation, is not invasive, and does not cause unnecessary pain and suffering. Future studies on the use of thermography in the domain of veterinary andrology and adoption as a useful tool for farm veterinarians are warranted.



## Conclusion

TIV, using thermogram analysis of intermittently insulated testicles associated with seminal analysis, allowed us to establish pattern images to differentiate the thermal normality from changes that may occur at various areas of the organ, thus constituting an auxiliary tool for the diagnosis of various degenerations that compromise seminal quality.

## References

- Alves, M. B. R., Andrade, A. F. C. de, Arruda, R. P. de, Batissaco, L., Florez-Rodriguez, S. A., Oliveira, B. M. M. de, ... Vellone, V. S. (2016). Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. *Theriogenology*, 86(3), 795-805. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.034
- Barca, F. A. B., Jr., Koetz, C. K., Jr., Cruz Fávoro, P. da, Pereira, G. R., Menegassi, S. R. O., Morotti, F., ... Seneda, M. M. (2020). Infrared thermography and Doppler ultrasonography to evaluate the effects of scrotal insulation on testicular blood flow dynamics in bulls. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(4), 1267-1278. doi: 10.5433/1679-0359.2020v41n4p1267
- Braz, K. M. G., Ferreira, C. S., Ghirelli, C. O., Bosco, K. A., Flávio, N., Nascimento, D. C., ... Crespilho, A. M. (2019). Influência da bipartição escrotal sobre a capacidade de termorregulação e hemodinâmica testicular em caprinos. *Veterinária e Zootecnia*, 26, 1-10. Recuperado de <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/169/103>
- Blazquez, N. B., Long, S. E., Mayhew, T. M., Perry, G. C., Prescott, N. J., & Wathes, C. (1994). Rate of discharge and morphology of sweat glands in the perineal, lumbodorsal and scrotal skin of cattle. *Research in Veterinary Science*, 57(3), 277-284. doi: 10.1016/0034-5288(94)90118-X
- Cavalcante, J. M. M., Brasil, O. O., Oliveira, R. V. de, Pessoa, A. W. P., Araújo, A. A. de, & Nunes, J. F. (2014a). Ultrassonografia testicular em caprino com degeneração testicular associado a lesões escrotais: Relato de caso. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 8(1), 54-72. doi: 10.5935/1981-2965.20140004
- Cavalcante, J. M. M., Brasil, O. O., Salgueiro, C. C. D. M., Salmito-Vanderley, C. S. B., & Nunes, J. F. (2014b). Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). *Ciência Animal Brasileira*, 15(3), 344-353. doi: 10.1590/1809-6891v15i327834
- Chemineau, P., Cognie, Y., & Guerin, Y. (1991). *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (Animal Production and Health Paper, 83).
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal* (3a ed.) Belo Horizonte, MG: CBRA.
- Gabaldi, S. H., & Wolf, A. (2002). Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. *Ciências Agrárias*, 2(2), 66-70. Recuperado de [http://www.fea.br/Arquivos/Revistas%20Cientificas/Revista\\_Vol2\\_N2\\_2002/Vol2\\_N2\\_2002.pdf](http://www.fea.br/Arquivos/Revistas%20Cientificas/Revista_Vol2_N2_2002/Vol2_N2_2002.pdf)
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2004). *Reprodução Animal*. Barueri, SP: Manole.
- Jones, R. C., & Dacheux, J. L. (2007). Physiology of the epididymis. In KANDEEL, F. R. *Male reproductive dysfunction: pathophysiology and treatment* (pp. 71-76). Nova York, NY: Informa

Healthcare.

- Kahwage, P. R., Esteves, S. N., Jacinto, M. A. C., Barioni, W.B., Jr., Pezzopane, J. R. M., Pantoja, M. H. A.,... Garcia, A. R. (2017). High systemic and testicular thermolytic efficiency during heat tolerance test reflects better semen quality in rams of tropical breeds. *International Journal of Biometeorology*, *61*(10), 1819-1829. doi: 10.1007/s00484-017-1367-4
- Kastelic, J. P., Coulter, G. H., & Cook, R. B. (1995). Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology*, *44*(1), 147-152. doi: 10.1016/0093-691X(95)00155-2
- Medeiros, A. A., Araujo, A. A., Moura, A. A. A., Cavalcante, J. M. M., Figueiredo, E. L., & Rodrigues, L. F. S. (2011). Utilização do azul de bromofenol conservado a 4°C e 29°C, como método de coloração vital para avaliação do espermatozoide ovino. *Ciências Agrárias*, *46*(1), 287-297. Recuperado de <http://ajaes.ufra.edu.br/index.php/ajaes/article/view/273/171>
- Moreira, E. P., Moura, A. A. A. N., & Araújo, A. A. (2001). Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *30*(6), 1704-1711. doi: 10.1590/S1516-35982001000700007
- Moura, A. B. B., Brandão, F. Z., Esteves, S. N., Souza, G. N. de, Fonseca, J. F. da, Pantoja, M. H. A.,... Garcia, A. R. (2019). Differences in the thermal sensitivity and seminal quality of distinct ovine genotypes raised in tropical conditions. *Theriogenology*, *123*, 123-131. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.037
- National Research Council (2007). *Committee on the nutrient requirements of small ruminants, board on agriculture, natural resources, division on earth, & life studies. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*. Washington, DC: National Academy Press.
- Oyeyemi, M. O., Adeniji, D. A., & Olugbemi, J. B. (2011). The spermogram of mesterolone treated west African dwarf bucks with testicular degeneration. *Nigerian Veterinary Journal*, *32*(1) 54-59. doi: 10.4314/nvj.v32i1.68993
- Perumal, P. (2018). Effect of scrotal insulation on semen quality profiles in mithun. *International Journal of Bioresource and Stress Management*, *9*(6), 723-728. doi: 10.23910/ijbsm/2018.9.6.1926b
- Rocha, D. R., Martins, J. A. M., Van Tilburg, M. F., Oliveira, R. V., Moreno, F. B., Monteiro-Moreira, A. C.,... Moura, A. A. (2015). Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. *Theriogenology*, *84*(8), 1291-1305. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.008
- Rodrigues, I. C. S. (2016). *Tolerância ao calor de ovinos lanados e deslanados criados em região semiárida do vale do São Francisco, Petrolina-Pe*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE: Brasil. Recuperado de [http://www.uece.br/ppgcwvp/wp-content/uploads/sites/6/2019/08/IntiRodrigues\\_Disserta%20C3%A7%C3%A3o.pdf](http://www.uece.br/ppgcwvp/wp-content/uploads/sites/6/2019/08/IntiRodrigues_Disserta%20C3%A7%C3%A3o.pdf)
- Rodrigues, L. F. S. (1997). *Efeito do método de colheita sobre os aspectos físicos, morfológicos e bioquímicos do sêmen de caprinos mestiços e ovinos deslanados da raça Santa Inês criados no estado do Ceará*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.
- Romanello, N., Lourenço, J. B. L., Jr., Barioni, W. B., Jr., Brandão, F. Z., Marcondes, C. R.,

- Pezzopane, J. R. M.,... Garcia, A. R. (2018). Thermoregulatory responses and reproductive traits in composite beef bulls raised in a tropical climate Narian. *International Journal of Biometeorology*, 62(9), 1575-1586. doi: 10.1007/s00484-018-1557-8
- Salles, M. G. F., Souza, C. E. A., Rondina, D., Moura, A. A. A., & Araujo, A. A. (2009). Respostas fisiológicas ao estresse térmico de bodes Saanen em clima tropical. *Ciência Animal*, 19(1), 19-28. Recuperado de <http://www.uece.br/cienciaanimal/>
- Santos, D. O., & Simplicio, A. A. (2000). Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(9), 1835-1841. Recuperado de [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2000000900016&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2000000900016&script=sci_arttext)
- Souza, P. T., Salles, M. G. F., Costa, A. N. L., Carneiro, H. A.V., Souza, L. P., Rondina, D., & Araujo, A. A. (2014). Physiological and production response of dairy goats bred in a tropical climate. *International Journal of Biometeorology*, 58(7), 1559-1567. doi: 10.1007/s00484-013-0760-x
- Thom, E.C. (1959) The discomfort index. *Weatherwise*, 60, 12-57.
- Viana, A. M., Neto. (2018). *Parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de carneiros morada nova submetidos a insulação escrotal intermitente*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. Recuperado de [http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/31436/3/2018\\_tese\\_amvneto.pdf](http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/31436/3/2018_tese_amvneto.pdf)
- Vieira, M. F., Neto. (2017). *Efeito da Flunixin Meglumine na atividade espermática de machos ovinos e caprinos*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. Recuperado de [http://www.uece.br/ppgcwvp/wp-content/uploads/sites/6/2019/08/MauricioVieira\\_Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf](http://www.uece.br/ppgcwvp/wp-content/uploads/sites/6/2019/08/MauricioVieira_Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf)
- Vieira, M. F., Neto, Rodrigues, I. C. S., Silva Leles, J. da, Araújo, É. P. de, Viana, A. M. V., Neto, Carvalho, F. V.,... Araújo, A. A. (2017). Effect of Flunixin Meglumine administration on seminal characteristics of male sheep and goat. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(5), 3145-3154. doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n5p3145
- Yadav, S. K., Singh, P., Kumar, P., Singh, S. V., Singh, A., & Kumar, S. (2019). Scrotal infrared thermography and testicular biometry: indicator of semen quality in Murrah buffalo bulls. *Animal Reproduction Science*, 209, 106145. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106145

