

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA PENTOXIFILINA NA FUNÇÃO TESTICULAR E  
PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE EQUINOS SUBMETIDOS A  
ESTRESSE TÉRMICO ESCROTAL**

YAMÊ FABRES ROBAINA SANCLER DA SILVA

BOTUCATU – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA PENTOXIFILINA NA FUNÇÃO TESTICULAR E  
PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE EQUINOS SUBMETIDOS A  
ESTRESSE TÉRMICO ESCROTAL**

YAMÊ FABRES ROBAINA SANCLER DA SILVA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia Animal para  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Yamê Fabres Robaina Sancler.

Efeito da pentoxifilina na função testicular e produção espermática de equinos submetidos a estresse térmico escrotal / Yamê Fabres Robaina Sancler Silva. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Frederico Ozanam Papa  
Capes: 50504037

1. Testículos - Doenças. 2. Espermatozoides. 3. Cavalo.  
4. Tecido parenquimatoso. 5. Pentoxifilina.

Nome da Autora: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva

Título: EFEITO DA PENTOXIFILINA NA FUNÇÃO TESTICULAR E PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE EQUINOS SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO ESCROTAL

#### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa  
Presidente e Orientador  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Camila de Paula Freitas Dell’acqua  
Membro  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira  
Membro  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Fernanda Saules Ignácio  
Membro  
Faculdade de Medicina Veterinária  
FIO – Ourinhos

Prof. Dr. Gabriel Augusto Monteiro  
Membro  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias  
Escola de Veterinária – UFMG – Belo Horizonte

Data da Defesa: 1 de setembro de 2017

*“Mais importante do que chegar lá  
é poder olhar pra trás  
e ter orgulho do caminho percorrido”*

*Anônimo*

*Dedico esse trabalho aos meus pais por me apoiarem desde sempre em todos os meus sonhos, pelo amor incondicional e pela motivação que me fornecem todos os dias para continuar. Eu sei o quanto lutaram por minha educação, portanto essa vitória é de vocês também.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e o amor que rege a vida por ter guiado meus passos até aqui, sempre com muita saúde e proteção. Por ter colocado em meu caminho uma família linda e pessoas muito especiais.

Aos meus pais pelo enorme sacrifício que sempre fizeram para me proporcionar o melhor que podiam. Pelo exemplo de vida e por entenderem que a educação é a maior e melhor herança que poderiam me deixar, mesmo não tendo as oportunidades que eu tive. Por compreenderem minha ausência nos bons e maus momentos e ainda assim me fornecerem todo o suporte necessário ao progresso. A vocês todo o meu amor e admiração.

Aos meus irmãos, Cairê por ser meu melhor amigo desde o útero de nossa mãe e Allan por sempre torcer pelas minhas vitórias. Juntos pro que der e vier!

Aos meus avós pelas orações, carinho e exemplo de vida e humildade. Por me manterem sempre com os pés no chão enquanto almejo alcançar voos altos.

À Selma e ao Toninho, anjos que foram colocados em meu caminho. O amor de vocês ultrapassa a barreira dos laços de sangue.

A toda minha família (tios, tia, primos e primas) pela torcida e apoio na carreira que escolhi. Vocês preenchem meu coração de alegria a cada reencontro!

Às minhas amigas irmãs de república “Deusas do Olimpo”, por terem feito parte dos melhores anos da minha vida. A gente era feliz e sabia! Vocês estão guardadas do lado esquerdo do peito pra toda vida.

Ao meu orientador Frederico Ozanam Papa por ter acreditado em meu potencial e minhas ideias desde a época da residência e ter me dado a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa no mestrado e doutorado. Muito obrigada por toda a confiança e ensinamentos!

Ao Edjalma, Paulinho e todos os estagiários que nos auxiliaram durante o ano de 2015 no desenvolvimento da parte experimental desse projeto. Serei sempre grata pela ajuda intensa e fundamental para a concretização desse estudo. Não tenho palavras para dizer o quanto vocês foram importantes!

À Camila Dell’acqua pela amizade, profissionalismo e ajuda sempre que precisei!

Ao Dr. Barry Allen Ball por ter acreditado neste projeto, pelos preciosos ensinamentos, por me acolher tão bem em seu grupo de pesquisa e me proporcionar a oportunidade de desenvolver parte desse projeto em seu laboratório de pesquisa na Universidade do Kentucky.

A todos os integrantes do laboratório de Reprodução Equina do Gluck Equine Research Center (Hossam, Claudinha, Kirsten, Blaire, Shavahn, Carleigh, Abdo, Alisson, Pouya e Mariano) pelos conhecimentos compartilhados, cooperação e excelente convívio durante meu período de Doutorado Sanduíche em Lexington/KY, em especial: Alex e Yatta, por todo o auxílio dispensado na concretização deste estudo.