## **8 CAPÍTULO 3 - ARTIGO TÉCNICO**

**ESTUDO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR INSULAÇÃO ESCROTAL INTERMITENTE E CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS TESTICULARES, SEMINAIS E HORMONAL DE BODES, EM CLIMA TROPICAL SEMIÚMIDO.**

Periódico de submissão: Ciência Rural

Qualis (CAPES): B1

**Estudo da degeneração testicular induzida por insulação escrotal intermitente e correlações entre os parâmetros testiculares, seminiais e hormonal de bodes, em clima tropical semiúmido.**

**Study of testicular degeneration induced by intermittent scrotal insulation and correlations between testicular, seminal and hormonal parameters of goats in a semi-humid tropical climate**

Maurício Francisco Vieira Neto<sup>1\*</sup>; Gorete Flores Salles<sup>2</sup>; Antônio Néilson Lima da Costa<sup>3</sup>; Aderson Martins Viana Neto<sup>4</sup>; Isaac Neto Goes da Silva<sup>4</sup>; Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos<sup>4</sup>; David Ramos da Rocha<sup>5</sup>; Caio Vitor Oliveira Silva<sup>4</sup>; Airton Alencar de Araújo<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. <sup>2</sup>Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção, CE, Brazil. <sup>3</sup>Universidade Federal do Cariri (UFCA), Crato, CE, Brazil. <sup>4</sup>Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil. <sup>5</sup>Universidade Federal do Vale do Rio São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE, Brazil. CORRESPONDÊNCIA: M. F. VIEIRA-NETO [mauricio.macejo@hotmail.com] – Tel. (88) 9.9636-6251. Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Munguba n. 1700. Campus do Itaperi. CEP 60.714.903 Fortaleza, CE, Brazil

## **RESUMO**

Com o objetivo de estudar o processo de degeneração testicular, 10 bodes mestiços tiveram os testículos insulados de forma intermitente das 18h00 às 06h00 do dia seguinte, durante quatro dias. Foram coletados ejaculados antes e pós insulação e avaliados a temperatura superficial do escroto e as variáveis de cinética espermática: Motilidade Massal por microscopia óptica, percentual de espermatozoides móveis, velocidade curvilínea (VCL) e retilinearidade (STR) por programa computadorizado (CASA). Avaliou-se, além disso, circunferência escrotal (CE), volume seminal, concentração espermática e testosteronemia (por quimioluminescência). As variáveis foram expressas em média e erro-padrão e avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, seguida da análise de variância a 5% de probabilidade e correlações entre as variáveis por correlação simples de Pearson. Houve aumento significativo da temperatura testicular em 2°C ( $p < 0,05$ ), afetando a qualidade seminal entre 11 dias e 32 dias, e a testosteronemia imediatamente após a insulação. Uma recuperação lenta das variáveis de cinética espermática e morfologia espermática ocorreu a partir do dia 39 pós insulação, sem retorno pleno da atividade testicular em relação ao momento antes da insulação, enquanto a concentração sérica de testosterona retornou precoce, mantendo comportamento oscilante. A insulação intermitente permitiu um estudo do processo de degeneração testicular em vários graus de comprometimento do testículo, simulando o insulto testicular em bodes em função das altas temperaturas em clima tropical. Palavras-chave: estresse térmico, reprodução animal, andrologia veterinária, sêmen caprino.

## **ABSTRACT**

In order to study the process of testicular degeneration, 10 crossbred male goats had their testicles intermittently insulated from 6:00 pm to 6:00 am the next day during four days.

Ejaculates were collected before and after insulation and the sperm's surface temperature and sperm kinetics variables were evaluated: Mass Motility by optical microscopy, percentage of mobile sperm, curvilinear velocity (VCL) and rectilinearity (STR) by computer program (CASA). In addition, scrotal circumference (EC), seminal volume, sperm concentration and testosterone (by chemiluminescence) were evaluated. The variables were expressed as mean and standard error and assessed for normality by the Shapiro-Wilk test, followed by analysis of variance at 5% probability and the correlations between the variables by Pearson's simple correlation. After insulation, there was a significant increase in testicular temperature by 2 °C ( $p < 0.05$ ) immediately affecting seminal quality between 11 days and 32 days and testosterone. A slow recovery of the sperm kinetics and sperm morphology variables occurred from day 39 post-insulation, with no full return of testicular activity in relation to the moment before insulation, while the serum testosterone concentration returned early, maintaining oscillating behavior. Intermittent insulation allowed a study of the process of testicular degeneration in varying degrees of testicular impairment, simulating testicular insult in goats due to the high temperatures in tropical climate.

Keywords: heat stress, animal reproduction, veterinary andrology, goat semen.

## **INTRODUÇÃO:**

A reprodução animal depende da eficiência reprodutiva de ambos os progenitores, assim, machos e fêmeas devem estar saudáveis e com bom escore corporal para que se atinjam índices zootécnicos satisfatórios nos rebanhos (SOUZA et al., 2014).

Em machos reprodutores, um dos principais limitantes à vida útil reprodutiva é a degeneração testicular (CAVALCANTE et al., 2014; SALLES et al., 2020), um processo multifatorial de origem natural ou provocada, que ocasiona menor qualidade seminal e maior

número de serviços de cobertura para que se obtenha uma prenhez (KASTELIC & THUNDEARTHIL, 2008).

Das causas conhecidas de degeneração testicular, a idade avançada (VIEIRA-NETO et al., 2017) a nutrição (MASATAKA et al., 2013) processos infecciosos (KUMI-DIAKA & NJOKU, 1980) e o estresse térmico (SALLES et al., 2009; GARCIA, 2017) são frequentemente evidenciados em condições de criação a campo e em regimes confinados, sendo este fenômeno bastante comum em instalações inadequadas e em animais importados de regiões de clima temperado, quando submetidos ao tropical ou subtropical. (SALLES et al., 2020).

Para que a espermatogênese ocorra normalmente em mamíferos, é necessário que o testículo mantenha sua temperatura entre 2 e 4°C abaixo da temperatura corporal, e isto depende da termorregulação exercida pela ação do escroto e estruturas como o músculo cremáster e vasos sanguíneos (THIBAUT & LEVASSEUR, 2001). Quando estes mecanismos se exaurem, devido à temperatura ambiente elevada, a degeneração testicular pode ocorrer, provocando diminuição da qualidade do sêmen (KASTELIC & THUNDEARTHIL, 2008).

No intuito de melhor conhecer a ocorrência e as consequências da degeneração testicular por estresse calórico, diversos estudos tem sido feitos com machos ovinos e caprinos, com os quais já foram testadas desde a introdução dos animais em câmaras térmicas (ARMENGOL et al., 2015) até a adição de bolsas térmicas, que interfiram na termorregulação testicular (ALVES et al., 2016; BRAZ et al., 2019).

Este último método, denominado insulação escrotal, já foi utilizado em machos ruminantes ovinos (ALVES et al., 2016; KAHWAGE et al., 2017), bovinos (ROMANELLO et al., 2018; BARCA et al., 2020), bubalinos (YADAV et al., 2019) e caprinos (BRAZ et al., 2019) de forma ininterrupta e intermitente em ovinos (VIANA-NETO, 2018), onde o insulto



escrotal foi realizado somente a noite, mitigando os efeitos do calor e ocorrência de degeneração testicular severa como na insulação ininterrupta, permitindo assim degeneração similar à que ocorre na degeneração por temperaturas ambiente elevadas.