Aos membros da banca, professores Gabriel, Fernanda, Camila e João por aceitarem gentilmente o convite, fazerem parte da minha trajetória acadêmica e, principalmente, por serem profissionais aos quais me espelho diariamente.

Aos amigos de Botucatu: Bianca, Stephane, Rombudo, Thiago, Ale, Vivi, Gustavo, Ivan, Rúbia, Fábio, Thaís, Beto, Guta, Pedro, Loreta, Raíssa, Gabi, Victor e Camila. Vocês amenizaram a distância da família e alegraram meus dias durante esta etapa!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade de avanços profissionais tão valiosos. Hoje eu visto a camisa dessa escola e aqui me sinto verdadeiramente em casa.

À minha amada e querida Universidade Federal de Viçosa pela formação acadêmica e por ter me feito “gente grande”, motivo de muito orgulho em minha vida!

Aos professores, funcionários e colegas de pós-graduação do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária da FMVZ, pelo excelente convívio, ensinamentos e troca de experiências.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Doutorado e bolsa BEPE, fundamentais à realização desse projeto de pesquisa.

Aos 15 Minihorses que inocentemente tanto me ajudaram e foram os maiores colaboradores desse trabalho. Com eles aprendi a ser muito melhor Médica Veterinária do que quando iniciei os trabalhos. Aprendi, mais do que nunca, a ter paciência e persistência para atingir meus objetivos seja nas adversidades ou na bonança. Hoje tenho a convicção de que todo o trabalho árduo, iniciado desde a doma até o fim das coletas,

valeu a pena.

A todas as pessoas que de alguma forma ajudaram na elaboração e desenvolvimento deste trabalho, meus sinceros e eternos agradecimentos.

*“A vontade de retribuir vem naturalmente e um pequeno gesto acaba se multiplicando. Quando se planta cuidado, colhe-se gratidão.”*  
*Charles Chaplin*



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMH: hormônio anti-Mulleriano;
- Bax*: gene de codificação da proteína Bax;
- CASA: análise computadorizada do movimento espermático;
- Casp8*: gene de codificação da proteína caspase 8;
- Casp9*: gene de codificação da proteína caspase 9;
- cDNA: ácido desoxiribonucléico complementar;
- CERAN: Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal;
- CFDA: diacetato de carboxifluoresceína;
- cm<sup>3</sup>: centímetro cúbico;
- CT: controle;
- DIC: microscopia de contraste de interferência diferencial;
- DG: degeneração testicular;
- EROs: espécies reativas de oxigênio;
- Fas*: gene de codificação do receptor de morte de superfície celular Fas;
- FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia;
- HHG: eixo hipotálamo-hipófise-gonadal;
- Hsf1*: gene de codificação do fator de choque térmico 1;
- HTMO: Hamilton Thorne Research;
- IMP: integridade de membrana plasmática;
- IP: iodeto de propídio;
- M: mol;
- mL: mililitro;
- mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico;
- mOsm: miliosmol;
- MP: motilidade progressiva;
- MT: motilidade total;
- nm: nanômetro;
- RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real;
- PERO: índice de peroxidação lipídica;
- Ptgs2*: gene de codificação da prostaglandina-endoperoxide sintase 2;
- PTX: pentoxifilina;
- RAP: espermatozoides rápidos;

TnF $\alpha$ : fator de necrose tumoral F $\alpha$ ;

UNESP: Universidade Estadual Paulista;

VAP: velocidade média de trajeto;

VCL: velocidade curvilínea;

VSL: velocidade linear progressiva;

v/v: volume por volume;

$\mu$ L: microlitro;

$\mu$ m: micrômetro;

° C: graus Celsius.

## Lista de Tabelas

### Capítulo 2

TABELA 1	Genes alvos investigados na análise de RT-qPCR.....	116
TABELA 2	Classificação em escores das lesões histológicas presentes no parênquima testicular dos grupos CT, DG e PTX, avaliadas em microscopia de luz em aumento de 40x. Os parâmetros avaliados foram a perda de células germinativas, diminuição da espermição, ausência de espermatozoide na luz do túbulo seminífero, presença de edema, presença de vacuolização, aumento do tamanho do lúmen tubular, presença de lâmina basal ondulada e escore total. Os valores estão representados na forma de medianas (intervalo interquartil).....	119

## Lista de Figuras

### Revisão de Literatura

- FIGURA 1 Ilustração simplificada de um corte sagital da cavidade pélvica e região inguinal do garanhão, demonstrando o sistema reprodutor, constituído pela genitália externa, representada pelo escroto (a), testículos (b), epidídimos (c), pênis (d) e prepúcio (e); e genitália interna, formada pelas ampolas do ducto deferente (f), glândulas vesiculares (g), próstata (h) e (i) glândulas bulbouretrais (Arquivo Pessoal)..... 24
- FIGURA 2 Ilustração do mecanismo de contracorrente entre artéria testicular e a veia testicular (em forma de plexo pampiniforme) na região do funículo espermático. A artéria, que conduz o sangue arterial a uma temperatura média de 38° C da região abdominal em direção ao testículo, perde calor para o sangue venoso que retorna do testículo em direção ao abdômen a uma temperatura média de 35° C (Arquivo Pessoal)..... 26
- FIGURA 3 Mecanismos que asseguram a termorregulação testicular no garanhão. 1) Plexo pampiniforme (a) responsável pela retirada de calor do sangue que irriga o parênquima testicular. 2) Músculo cremaster (b) que ao contrair e relaxar suas fibras aproximam e afastam o testículo da cavidade pélvica, respectivamente. 3) Túnica dartos (c) que ao se contrair e relaxar, respectivamente, reduz e aumenta a superfície escrotal de troca de calor com o ambiente (Arquivo Pessoal)..... 27
- FIGURA 4 Ilustração do parênquima testicular, que é dividido em lóbulos (a) contendo os túbulos seminíferos e tecido intersticial. Em destaque um corte histológico corado em hematoxilina-eosina em um aumento de 100x em microscópio óptico de luz, demonstrando o parênquima testicular de um cavalo sadio, contendo túbulos seminíferos (b), revestidos internamente pelo epitélio germinativo e células de Sertoli, entremeados pelo tecido intersticial (c), constituído de tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e células de Leydig (Arquivo Pessoal)..... 29
- FIGURA 5 Ilustração do processo de formação de gametas masculinos (espermatogênese). Na primeira fase (espermatocitogênese) parte das

- espermatogônias dividem-se ativamente por mitose e se diferenciam em espermatogônias tipo B. Esta linhagem aumenta seu volume e se diferencia em espermatócitos primários pré-leptotenos que realizam a meiose I se dividindo em dois espermatócitos secundários, com metade do material genético inicial. Estas novas células sofrem meiose II, equacionando as cromátides irmãs, dando origem a quatro espermatídes também haplóides. As espermatídes sofrem diversas modificações estruturais (espermiogênese) e transformam-se em espermatozoides. No final do processo há a liberação dos espermatozoides na luz do túbulo seminífero, fenômeno conhecido como espermição (Arquivo Pessoal)..... 31
- FIGURA 6 O aumento do fotoperíodo promove uma diminuição de melatonina circulante, reativando os centros hipotalâmicos que passam a secretar maiores quantidades de GnRH. Este hormônio atua na adenohipófise estimulando a liberação de LH e FSH. O LH, por sua vez, estimula a síntese dos hormônios esteroides testosterona e estrógeno nas células de Leydig. Já o FSH atua nas células de Sertoli, promovendo a secreção de inibina, ativina e ABP e a modulação da estereidogênese, estimulando a produção de estrógeno (Arquivo Pessoal)..... 36
- FIGURA 7 Ilustração simplificada das vias intrínseca e extrínseca de apoptose, ativadas pelo estresse térmico testicular. A via intrínseca é ativada quando a expressão de *Bax* supera a de *Bcl2*, levando a modificações mitocondriais e favorecendo a liberação do citocromo C para o citosol. Uma vez liberado o citocromo C se liga ao Apaf1, formando um complexo que ativa *Casp9* e conseqüentemente a cascata de caspases efetoras (3,6 e 7). A via extrínseca é iniciada quando Fas se liga ao seu receptor FasL, ativando FADD e consecutivamente as caspases 8 e 10, que por sua vez ativarão as caspases efetoras. O gene *p53* também é *upregulado* pelo calor, e ativará ambas as vias de apoptose, assim como a *Hsp70* em casos de extensos danos celulares. Quando as caspases efetoras são ativadas o mecanismo de apoptose se completa (Arquivo Pessoal)..... 50