Independente de uma ocorrência natural ou induzida, as consequências dos diferentes graus de degeneração testicular estão associadas à redução da qualidade seminal e potencial fecundante, tanto em ovinos (ROCHA et al., 2015; VIEIRA-NETO et al., 2017), quanto caprinos (SALLES et al., 2009; VIEIRA-NETO et al., 2017). E, em graus severos desta patologia, espera-se que ocorra uma redução da produção de testosterona pelas células intersticiais testiculares, o que acarreta menor libido e alterações comportamentais indesejáveis ao reprodutor (CAMARA et al., 2016, SOUZA et al., 2010; BLANCHARD et al., 2000).

Assim, o objetivo do presente estudo foi estudar as alterações na qualidade seminal, circunferência escrotal e concentração sérica de testosterona de machos caprinos submetidos à insulação testicular intermitente para avaliação da degeneração testicular, simulando uma condição próxima ao insulto provocado por temperatura ambiente em clima tropical.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais em pesquisa da Universidade Estadual do Ceará (UECE), sob protocolo número 4565073/2018, e foi realizado de agosto a dezembro de 2018.

### *Local de execução do experimento*

A pesquisa foi realizada no setor experimental de ovinocaprinocultura do programa de pós-graduação em ciências veterinárias (PPGCV) da UECE, sendo as análises realizadas nos

laboratórios do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) e no Laboratório Vettings, todos pertencentes ao campus do Itaperi, na Cidade de Fortaleza, localizada a 3°47'37" S e Longitude 38°33'30"W, com altitude de 26,0 metros em relação ao nível do mar. O clima local é tipo AW (tropical semiúmido), segundo Köppen-Geiger, com temperatura ambiente média variando entre 26 e 28 °C e pluviosidade anual média de 1448 mm.

#### *Seleção dos animais e condições experimentais*

Foram escolhidos 10 reprodutores caprinos mestiços saudáveis, adultos jovens de 18 meses de idade, sem padrão racial definido (SPRD). A higidez dos animais experimentais foi atestada por exame clínico-andrológico, seguidos de exames laboratoriais complementares (coproparasitológico, hemograma e bioquímica sérica).

Os animais foram confinados individualmente em baias de 3m<sup>2</sup> de área coberta, com acesso a solário, com água de boa qualidade e sal mineral comercial específico para caprinos ad libitum. A dieta foi composta de feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) e ração concentrada balanceada, de maneira que atendesse aos requisitos nutricionais estabelecidos para a espécie pelo NRC (2007).

Após um período de 30 dias de adaptação às instalações, alimentação e ao método de colheita de sêmen por eletroejaculação, os animais foram submetidos às colheitas de sêmen, mensuração da circunferência escrotal e colheita de sangue para a dosagem de testosterona. O método de colheita seminal adotado justificou-se pelo fato do comportamento sexual dos machos ser imprevisível após o processo de insulação testicular (VIANA-NETO, 2018), assegurando, assim, que durante todo o período experimental o sêmen fosse colhido pelo mesmo método, e que atendesse ao critérios do CBRA (2013).

#### *Delineamento experimental*

Inicialmente, ocorreram três episódios de colheitas de amostras de sêmen e sangue de todos os animais: nos dias D-17, D-10 e D-3. Três dias após o D-3, iniciou-se a insulação intermitente (D0) com bolsa térmica de dupla camada de plástico, separada por uma camada de algodão cirúrgico, durante quatro noites consecutivas, segundo o protocolo de Viana-Neto (2018). As bolsas eram colocadas às 18h00 e removidas às 06h00 durante os quatro dias de insulação (D0-D4), conferindo o caráter intermitente ao protocolo adaptado de ROCHA et al. (2015).

As colheitas de sangue e sêmen foram retomadas na manhã do D4, último dia da insulação intermitente, continuando até o D81 após a insulação. Durante o período de insulação (D0 a D4), somente a temperatura superficial do escroto (TSE) e a circunferência escrotal (CE) foram avaliadas.

#### *Temperatura Superficial Média do Escroto*

Nos dias de colheitas de amostras de sêmen e sangue, os animais eram devidamente contidos para aferição da temperatura superficial escrotal com uso de câmera termográfica FLIR (imagens de 640 x 480 pixels e com emissividade calibrada para 0,90) posicionada a um metro do testículo. A temperatura superficial média do escroto foi obtida em três regiões em cada testículo: dorsal, medial e ventral, na região posterior do órgão, similar ao trabalho realizado por ALVES et al. (2016). As imagens obtidas foram avaliadas pelo programa FLIR Quick Report® (FLIR Systems, USA), de maneira que se obtivessem os dados de temperatura nos seis pontos, para posterior obtenção do valor médio de temperatura superficial.

#### *Colheita e processamento de amostras seminais*

Em todos os dias de colheita, inicialmente, foi aferida a circunferência escrotal dos animais, por intermédio de uma fita métrica graduada por milímetro.

O Sêmen foi sempre colhido às 8:00 a.m., utilizando um eletroejaculador automático de 12 V que emitia estímulos entre 200 e 300 mA em intervalos de dois a cinco segundos (CBRA, 2013; VIEIRA-NETO et al., 2017). O ejaculado coletado era imediatamente incubado em banho-maria a 37°C.

A Motilidade Massal foi avaliada por microscopia óptica, uma gota com 10 µL de sêmen em uma lâmina aquecida a 37°C era avaliada (notas de 0 a 5), feita sempre pelo mesmo avaliador com experiência em análise visual (BARIL et al., 1993).

Em seguida com um pipetador calibrado, o volume total de sêmen era mensurado e uma alíquota de 5 µL separada para confeccionar lâminas coradas com igual quantidade de azul de bromofenol, conforme metodologia utilizada por MEDEIROS et al. (2011), para posterior contagem de células normais e anormais, onde as patologias foram categorizadas a partir da contagem de 200 células espermáticas de cada ejaculado, em defeitos maiores e menores, segundo a Classificação de Blom (CBRA, 2013).

Imediatamente após a colheita, a cinética espermática foi avaliada por análise computadorizada (CASA) pelo programa Sperm Class Analyser® (SCA, Microptic S.L, Barcelona, Espanha), segundo metodologia empregada por Cavalcante et al. (2014). Para tanto, uma amostra de 10 µL de sêmen fresco de cada ejaculado era diluída em 1 mL (1:100) de uma solução contendo Água de Coco em Pó (ACP), preparada em água ultrapurificada, segundo as recomendações do fabricante (ACP Biotecnologia®, Fortaleza, Brasil). Dez microlitros desta diluição foram colocados em uma câmara de Makler® (Sefi Medical Instruments LTDA, Haifa, Israel), pré-aquecida a 37° C, para se avaliar as variáveis percentual de espermatozoides Móveis, velocidade curvilínea (VCL) e retilinearidade (STR).

*Colheita e processamento de amostras de sangue*

Para avaliação da dosagem sérica de testosterona foram colhidas quatro amostras de sangue da veia jugular de cada animal nas primeiras horas da manhã (05h30, 06h15, 07h00 e 07h45). A colheita era realizada em tubos Vacutainer® system (BD, USA) de 04 ml, sem anticoagulante, seguida de centrifugação a 2100 g por 15 minutos, conforme Alves et al. (2016), e posterior dosagem de testosterona por quimioluminescência. Esta foi realizada no Laboratório Vettings (UECE), utilizando um kit comercial Immulite® 1000 Systems (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd., Llanberis, Gwynedd, UK).

#### *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas com uso do software SYSTAT (versão 13, EUA). Os dados foram expressos em média e erro padrão e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Aqueles que não apresentaram distribuição normal foram transformados por  $[\log(x + 1)]$ . Os expressos como porcentagens transformados por ACS  $[SQR(\text{parâmetros} / 100)]$ . Em seguida, todos os dados foram avaliados por ANOVA a 5% de probabilidade e, quando foram encontradas diferenças significativas entre dias, foram feitas comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey. As correlações entre a testosterona e os parâmetros seminais (correlação simples de Pearson) foram analisadas segundo a escala de DANCY & REIDY (2005), que as classifica em fraca ( $r = 0,10 - 0,30$ ), moderada ( $r = 0,40 - 0,60$ ) ou forte ( $r = 0,70 - 1$ ).