- FIGURA 8** Diagrama proposto sobre os possíveis danos causado pelo estresse térmico ao parênquima testicular. O incremento calórico da gonada leva a um aumento do metabolismo celular e consequente aumento da demanda por oxigênio e glicose, que passam a não ser supridos adequadamente, culminando em hipóxia e hipoglicemia, respectivamente. Além disso, o aumento do metabolismo eleva a produção de EROs, que em dado momento se sobrepõe aos mecanismos antioxidantes da célula. Tais eventos levam a danos bioquímicos como paralisação da produção proteica, desnaturação de proteínas, fragmentação de DNA e RNA e oxidação de lipídios. O calor por si só também é capaz de causar danos bioquímicos, como desnaturação de proteínas e enzimas, além de danos aos ácidos nucleicos. Finalmente, o estresse térmico leva a expressão gênica de proteínas envolvidas em vias de apoptose. Todos os mecanismos relacionados ao efeito do estresse térmico no testículo convergem para o dano tecidual, produção de espermatozoides defeituosos e apoptose, resultando em subfertilidade ou infertilidade do macho (Arquivo Pessoal)..... 51
- FIGURA 9** Fórmula estrutural bidimensional (A) e tridimensional (B) da pentoxifilina (Fonte: <https://es.wikipedia.org/wiki/Pentoxifilina>, acessado em 05/03/2017)..... 62

## Capítulo 1

- FIGURA 1** Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) para o volume seminal (A) e concentração espermática (B), nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde) avaliados 24 dias antes até 60 dias após (D-24 a D60) o término do insulto térmico escrotal. A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação..... 88

- FIGURA 2 A Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) para a motilidade total (A), motilidade progressiva (B), espermatozoides rápidos (C) e integridade de membrana plasmática (D) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde) avaliados 24 dias antes até 60 dias após (D-24 a D60) o término do insulto térmico escrotal. A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação..... 89
- FIGURA 3 Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) para o total de defeitos espermáticos (A), defeitos maiores (B), defeitos menores (C), defeitos de cabeça (D), defeitos de peça intermediária (E), defeitos de cauda (F), gotas citoplasmáticas (G), células germinativas (H) e formas teratológicas (I) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde) avaliados 24 dias antes até 60 dias após (D-24 a D60) o término do insulto térmico escrotal..... 93
- FIGURA 4 Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) para a geração intracelular do ânion superóxido (A), geração do ânion superóxido na matriz mitocondrial (B), Índice de peroxidação lipídica (C) e Índice de caspases 3 e 7 ativadas (D) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde), avaliados 24 dias antes até 60 dias após (D-24 a D60) o término do insulto térmico escrotal. A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação..... 94

## Capítulo 2

- FIGURA 1 Método utilizado no estudo para induzir estresse térmico escrotal..... 113
- FIGURA 2 Ilustração das mensurações realizadas no túbulo seminífero; a) área do epitélio seminífero (destaque em vermelho) b) área da luz do túbulo seminífero (destaque em verde); c) área total do túbulo seminífero

	(destaque em azul); d) medidas utilizadas para calcular o diâmetro do túbulo seminífero.....	115
FIGURA 3	Valores médios $\pm$ erros padrão (SEM) do volume testicular total relativo nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde), avaliados 5 dias antes até 60 dias após (D-5 a D60) o término do insulto térmico escrotal. A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação.....	117
FIGURA 4	Valores médios $\pm$ erros padrão (SEM) da área do epitélio seminífero (A), área tubular total (B) e diâmetro tubular total (C) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde), avaliados 60 dias após o término insulto térmico escrotal (D60). Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes.....	118
FIGURA 5	Secções histológicas coradas em HE (Hematoxilina Eosina), analisadas por microscopia óptica de luz, do grupo controle - CT (A), grupo degenerado tratado com pentoxifilina - PTX (B) e grupo degenerado - DG (C e D).....	121
FIGURA 6	Valores médios $\pm$ erros padrão (SEM) da expressão gênica dos marcadores apoptóticos <i>Bax</i> no D30 (A) e D60 (B); Caspase 8 (CS8) no D30 (C) e D60 (D); e Caspase 9 (CS9) no D30 (E) e D60 (F) após insulto térmico escrotal, nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde). *Indica diferença estatística com $p < 0,05$ e ** com $p < 0,01$ .....	122
FIGURA 7	Valores médios $\pm$ erros padrão (SEM) da expressão gênica do marcador de choque térmico <i>Hsf1</i> no D30 (A) e D60 (B) e do do marcador inflamatório/oxidativo <i>Ptgs2</i> D30 (C) e D60 (D) após insulação escrotal, nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX,	



representado em verde). \* Indica diferença estatística com  $p < 0,05$  e \*\*  
com  $p < 0,01$ . representado em verde)..... 123