## **RESULTADOS**

Para descrição didática dos dados, os períodos antes e pós insulação em dias terão a nomenclatura D. Os períodos antes insulação do D-17 ao D-3; período de insulação do D0 a D4 e pós insulação do D11 ao D32 e D39 ao D81 (figura 1).

A circunferência escrotal (figura 1A) não teve alterações significativas após a insulação com valores similares aos de antes da insulação, e somente no D60 houve um

aumento significativo ( $p < 0,05$ ) se mantendo elevada até o final do experimento (D81) com valores significativamente elevados quando comparados aos dias anteriores.

A testosteronemia (figura 1B) apresentou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no último dia de estresse térmico induzido (D4) retornando a valores próximos aos de antes da insulação nos D11, D18 e D25, com elevação não significativa no D32, seguindo aumento significativo nos D60 e D67 e redução significativa no D74 e novamente elevação significativa ( $p < 0,05$ ) no D81 no final do experimento

A Motilidade Massal (figura 1C) apresentou no último dia de insulação (reinício das colheitas) valores semelhantes ao de antes da insulação, seguindo uma redução significativa a partir do D11 ( $p < 0,05$ ) pós insulação, chegando a valores mínimos no D25, com aumento significativo no D53 ( $p < 0,05$ ) retornado a valores próximo à normalidade a partir do dia D67.

Similar a este último, o percentual de espermatozoides móveis apresentou também no D4 valores semelhantes aos de antes da insulação, reduzindo significativamente ( $p < 0,05$ ) no D11, porém com aumento significativo no D39 com elevação continua até o final do experimento D81, retornando aos valores do período antes da insulação (figura 1D).

O volume seminal diminuiu significativamente a partir do D4 (último dia de insulação) e manteve-se reduzido até o dia 46 após insulação e elevou-se significativamente ( $p < 0,05$ ) mais tarde no D74 e D81 com valores próximos aos anteriores à insulação (figura 1E).

A concentração espermática (figura 1F) não se alterou no primeiro dia de coleta após a retirada do insulto (Dia 4), com um decréscimo bem significativo ( $p < 0,05$ ) no dia 11, mantendo-se baixa até o dia D32 e aumentando significativamente no dia 39, com diminuição significativa aos D45 e D53 e aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no D60, se mantendo elevada ao até o final (D81).

A velocidade curvilinear (VCL), assim como a concentração espermática, não diminuiu significativamente no D4, reduzindo significativamente no D11, chegando ao valor mínimo no dia D25 e teve um significativo aumento ( $p < 0,05$ ) no D32 retornando à condição de normalidade no D53 pós insulação com aumento progressivo até o dia D81 Figura 1.

O STR (figura 1), por sua vez, foi a única variável seminal que permaneceu constante até o D11, seguido de redução significativa no intervalo de D18 a D25 ( $p < 0,05$ ), contudo, o retorno à condição de normalidade ocorreu de forma precoce com aumento significativo no D32, mantendo valores normais semelhantes ao período anterior a insulação.

De acordo com a Tabela 1, a TSE aumentou  $2^{\circ}\text{C}$  durante a insulação (D0 a D4) significativamente acima da temperatura antes da insulação ( $p < 0,05$ ) com retorno à normalidade após a retirada do insulto.

As alterações espermáticas (defeitos menores) aumentaram significativamente no período entre D11 e D32, mantendo ainda valores longe da normalidade entre o D39 e D81. Da mesma forma que para os defeitos menores, o percentual de defeitos maiores aumentou de 3,39% para 14% entre o D11 e D32, reduzindo (12,1%), mas para valores ainda distantes da normalidade, no período final do estudo.

O número de espermatozoides ejaculados também apresentou diferença entre períodos, reduzindo ( $p < 0,05$ ) de  $237 \times 10^7$  células antes da insulação, para  $38,09 \times 10^7$  entre D11 e 32, e teve uma significativa recuperação entre D39 e D81, chegando aos  $130 \times 10^7$  espermatozoides, porém um quantitativo ainda distante do valor inicial.

Na tabela 2 estão as correlações entre as variáveis avaliadas, e com base na classificação de Dancy e Reidy (2005), a maioria das correlações, independente de positivas ou negativas, foram fracas com ( $r = 0,10 - 0,30$ ) ou médias ( $r = 0,40 - 0,60$ ). Contudo correlações altas com coeficiente de correlação ( $r$ ) igual ou superior a 70 foram encontradas

entre o percentual de espermatozoides móveis e VCL ( $r=0,81$ ) percentual de móveis e motilidade massal ( $r=0,70$ ) e motilidade massal e concentração espermática ( $r=0,76$ ). Houve, ainda, uma forte correlação negativa ( $r=-0,84$ ) entre o percentual de espermatozoides móveis e o percentual de defeitos de ordem maior (DMAI).

## **DISCUSSÃO**

A maioria dos parâmetros seminais estudados (Figura 1) permaneceu constante na primeira colheita após a insulação intermitente (D4), passando a reduzir significativamente a partir do D11. Situação semelhante foi evidenciada por VIANA-NETO (2018) em carneiros, e é justificado pelo fato de que espermatozoides liberados durante o ejaculado deste dia já estavam armazenados na cauda do epidídimo e não sofreram alterações consideráveis durante seu processo de gênese e maturação (JOHNES & DACHEUX, 2007).

O rápido retorno das variáveis seminais e testiculares a quase total normalidade aos 81 dias, mostra que o método de insulação intermitente não foi tão agressivo quanto os métodos ininterruptos já empregado em carneiros (MOREIRA et al., 2001; ROCHA et al., 2015, ALVES et al., 2016), com retorno da normalidade mais tardia em torno de 90 dias pós insulação. A notória elevação da CE no final do experimento (D74 a D81), pode ser explicada como uma hipertrofia compensatória de recuperação do testículo, uma vez que as variáveis de cinética espermática e testosteronemia acompanharam esta evolução, corroborando com os achados de ROCHA et al., (2015) e VIEIRA-NETO et al. (2017).

Com exceção da CE, as variáveis de cinética espermáticas (percentagem de células, móveis, VCL, STR e MM), volume, testosteronemia e concentração espermática declinaram entre os dias 11 a 25 ou 32 (Figura 1) se elevando a partir dos dias 32 e; 39 até o retorno à



normalidade para maioria das variáveis analisadas com evolução similar à encontrada por VIANA-NETO (2018). Este declínio significativo ( $p < 0,05$ ) de quase todas as variáveis seminais caracteriza uma degeneração severa que compromete a fertilidade, semelhante ao relatado por KASTELIC & THUNDATHIL (2008) em condições naturais de degeneração provocada pelo calor.

Uma vez que os testículos tem a função endócrina de produzir testosterona, a redução da concentração deste hormônio imediatamente após a retirada da bolsa escrotal significa que ocorreu agressão à funcionalidade das células de Leydig (SIBIE et al., 1992; BLANCHARD et al., 2000; HAFEZ & HAFEZ, 2004), contudo, a retomada à condição de normalidade já no D11 sugere que tal agressão ocorreu de forma pontual e reversível, corroborando que o objetivo de causar um dano temporário foi alcançado.

Em adição, o aumento nas taxas obtidas no período de D39 a D81 deve estar associado ao aumento no volume testicular, uma vez que as células intersticiais também podem ter sofrido hipertrofia compensatória (HAFEZ & HAFEZ, 2004), e a irregularidade na curva de evolução do gráfico (D74) pode ser atribuída ao fato de a testosterona apresentar uma secreção pulsátil oscilante, com diversas variações no decorrer do dia (SOUZA et al., 2010; CAMARA et al., 2016) bem como a variação entre animais (SIBIE et al. 1992). A testosterona, apesar de mais instável e de apresentar correlações fracas com as outras variáveis (tabela 2), mostrou, assim mesmo, uma evolução lógica em relação as variáveis seminais e testiculares conforme apresentada na figura 1.

A motilidade massal e o percentual de espermatozoides móveis foram variáveis altamente relacionados à morfologia espermática, sobretudo os defeitos s maiores ( $r = -0,837$ ,

tabela 2). Assim, a redução da qualidade destes parâmetros 11 dias após o início do processo de insulação sugere que ocorreram alterações na morfologia dos espermatozoides durante o período de maturação celular epididimária (JOHNES & DACHEUX, 2007), haja vista que o trânsito espermático epididimário nesta espécie ocorre no decorrer de aproximadamente 13 a 16 dias (DACHEUX et al., 1998).