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
2.1. Anatomia funcional do sistema reprodutor masculino .....	23
2.1.1. Aparelho reprodutor.....	23
2.1.2. Fisiologia da reprodução.....	25
2.1.2.1. Termorregulação testicular .....	25
2.1.2.2. Espermatogênese .....	27
2.1.2.3. Endocrinologia da reprodução .....	32
2.2. Degeneração testicular .....	37
2.2.1. Incidência.....	37
2.2.2. Etiologia.....	37
2.2.2.1. Estresse térmico escrotal.....	39
2.2.3. Diagnóstico .....	51
2.2.4. Tratamento da DT .....	60
2.2.4.1. Pentoxifilina.....	62
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>68</b>
3.1. Objetivos gerais .....	68
3.2. Objetivos específicos .....	68
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>5. CAPÍTULO 1</b> .....	<b>81</b>
<b>6. CAPÍTULO 2</b> .....	<b>110</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>138</b>

## Resumo

O presente estudo propõe avaliar o efeito do tratamento oral com pentoxifilina sobre a qualidade seminal, morfometria, histologia e expressão gênica testicular de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal. Além disso, objetiva testar a eficiência de novo método de aquecimento escrotal na espécie equina. Para isso 14 garanhões foram divididos em três grupos: Controle (CT, n=4), Degenerado (DG, n=5) e Degenerado Tratado (PTX, n=5). O insulto térmico escrotal foi realizada utilizando uma bolsa térmica acoplada a uma fonte de ar aquecido a 50° C, durante uma hora no início da manhã e uma hora no final da tarde, no D-1 e D0. Um dia após o insulto (D1), o tratamento com 17 mg/kg pentoxifilina oral, a cada 12 h, foi iniciado e conduzido por 30 dias. Os animais foram coletados duas vezes por semana do D-24 ao D60 e o sêmen avaliado quanto a cinética, morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, geração do ânion superóxido intracelular e mitocondrial, índice de peroxidação lipídica e índice de caspases ativadas 3 e 7. No D30 e D60 biópsias testiculares foram realizadas e as amostras destinadas a histopatologia, e ao RT-qPCR, quanto a resposta a apoptose, choque térmico e estresse oxidativo. As medidas testiculares de comprimento, altura e largura foram mensuradas utilizando paquímetro, e o volume testicular relativo foi calculado, uma vez por semana do D-5 ao D60. Dentre os resultados obtidos, o método de estresse térmico escrotal utilizado se mostrou eficiente em induzir degeneração testicular em garanhões. O tratamento com a pentoxifilina apresentou efeito benéfico no sêmen quanto a motilidade total e porcentagem de espermatozoides rápidos. Além disso, minimizou a peroxidação lipídica, previniu a ativação de mecanismos de apoptose nos espermatozoides, e reduziu o número de defeitos espermáticos (defeitos totais, maiores, de cabeça, presença de células germinativas e formas teratológicas). Na avaliação histológica, o fármaco promoveu redução dos danos causados pelo calor no D60, como uma menor presença de ondulação da lâmina basal — refletindo uma menor atrofia dos túbulos seminíferos — no entanto, não foi eficiente em prevenir o aparecimento de lesões, como o edema intestinal, vacuolização de células germinativas, ausência de espermatozoides e aumento da luz dos túbulos seminíferos. Os efeitos benéficos da pentoxifilina podem ser atribuídos à inibição da apoptose em células germinativas observada aos 30 e 60 dias pós-insulto térmico e à ativação de mecanismos de proteção celular em resposta ao choque térmico. No entanto, mais estudos, quanto a dose e tempo de uso da pentoxifilina, são necessários para se alcançar melhores respostas no tratamento da degeneração testicular em equinos.

**Palavras-chave:** garanhão, degeneração testicular, insulto térmico, espermatozoide, parênquima testicular, apoptose, estresse oxidativo.

## Abstract

The objectives of this study are to evaluate the effect of oral treatment with pentoxifylline on seminal quality, morphometry, histology, and gene expression in the testicle of stallions thermal-induced. In addition, it aims to investigate the efficiency of a new method of scrotal heating. For this, 14 stallions were divided into three groups: Control (CT, n = 4), Degenerate (DG, n = 5) and Degenerate Treated (PTX, n = 5). The scrotal heating was induced by a thermal bag attached to an air source at 50 ° C, for an hour in the early morning and an hour in the late afternoon, on D-1 and D0. One day after the insult (D1), treatment with oral pentoxifylline (17mg/Kg) every 12 hours was initiated and carried out for 30 days. Twice-a-week semen collections were performed from D24 to D60 and semen was evaluated for kinetics, morphology, plasma membrane integrity, generation of intracellular and mitochondrial superoxide anion, lipid peroxidation index and activated caspase 3 and 7 index. In D30 and D60 testicular biopsies were carried out and the samples destined to histopathology and to RT-qPCR, regarding the response to apoptosis, heat-shock and oxidative stress. Testicular length, height and width were measured, using a caliper, and the relative testicular volume were calculated once a week from D5 to D60. Among the results obtained, the scrotal thermal stress method used was efficient in inducing testicular degeneration in stallions. Treatment with pentoxifylline showed a beneficial effect on semen in terms of total motility and percentage of rapid sperm. In addition, it minimized the lipid peroxidation, the activation of apoptosis mechanisms in sperm and caused decreased number of sperm defects (the number of sperm defects (total, major and head defects, the presence of germ cells and teratological forms). In the histological evaluation, the drug led to a reduction of heat damage in D60, as a lower presence of basal membrane undulation - reflecting less atrophy of the seminiferous tubules - however, the drug was not effective in preventing the onset of lesions such as interstitial edema, germ cell vacuolation, absence of sperm, and increased lumen of the seminiferous tubules. These effects can be related to the inhibition of apoptosis in germ cells at 30 and 60 days after thermal insult and the activation of the cellular protection mechanism in response to heat shock. However, more studies about the dose and time of the use of pentoxifylline are needed to achieve better responses in the treatment of testicular degeneration in horses.

**Key words:** stallion, testicular degeneration, thermal insult, sperm, testicular parenchyma, apoptosis, oxidative stress.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

---

*Introdução e Justificativa*

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Diferente de outras espécies domésticas, a seleção genética dos equinos tem sido realizada com base apenas no desempenho atlético, conformação e características fenotípicas, não havendo uma preocupação com a inserção de atributos da saúde reprodutiva em cruzamentos comerciais. Dessa forma, a incidência de animais com baixa fertilidade, doenças genéticas ou predisposição a enfermidades reprodutivas adquiridas é elevada nesta espécie.

A redução da fertilidade no garanhão resulta em importantes perdas econômicas para a indústria equina. Entretanto, apesar da alta incidência de garanhões subférteis, poucas vezes se consegue identificar na prática o principal fator desencadeador dessa redução na fertilidade, em razão da variedade de causas e fatores contribuintes.

A enfermidade mais comum que afeta a fertilidade nos machos domésticos, incluindo o garanhão, é a degeneração testicular (DT) que consiste no processo de deterioração do parênquima do testículo com consequente perda de sua função.

Diversos fatores etiológicos podem resultar em degeneração testicular, como varicocele, torção testicular, trauma, infecções locais (como periorquite, orquite, epididimite), neoplasias testiculares, hérnia inguino-escrotal, hidrocele, deficiências nutricionais e uso de esteróides anabolizantes/antiinflamatórios. No entanto, perturbações da homeostase térmica testicular como febre e hipertermia ambiental ou local são as causas mais frequentes.

A termorregulação ocorre pela ação de diversos mecanismos testiculares cujo resultado final é a redução da temperatura gonadal. Componentes do escroto combinados ao mecanismo de retirada de calor do sangue que irriga o parênquima testicular pelo plexo pampiniforme, garantem a homeostase térmica do testículo, mantendo este a uma temperatura entre 3 a 4° C abaixo da temperatura corporal.

Desta forma, fatores externos ou internos que interfiram no complexo mecanismo de termorregulação deste órgão, promovendo o incremento da temperatura testicular, resultam em um aumento do metabolismo celular, fomentando maior necessidade tecidual de oxigênio e substratos orgânicos, como a glicose. Como o suporte sanguíneo ao testículo é limitado, em situações de aumento de demanda de oxigênio ocorre hipóxia e hipoglicemia gerando danos ao tecido.

Além dos danos causados pelo déficit no suprimento de oxigênio e substratos orgânicos ao testículo, o estresse térmico promove aumento do metabolismo mitocondrial

nas células do parênquima testicular, gerando uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, superior a capacidade antioxidante de degradação desse tecido. Além disso, o insulto térmico por si só promove modificações em enzimas, proteínas, na molécula de RNA e DNA, modulando a expressão gênica de proteínas envolvidas em vias de apoptose. O resultado final da combinação de todos esses mecanismos é o dano e modificação da arquitetura tecidual, com perda da função gonadal.

Estudos em humanos (Shill, 1982; Moein et al., 2005; Oliva et al., 2009) e ratos (Queiroz et al., 2013; Yao et al., 2016) com alterações testiculares, demonstraram o efeito benéfico da pentoxifilina na melhoria de parâmetros espermáticos e testiculares. Esse efeito é atribuído ao mecanismo de ação deste fármaco em aumentar a microcirculação de órgãos, mediante ação na deformabilidade de hemácias, viscosidade sanguínea e vasodilatação, aprimorando, assim, o suporte sanguíneo e refletindo em melhorias da função testicular (Ward e Clissold, 1987; Collingridge e Rockell, 2000; Meru et al., 2006). Além da atenuação dos danos causados à gônada masculina pelas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas deste medicamento (Rieneck et al., 1993; Neuner et al., 1994; Delanian et al., 2005; Nouri et al., 2016).