Correlação alta ( $r=0,701$ , tabela 2) foi encontrada entre a motilidade massa e o percentual de espermatozoides móveis, a primeira avaliada por microscopia ótica e a segunda por análise computadorizada. Estas duas variáveis são consideradas bem relacionadas com a fertilidade, sendo utilizadas para classificação dos ejaculados ovinos, visando inseminação artificial cervical superficial (BARIL et al., 1993). Além disso, a MM também apresentou correlação alta ( $r=0,763$ ) com a concentração e correlações médias negativas com os defeitos maiores e menores com  $r= -0,678$  e  $r= -0,55$  respectivamente, significando existir dependência entre estas variáveis, isto é, relação de causa e efeito, variáveis estas confiáveis para avaliação da qualidade seminal, corroborando com os relatos de BARIL et al., (1993) e ARAÚJO et al. (2012).

Do mesmo modo que no presente estudo, outros experimentos com insulação testicular intermitente revelaram redução de parâmetros de cinética espermática, inicialmente associada ao aumento no número de defeitos de ordem menor (Tabela 01) (CBRA, 2013), que são de origem principalmente epididimária (MOREIRA et al., 2001; ROCHA et al., 2015). Em acréscimo, achados semelhantes foram obtidos por VIANA-NETO (2018), ao realizar protocolo semelhante de insulação testicular intermitente na espécie ovina.

O volume foi o único parâmetro seminal estudado que apresentou redução significativa já na primeira colheita após a insulação intermitente (D4), contudo esta alteração não pode ser atribuída unicamente ao dano direto ao testículo, uma vez que este parâmetro é

dependente da secreção das glândulas acessórias ao trato reprodutivo (VIEIRA-NETO et al., 2017) e sofre influência direta do método de colheita utilizado para a colheita seminal (RODRIGUES, 1997).

VCL consiste na velocidade real do espermatozoide, sendo uma variável altamente relacionada à fertilidade, assim como ao percentual de células móveis (BROEKHUIJSE et al, 2012), o que explica a alta e positiva correlação ( $r=0,81$ ) entre as duas variáveis (tabela 2). Já a STR representa a retilinearidade do espermatozoide e seu percurso, estimando a proximidade do percurso da célula a uma linha reta, a pesar de apresentar correlação média com a VCL (Tabela 2), ela tem importância avaliação da cinética espermática (MATOS et al., 2008), apresentando uma evolução semelhante a VCL (Figuras 1G e 1H).

O aumento significativo na TSE (tabela 1) com mais de  $2^{\circ}\text{C}$  ( $34,5^{\circ}\text{C}$ ) acima da temperatura normal do testículo foi eficiente para causar uma degeneração testicular severa pós insulação (D11 a D32), como mostra as alterações na morfologia espermática e o número de espermatozoides, corroborando com os achados de VIANA-NETO (2018).

Nos momentos pós insulação houve um resfriamento do testículo com redução da TSE para  $31,88^{\circ}\text{C}$  entre D11 a D32 e para  $31,70^{\circ}\text{C}$  entre D39 e D 81, valores esses próximos ao do momento antes da insulação. Este fato foi importante para que não ocorressem alterações irreversíveis na funcionalidade testicular, uma vez que a espermatogênese ocorre em condições ideais entre  $2$  e  $6^{\circ}\text{C}$  abaixo da temperatura corporal (GABALDI & WOLF, 2002).

A elevação do número de células com defeitos maiores e menores (tabela 1) já no início do período pós insulação (D11 e D32) sugere que ocorreram alterações radicais na morfologia espermática durante o trânsito espermático no epidídimo (MOREIRA et al., 2001; KASTELIC et al. 2018), porém no decorrer do período mais tardio (D39 e D81) estas

alterações não diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ), com valores ainda elevados em relação ao momento antes da insulação, revelando, assim, uma recuperação lenta no percentual de espermatozoides anormais.

A lenta recuperação dos defeitos espermáticos pode ser explicada pela duração do ciclo espermático, que no ovino que é 60 dias (THIBAUT & LEVASSEUR, 2001), assim sendo, um tempo longo de recuperação ocorre, sendo justificada pelas alterações sofridas pela célula espermática provavelmente ao final da gametogênese (espermição), que ocorre intratesticular (VIEIRA-NETO et al., 2017; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de espermatozoides entre D11 e D32 (tabela1) sugere uma maior pressão de seleção epididimária, retirando as células defeituosas do sêmen (HAFEZ & HAFEZ, 2004; VIEIRA-NETO et al., 2017; JONES & DACHEUX, 2007). No decorrer do período mais tardio entre D39 e D81, os valores ainda estão fora da normalidade, essa seleção passa a ser menos intensa e o número de espermatozoides ainda é significativamente reduzido em comparação ao momento antes da insulação, o que significa um retorno ainda incompleto da atividade testicular.

## **CONCLUSÃO**

A insulação intermitente foi eficiente para provocar e avaliar em curto tempo um quadro de degeneração testicular severa que ocorre em tempo mais longo em condições naturais de clima tropical. A evolução da qualidade seminal pela análise das variáveis avaliadas pelo CASA e microscopia ótica, possibilitou ter, ao longo do experimento, uma análise de vários graus de degeneração durante recuperação do testículo. Inicialmente uma degeneração testicular severa, seguida de degeneração moderada, quando da recuperação do órgão e degeneração leve no final do experimento, revelando recuperação lenta e ainda incompleta da atividade testicular. O referido modelo experimental pode servir como

referência do grau de degeneração, quando da avaliação de reprodutores caprinos criados em clima tropical.

## **DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSES**

Os autores declaram que não há situação de conflitos de interesse quanto ao protocolo empregado, à pesquisa, autoria e opção de publicação do presente artigo.

## **REFERÊNCIAS**

ALVES, MBR et al. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, n.3, p. 795-805, 2016. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.034.

ARAUJO, AA et al., DACHEUX, J.L, GUERRIN, Y. Insémination Artificielle Ovine. Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine em vue de L'insémination artificielle. In: **Presses Académique Francophones**. Saarbrücken, Deutschland. 2012. ISBN 978-3-8381-7415-0

ARMENGOL, MFL et al. Sperm head ellipticity as a heat stress indicator in Australian Merino rams (*Ovis aries*) in Northern Patagonia, Argentina. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 553-559, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.020>.

BARCA, FAB, JUNIOR et al. Infrared thermography and Doppler ultrasonography to evaluate the effects of scrotal insulation on testicular blood flow dynamics in bulls. *Semina: Ciências Agrárias*, v.41, n.4, p. 1267-1278, 2020. Disponível em <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/issue/archive> >. Acesso em 10 out. 2020. doi: 10.5433/1679-0359.2020v41n4p1267.

BARIL, G et al. **Manuel de formation pour L'Insémination Artificielle Chez Les ovins et Les Caprins**. Rome: Food & Agriculture Organization, 1993. 231 p. ISBN 92-5-202808-0.

BARIL, Gérard. **Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins**. Food & Agriculture Org., 1993.

BRAZ, KMG et al. Influência da bipartição escrotal sobre a capacidade de termorregulação e hemodinâmica testicular em caprinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 26, p. 01-10, 2019. Disponível em: <<https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/169/103>>. Acesso em 01 set. 2020.

BROEKHUIJSE, M L W J et al. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of animal science**, v. 90, n. 3, p. 779-789, 2012.

<https://doi.org/10.2527/jas.2011-4311>

CAMARA, TS et al. Avaliação da capacidade reprodutiva de caprinos tratados com testosterona bioidêntica por via transdérmica. **Ciência Animal**, v. 26, n. 3, p. 03-15, 2016. Disponível em: <[http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/V26n3\\_p03a15RCA.pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/V26n3_p03a15RCA.pdf)>. Acesso em 05 Jul. 2020.

CAVALCANTE, JMM et al. Ultrassonografia testicular em caprino com degeneração testicular associado a lesões escrotais: Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 1, p. 54-72, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140004>.

DACHEUX, JL et al. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. **Journal of reproduction and fertility-supplement**, v. 53 p. 99-107, 1998. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Jean-Luc\\_Gatti/publication/12669825\\_Role\\_of\\_epididymal\\_secretory\\_proteins\\_in\\_sperm\\_maturati on\\_with\\_particular\\_reference\\_to\\_the\\_boar/links/5735e19408aea45ee83ca269/Role-of-](https://www.researchgate.net/profile/Jean-Luc_Gatti/publication/12669825_Role_of_epididymal_secretory_proteins_in_sperm_maturati on_with_particular_reference_to_the_boar/links/5735e19408aea45ee83ca269/Role-of-)

epididymal-secretory-proteins-in-sperm-maturation-with-particular-reference-to-the-boar.pdf>. Acesso em 05 Out. 2020.