O processo degenerativo testicular tem sido intensivamente estudado em outras espécies, contudo são escassas as pesquisas em equinos sobre o assunto, havendo necessidade de maiores esclarecimentos quanto aos parâmetros de evolução do processo, bem como de sua influência no sêmen e parênquima testicular. Ademais, há uma crescente demanda na indústria do cavalo por terapias eficazes que melhorem a qualidade seminal de garanhões, especialmente naqueles animais com diminuição da fertilidade.

Nesse sentido, o presente estudo propõe a avaliação de um tratamento inovador e uma investigação intensa de parâmetros clínicos da degeneração testicular em garanhões, atendendo, assim, uma demanda da indústria equina e da comunidade científica, de forma a auxiliar futuras pesquisas e favorecer o diagnóstico mais preciso desta condição.

*“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”*

*Martin Luther King*



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Anatomia funcional do sistema reprodutor masculino**

Diversos fatores extrínsecos e intrínsecos podem interferir no processo fisiológico de espermatogênese, gerando redução da fertilidade, dificultando o diagnóstico e adequado tratamento (Douglas and Umphenour, 1992; Ball, 2008a; Roser, 2008). Desta forma, para avaliar adequadamente e tratar um garanhão suspeito de apresentar distúrbio reprodutivo, o entendimento profundo da anatomia, fisiologia, endocrinologia e histologia reprodutiva se torna imprescindível (Birch, 2008).

#### **2.1.1. Aparelho reprodutor**

O aparelho reprodutor do garanhão (Figura 1) consiste em dois testículos, cada um suspenso por um cordão espermático e o músculo cremaster, dois epidídimos, dois ductos deferentes, cada um com uma ampola, duas vesículas seminais, uma próstata, duas glândulas bulbouretrais, pênis e uretra associada aos músculos isquiocavernoso, bulbosponjoso e retrator do pênis. O sistema reprodutor é suportado dentro da cavidade pélvica pela prega genital e externamente pelo escroto e prepúcio (Amann, 1981a; 2011).

Ambos os testículos possuem formato elipsoide e são orientados longitudinalmente no eixo horizontal. Apresentam um epidídimo e cordão espermático localizados crânio-dorsalmente e estão situados na região inguinal em condições fisiológicas (Turner, 1998), sendo o polo cranial discretamente mais elevado que a região caudal (Love, 1992). É um órgão de dupla função, responsável por sintetizar e secretar hormônios, bem como produzir os gametas masculinos, caracterizando, respectivamente, suas atividades endócrina e exócrina (Roser, 2008).

O testículo do garanhão é recoberto pela túnica albugínea, uma cápsula espessa de tecido conjuntivo denso, que emite septos dividindo o parênquima testicular em lóbulos incompletos que possuem comunicação entre si e convergem medialmente formando o mediastino, região que pode ser visualizada macroscopicamente em potros recém-nascidos, mas apenas microscopicamente no animal adulto, característica peculiar à espécie equina (Cartee et al., 1986).

Os testículos estão contidos em uma bolsa discretamente pendulosa, o escroto, e são separados pela rafe mediana, de forma a não terem contato entre si. Essa bolsa é formada por diversas camadas teciduais: a pele, túnica dartos, túnica vaginal parietal e túnica vaginal visceral (Amann, 1981a).

A túnica dartos consiste de uma musculatura que, dependendo de seu grau de contração ou relaxamento, resulta em alteração do formato e posicionamento do escroto, levando a uma maior ou menor superfície de troca de calor entre a epiderme escrotal e o ambiente (Brinsko *et al.*, 2011). O músculo cremaster se origina do músculo oblíquo abdominal interno e se insere no polo caudal do testículo, passando externamente ao cordão espermático. Quando este músculo se contrai ocorre a aproximação do testículo ao anel inguinal externo e o encurtamento do cordão espermático (Amann, 2011).

O cordão, ou funículo espermático, também revestido pela túnica albugínea, contém o ducto deferente e a artéria testicular envolvida por uma rede de veias denominada de plexo pampiniforme (Amann, 1981a). A artéria testicular, um ramo da artéria aorta abdominal, é a única fonte de irrigação testicular. Ela forma ramificações sobre a superfície do testículo e estes ramos se estendem para o parênquima testicular, retornando em seguida para o plexo pampiniforme do funículo espermático em direção à cavidade abdominal sobre a forma de veia testicular (Turner, 1998).