GABALDI, SH; WOLF, A. Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias**, v. 2, n. 2, p 66-70, 2002.

JONES, CR; DACHEUX, JL. Physiology of the epididymis. In: KANDEEL, F.R. **Male reproductive dysfunction pathophysiology and treatment**. New York, London: Informa Health Care, 2007, p. 71-80, 2007.

KAHWAGE, PR et al. High systemic and testicular thermolytic efficiency during heat tolerance test reflects better semen quality in rams of tropical breeds. **International Journal of Biometeorology**, v. 61, n. 10, p. 1819-1829, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00484-017-1367-4>.

Kastelic, JP et al. Review: Testicular vascular cone development and its association with scrotal thermoregulation, semen quality and sperm production in bulls. **Animal**, v. 12, n. 1, p. 133-141, 2018. Disponível em: < <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/34D7AC253D367A1DBB81DCB9E791EA2C/S1751731118001167a.pdf>> Acesso em 28 out. 2020. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001167>

KASTELIC, JP; THUNDATHIL, JC. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in domestic animals**, v. 43, p. 368-73, 2008. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01186.x

KUMI-DIAKA, J; NJOKU, CO. Effect of scrotal streptothricosis on spermatogenesis in the bull. **Veterinary Record**, v.107, n. 23, p.525-527, 1980.

MOREIRA, EP et al. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1704-1711, 2001. Disponível em <[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-35982001000700007&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-35982001000700007&script=sci_arttext)>. Acesso em: 05 jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982001000700007>

NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. **National Academy Press**, Washington, DC, 2007, 362 p.

ROCHA, DR et al. Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. **Theriogenology**, v. 84, n. 8, p. 1291-1305, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X15003507>>. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.008>

RODRIGUES, ICS. **Tolerância ao calor de ovinos lanados e deslanados criados em região semiárida do vale do São Francisco, Petrolina-Pe**. 2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária do Ceará.

RODRIGUES, LFS. **Efeito do método de colheita sobre os aspectos físicos, morfológicos e bioquímicos do sêmen de caprinos mestiços e ovinos deslanados da raça Santa Inês criados no estado do Ceará**. 1997. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará.

ROMANELLO, N., JUNIOR et al. Thermoregulatory responses and reproductive traits in composite beef bulls raised in a tropical climate Narian. **International Journal of Biometeorology**, v. 62, n. 9, p. 1575–1586, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1557-8>

SOUZA, CE et al Reproductive Development of Santa Inês Rams During the First Year of Life: Body and Testis Growth, Testosterone Concentrations, Sperm Parameters, Age at



Puberty and Seminal Plasma Proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n.4, p. 644-653, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01322.x>

SOUZA, PT et al. Impacto do estresse térmico sobre a fisiologia, reprodução e produção de caprinos. *Ciência Rural* (UFSM. Impresso) v. 42, n. 10, p. 1888-1895, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/cr/v42n10/a27212cr4719.pdf>>. Acesso em 04 ago. 2020, <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000072>

SOUZA, PT et al. Physiological and production response of dairy goats bred in a tropical climate. *International Journal of Biometeorology*, v. 58, n. 7. 17, p. 1559-1567, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00484-013-0760-x>

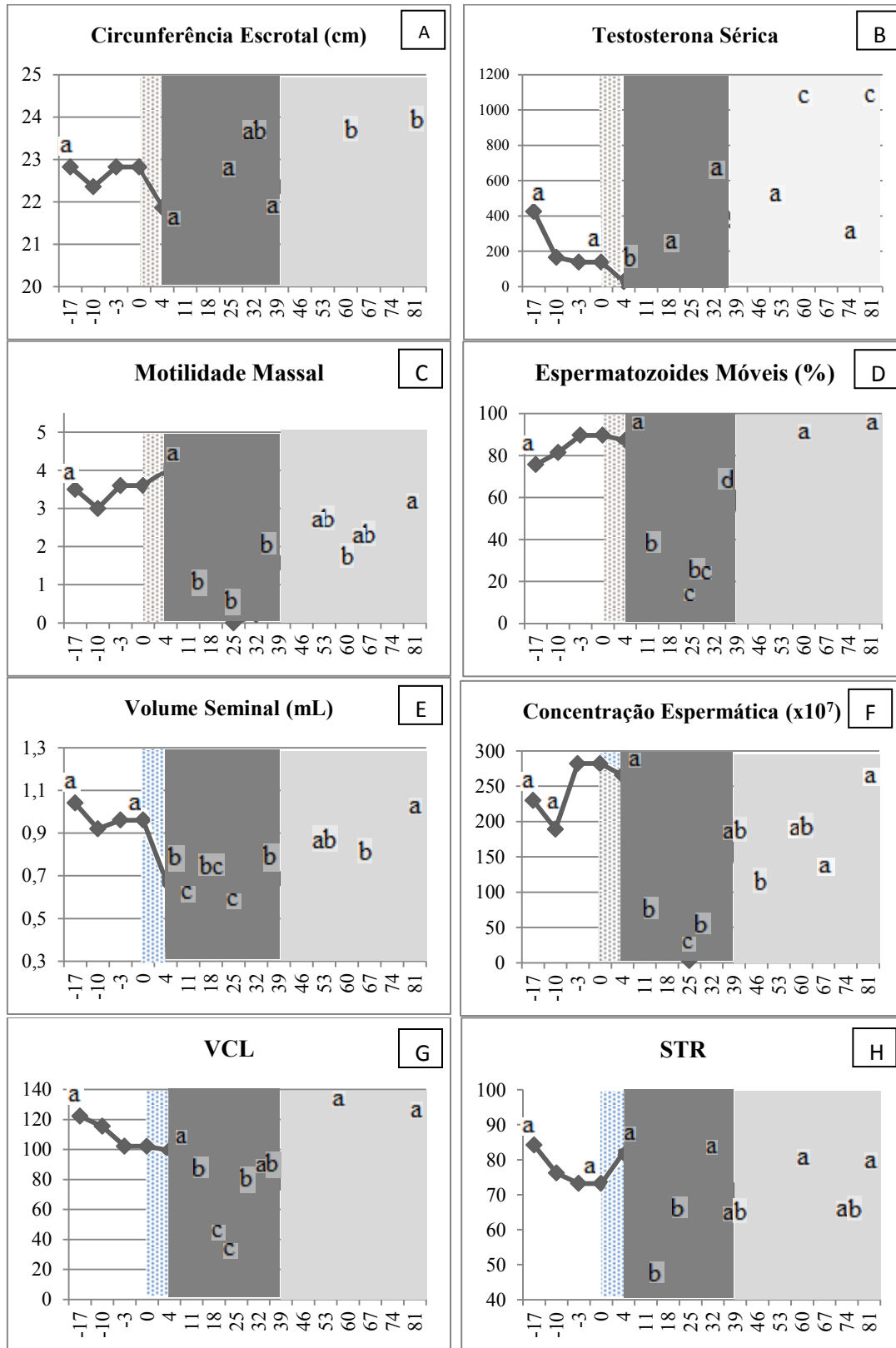
THIBAUT, C; LEVASSEIR, MC. *La Reproduction Chez Les Mammifères et L'Homme*. INRA/Ellipses Editons Marketing. Paris ISBN 2-7298-0417-X. 2001, 927p.

VIANA-NETO, A. M. **Parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de carneiros morada nova submetidos a insulação escrotal intermitente**. 2018. 89f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará.

VIEIRA-NETO, MF, et al. Effect of Flunixin Meglumine administration on seminal characteristics of male sheep and goat. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 5, p. 3145-3154, 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445753229026.pdf> Acesso em: 02 out. 2020. doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n5p3145

YADAV, SK et al. Scrotal infrared thermography and testicular biometry: Indicator of semen quality in Murrah buffalo bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 209,106145, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106145>

Figura 1. Gráficos com o comportamento dos dados analisados durante o experimento.



A tarja branca indica o período antes da insulação (D-17 a D-3), pontilhada indica o período de insulação testicular (D0 a D4), as tarjas cinzas escura e clara representam períodos pós insulação (D11 a D81). Letras maiúsculas indicam o número da figura e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ .

Tabela 1. Temperatura Superficial do Escroto e Alterações espermáticas, em diferentes momentos, de bodes com testículos insulados.

Dias (D)	TSE	Def. Menores	Def. Maiores	Nº SPTZ
17 a -3	31,97±0,26 <sup>a</sup>	12,72±1,10 <sup>a</sup>	3,39±0,46 <sup>a</sup>	237,59±30,91 <sup>a</sup>
0 a 4	34,27±0,23 <sup>b</sup>	--	--	--
11 a 32	31,88±0,22 <sup>a</sup>	43,18±3,5 <sup>b</sup>	14,82±1,18 <sup>b</sup>	38,09±10,51 <sup>b</sup>
39 a 81	31,70±0,12 <sup>a</sup>	27,33±1,4 <sup>c</sup>	12,12±0,61 <sup>c</sup>	130,40±12,91 <sup>c</sup>

Temperatura da Superfície Escrotal (TSE); Percentual de Defeitos Menores (Def. Menores); Percentual de Defeitos Maiores (Def. Maiores); Número de Espermatozoides (Nº SPTZ). Letras diferentes numa mesma coluna indicam diferença  $p < 0,05$ .

Tabela 2. Correlações entre a testosteronemia, volume e temperatura escrotal e características espermáticas de bodes submetidos a insulação testicular intermitente em clima tropical.

Variável	TSE	TEST.	VOL.	% MOVEIS	VCL	STR	DMEN	DMAI	CONC	MM
TSE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEST.	-0,210	1	-	-	-	-	-	-	-	-
VOL.	-0,114	0,117	1	-	-	-	-	-	-	-
% MOVEIS	-0,039	0,148	0,535	1	-	-	-	-	-	-
VCL	-0,100	0,213	0,436	<b>0,812</b>	1	-	-	-	-	-
STR	0,024	0,020	-0,056	0,312	0,457	1	-	-	-	-
DMEN	0,031	0,020	-0,370	-0,596	-0,400	-0,002	1	-	-	-
DMAI	-0,027	-0,008	-0,420	<b>-0,837</b>	<b>-0,699</b>	-0,369	0,633	1	-	-
CONC	0,076	-0,022	0,441	0,600	0,423	-0,018	-0,468	-0,499	1	-
MM	0,117	-0,096	0,413	<b>0,701</b>	0,510	0,140	-0,577	<b>-0,678</b>	<b>0,763</b>	1

Variáveis TSE (Temperatura Superficial Escrotal), TEST (Concentração Sérica de Testosterona), VOL (Volume), Percentual de Espermatozoides Móveis, VCL (Velocidade Curvilínea), STR (Índice de Retilinearidade), DMEN (Defeitos Espermáticos), DMAI (Defeitos Maiores), Concentração e MM (Motilidade Massal), com nível de significância  $p < 0,05$ . As correlações foram todas significativas com  $p < 0,01$  pelo teste de Bonferroni do programa Systat (USA).

## **6 CONCLUSÕES**

A insulação testicular intermitente ocasionou danos testiculares, seminiais e hormonal severos, porém com reversão mais precoce em relação àqueles que são apresentados nos protocolos de estresse térmico ininterrupto. Os termogramas obtidos durante o experimento e seus momentos possibilitaram traçar um paralelo entre a imagem termal obtida e os parâmetros seminiais reais, sugerindo que o método pode ser útil no monitoramento da degeneração testicular, além de ser uma ferramenta não invasiva, podendo ser utilizada sem contato direto com o macho caprino.

## 7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o protocolo de insulação testicular intermitente pode ser utilizado para mimetizar consequências da degeneração testicular em animais criados em condições de clima tropical semiúmido, e até mesmo aqueles de clima mais ameno, porém em condições inadequadas de ambiência, e submetidos a estresse térmico.

Neste contexto, o uso do método poderá ser útil a pesquisas futuras na área da bioclimatologia, clínica médica, andrologia e também da farmacologia reprodutiva, uma vez que a indução de quadros brandos de DT por estresse térmico pode vir a ser requerida para testes com uso de fármacos com ação local testicular.

Em acréscimo, objetiva-se que a imagem termal venha a ser uma importante ferramenta no monitoramento da qualidade testicular e prospecção de episódios de estresse térmico testicular e até DT, e que isto passe a ser protocolar na avaliação clínico andrológica de reprodutores ruminantes domésticos.

## REFERÊNCIAS

- ARMENGOL, M.F.L.; SABINO, G.A.; FORQUERA, J.C.; CASA, A. de; AISEN, E.G. Sperm head ellipticity as a heat stress indicator in Australian Merino rams (*Ovis aries*) in Northern Patagonia, Argentina. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 553-559, 2015.
- BARCA, F. A. B., JR; KOETZ, C., JUNIOR; DA CRUZ FÁVARO, P.; PEREIRA, G. R.; MENEGASSI, S. R. O.; MOROTTI, F.; GALDIOLI, V. H. G.; SOUZA, A. K.; BARCELLOS, J.O.J.; SENEDA, M. M. Infrared thermography and Doppler ultrasonography to evaluate the effects of scrotal insulation on testicular blood flow dynamics in bulls. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n.4, p. 1267-1278, 2020.
- BARKAWI, A.H.; ELSAYED, E.H.; ASHOUR, G.; SHEHATA, E. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. **Small Ruminant Research**, v.66, p.209-213, 2006.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied animal reproduction**. New Jersey: Prentice Hall, 1997.351p.
- BELLIN, M.E.; HAWKINS, H.E.; AX, R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 72, n. 9, p. 2441-2448, 1994.
- BRAZ, K. M. G.; FERREIRA, C. S.; GHIRELLI, C. O.; BOSCO, K. A.; FLÁVIO, N.; NASCIMENTO, D. C.; RAMIRES, C., NETO; PEIXOTO, K. C., JR; CRESPILO, A. M. Influência da bipartição escrotal sobre a capacidade de termorregulação e hemodinâmica testicular em caprinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 26, p. 01-10, 2019.
- BRIOSCHI, M.L. **Princípios e Indicações da Termografia Médica**. São Paulo: Andreoli, 2010, 280p.
- CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; DE MELLO SALGUEIRO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY; C. S. B.; NUNES, J. F. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 344-353, 2014a.
- CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; OLIVEIRA, R. V.; PESSOA, A. W. P.; ARAÚJO, A. A.; NUNES, J. F. Ultrassonografia testicular em caprino com degeneração

testicular associado a lesões escrotais: relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 08, p. 54-72, 2014b.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 37 p.

CUNHA, D. M. S.; SOUZA, M. B.; BRITO, B. F. ; TORRES, V. L. ; NUNES, T. G. P.; TAVARES, S. S.; VIANA, D. A.; SILVA, L. D. M. ; PEREIRA, L. M. C.; TEIXEIRA, D. I. A. Testicular Morphological and Ultrasonographic Characterization of Male Gray Brocket Deers (*Mazama gouazoubira*) in Different Reproductive Status. **ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE (ONLINE)** v. 47, p. 1-10, 2019.

DEVKOTA, B.; SASAKI, M.; MATSUI, M.; TAKAHASHI, K. I.; MATSUZAKI, S.; KOSEKI, T.; MIYAKE, Y. I. Effects of scrotal insulation and pathological lesions on  $\alpha$ -smooth muscle actin SMA and vimentin in the bull testes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, p. 187-190, 2010.

DURAIRAJANAYAGAM, D.; AGARWAL, A.; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 14–27, jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.018>

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C.; S. SALAMON. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990, 204p.

FAÇANHA, D. A. E.; PEIXOTO, G. C. X.; FERREIRA, J. B.; DE SOUZA, J. E. R.; PAIVA, R. D. M.; RICARTE, A. R. F. Detecting estrus in Canindé goats by two infrared thermography methods. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 12, n. 2, p. 49-54, 2018.

GABALDI, S.H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias Saúde**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2002.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE)** - Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA), 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado> acesso em 23 de Out. 2020.

JONES, R. C.; DACHEUX, J. L. Physiology of the Epididymis In: KANDEL, F. R.; SWERDLOFF, R. S.; PRIOR, J. L. (Eds.) **Male Reproductive Dysfunction: Pathophysiology and treatment**. Nova York: Informa Healthcare, 2007. Cap. 6, p. 71 – 76.

KASTELIC, J.P. COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 108, p 81–85, 1996.

KOTRBA, R.; KUNC, P.; GÜRDİL, G.A.K.; PINAR, Y.; SELVÍ, K.C. Applications of infrared thermography in animal production. **Journal of the Faculty of Agriculture**, v.22, p.329-336, 2007.

LA FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES, J.L.; BRANDELLI, A. Variação sazonal das proteínas do plasma seminal caprino. **Theriogenology** , v. 57, n. 3, p. 1035-1048, 2002.

LUNSTRA, D. D.; GREGORY, K. E.; CUNDIFF, L. V. Heritability estimates and adjustment factors for the effects of bull age and age of dam on yearling testicular size in breeds of bulls. **Theriogenology**, v. 30, n. 1, p. 127–36, 1988.

MAIA, M. S. **Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos**. EMPARN, Natal, v.13, 90p., 2010. Disponível em <<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/EMPARN/DOC/DOC000000000024678.PDF>>. Acesso em 08 nov. 2020.

MAIA, M. S.; SILVA, J. V. C.; MEDEIROS, I. M.; LIMA, C. A. C.; MOURA, C. E. B. Características seminais de carneiros das raças Dorper, Santa Inês e mestiços em condições de clima tropical. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. Recife. v.18, n. 1 p.20-25, janeiro/abril, 2015.

MARTINS, L. F.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; GUIMARÃES, J. D.; FACIONE GUIMARÃES, S. E.; PINHO, R. O. Semen quality and concentration of soluble proteins in the seminal plasma of Alpine bucks. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 2, 2010.

MEDEIROS, A. A.; ARAUJO, A. A.; MOURA, A. A. A.; CAVALCANTE, J. M. M.; FIGUEIREDO, E. L.; RODRIGUES, L. F. S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4°C e 29°C, como método de coloração vital para avaliação do espermatozoide ovino. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 46, p.287-297, 2006.



MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Efeitos da Insulação Escrotal sobre a Biometria Testicular e Parâmetros Seminais em Carneiros da Raça Santa Inês Criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1704 -1711, 2001.

MURADÁS, P. R.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; GRANEMANN, L. C.; SANTOS, I. W.; PIMPÃO, C. T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 69-74, 2006.

NÄÄS, I.A.; GARCIA, R.G.; CALDARA, F.R. Infrared thermal image for assessing animal health and welfare. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v.2, n.3, p.66-72, 2014.

NUNES, J. F.; RIERA, G. S.; SILVA, A. E. F. D.; PONCE DE LEON, F. A.; LIMA, F. Características espermáticas de caprinos Moxotó de acordo com a morfologia escrotal. Embrapa Caprinos e Ovinos - **Circular Técnica N° 06** (INFOTECA-E), 1983.

NUNES, J.F. Fisiologia sexual do macho caprino - **Circular Técnica, n° 05** (INFOTECA-E). Sobral: EMBRAPA – CNPQ, 1982. 41p.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF SMALL RUMINANTS - NRC. Sheep, goats, cervids, and New world camelids. **National Academy Press**, Washington, DC, 2007. 362 p.

OLIVEIRA, R. V. DE; NUNES, J. F.; MELLO SALGUEIRO, C. C.; CAVALCANTE, J. M. M.; DE ARARIPE MOURA, A. A.; ARAUJO, A. A. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (acp-101) ou tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, 2009.

PORCIONATO, M. A. F.; CANATA, T. F.; DE OLIVEIRA, C. E.; DOS SANTOS, M. V. Udder Thermography of Gyr Cows for Subclinical Mastitis Detection. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v.3, n.3, p.251-257, 2009.

PORTUGAL, E. S. **Termografia e ultrassonografia doppler do plexo pampiniforme e termografia do escroto de touros: correlação com a qualidade do sêmen**. 2014. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014, 80p.

RAO, M.; ZHAO, X. L.; YANG, J.; HU, S. F.; LEI, H.; XIA, W.; ZHU, C. H. Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 4, p. 668-675, 2015.

ROBERTO, J.V.B.; SOUZA, B.B.; FURTADO, D.A.; DELFINO, L.G.B.; MARQUES, B.A.A. Gradientes térmicos e respostas fisiológicas de caprinos no semiárido brasileiro utilizando a termografia infravermelha. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v.2, n.1, p.11-19, 2014.

ROCHA, D. R.; MARTINS, J. A. M.; VAN TILBURG, M. F.; OLIVEIRA, R. V., MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; ARAUJO, A. A.; MOURA, A. A. Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. **Theriogenology**, v. 84, n. 8, p. 1291-1305., 2015

RODRIGUES, I. C. S. **Tolerância ao calor de ovinos lanados e deslanados criados em região semiárida do vale do são francisco, petrolina-PE**. 2016. 52 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária do Ceará, Fortaleza, 2016.

ROMANELLO, N.; JUNIOR, J. B. L.; JUNIOR, W. B.; BRANDÃO, F. Z.; MARCONDES, C. R.; PEZZOPANE, J. R. M. PANTOJA, M. H. A.; BOTTA, D.; GIRO, A.; MOURA, A. B. B.; BARRETO, A. N.; GARCIA, A. R. Thermoregulatory responses and reproductive traits in composite beef bulls raised in a tropical climate Narian. **International Journal of Biometeorology**, v. 62, n. 9, p. 1575–1586, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1557-8>

SALLES, M. G. F.; SOUZA, C. E. A.; RONDINA, D.; MOURA, A. A. A.; de ARAÚJO, A. A. Respostas fisiológicas ao estresse térmico de bodes Saanen em clima tropical. **Ciência Animal**, v. 19, n. 1, p. 19-28, 2009.

SALLES, M. G.F.; VIANA-NETO, A. M. ; VIEIRA-NETO, M. F. ; ROCHA, D. R.; RODRIGUES, I.C.S. ; SOUZA, P. T.; ARAÚJO, A. A. Tropical climate induces seasonal changes in the reproductive parameters and hormonal profile of Saanen bucks. **Veterinarski arhiv**, v.90, n. 3, p. 235-242, 2020.

SANTOS, B. M. B.; MELO, C. C. S.; ANTUNES, L. P. ; SALGUEIRO, C. C. M. ; AGUIAR, G. V. ; NUNES, J. F. Parâmetros cinéticos dos espermatozóides caprinos diluídos em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) adicionado de Aloe vera. **In:**

**CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 6, 2012. Anais... Fortaleza: Ciência Animal, 2012. v. 22. p. 447-450.

SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; KOHNKE, P. L.; DACHEUX, J. L.; DRUART, X. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of proteomics**, v. 109, p. 245-260, 2014.

SOUZA, C. E. A.; ARAUJO, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; LIMA SOUZA, A. C.; NEIVA, J. N. M.; MOURA, A. A. Reproductive development of Santa Ines rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 4, p. 644-653, 2010.

SOUZA, P. T.; SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A. A. Impacto do estresse térmico sobre a fisiologia, reprodução e produção de caprinos. **Ciência Rural (UFSM. Impresso)**, v. 42, p. 1888-1895, 2012.

SPROTT, L. R.; HARRIS, M. D.; FORREST, D. W.; YOUNG, J.; ZHANG, H. M.; OYARZO, J. N.; AX, R. L. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n.4, p. 795-798, 2000.

TODINI, L.; MALFATTI, A.; TERZANO, G.M.; BORGHESE, A.; PIZZILLO, M.; DEBENEDETTI, A. Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. **Theriogenology**, v.67, p.627–631, 2007.

VIANA-NETO, A. M. **Parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de carneiros morada nova submetidos a insulação escrotal intermitente**. 2018. 89 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Zootecnia, Fortaleza, 2018.

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

VIEIRA-NETO, M. F. **Efeito da Flunixin Meglumine na atividade espermática de machos ovinos e caprinos**. 2017. 49 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária do Ceará, Fortaleza, 2017.

VIEIRA-NETO, M. F.; RODRIGUES, I. C. S.; DA SILVA LELES, J.; DE ARAÚJO, É. P.; NETO, A. M. V.; DE CARVALHO, F. V.; SALLES, M. G. F.; DE ARAÚJO, A. A. Effect of Flunixin Meglumine administration on seminal characteristics of male sheep and goat. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 5, p. 3145-3154, 2017.

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

YADAV, S. K.; SINGH, P.; KUMAR, P. SINGH, S. V., SINGH, A., KUMAR, S. Scrotal infrared thermography and testicular biometry: Indicator of semen quality in Murrah buffalo bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 209, p.106145, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106145>