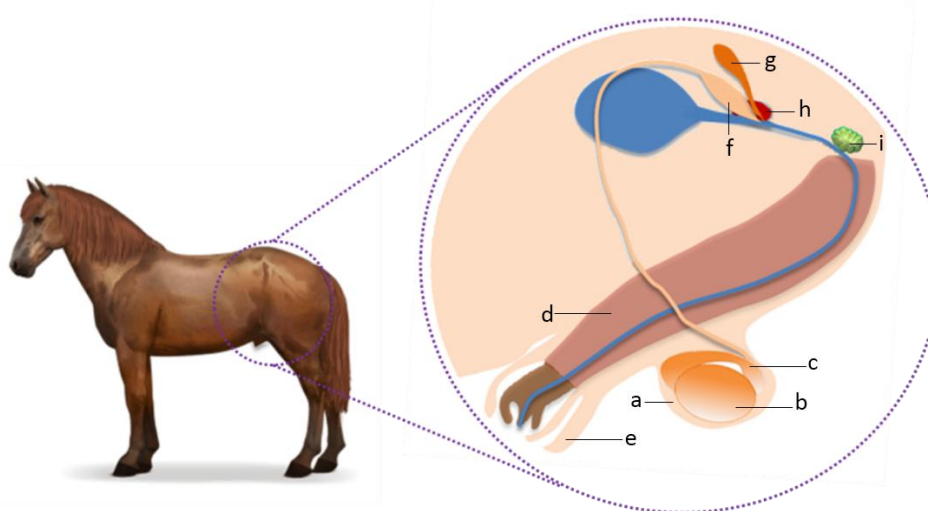


Figura 1. Ilustração simplificada de um corte sagital da cavidade pélvica e região inguinal do garanhão, demonstrando o sistema reprodutor, constituído pela genitália externa, representada pelo escroto (a), testículos (b), epidídimos (c), pênis (d) e prepúcio (e); e genitália interna, formada pelas ampolas do ducto deferente (f), glândulas vesiculares (g), próstata (h) e (i) glândulas bulbouretrais (Arquivo Pessoal).

A inervação do testículo nos equinos é originada a partir de ramos nervosos dos plexos renais e mesentérico caudal formando o plexo testicular ao redor dos vasos sanguíneos, de onde partem e se distribuem nervos para o parênquima testicular (Getty, 1975). Essencialmente a inervação do parênquima testicular ocorre por ação autônoma

do sistema simpático, não havendo presença de fibras parassimpáticas em avaliações histológicas (Risley e Skrepetos, 1964).

O epidídimo é um órgão alongado, enovelado, localizado na superfície do testículo (Sullivan *et al.*, 2005). Ele pode ser dividido anatomicamente em cabeça, corpo, e cauda, cujas funções básicas são respectivamente, a absorção de fluidos, secreção de moléculas que conferem ao espermatozoide capacidade fecundante e o armazenamento e manutenção de espermatozoides maduros. Mais tarde estas secreções se associarão aos fluídos produzidos pelas quatro glândulas sexuais acessórias presentes no garanhão, na região da uretra pélvica, para a composição do plasma seminal no momento da ejaculação (Shivaji, 1988; Marengo, 2008).

## **2.1.2. Fisiologia da reprodução**

### **2.1.2.1. Termorregulação testicular**

A termorregulação testicular e epididimária dependem de uma combinação de mecanismos relacionados à bolsa escrotal (elevada produção de secreção apócrina), plexo pampiniforme, túnica dartos e músculo cremaster (Setchell, 1991).

Baseado em dados obtidos de ovinos (Waites, 1961), o sangue contido em vasos da superfície escrotal troca calor com o ambiente através da evaporação da umidade escrotal, facilitada pela pouca quantidade de gordura subcutânea e intensa atividade de glândulas sudoríparas nessa região (Amann, 2011). O sangue resfriado retorna via plexo pampiniforme, que através de um mecanismo de contra-corrente, retira calor do sangue que penetra no testículo via artéria testicular (Figura 2), conduzindo-o a uma temperatura média de 34° a 35° C (Amann, 1981a).

A troca de calor vascular por si só não poderia regular ativamente a temperatura do testículo. Para que isso ocorra adequadamente, o calor produzido no testículo deve ser perdido pelo escroto, para que o sangue venoso retorne mais frio do que o fluxo arterial, permitindo troca de calor entre a artéria e o plexo pampiniforme (Waites, 1961; Amann, 1981a).

A pele do escroto é mais delgada do que a existente em outras partes do corpo e, especialmente na espécie equina, há raros ou nenhum pelos e uma quantidade abundante de glândulas sudoríparas, responsáveis por produzir grande quantidade de secreção apócrina que ao evaporar retira calor desta região (Setchell *et al.*, 1994).

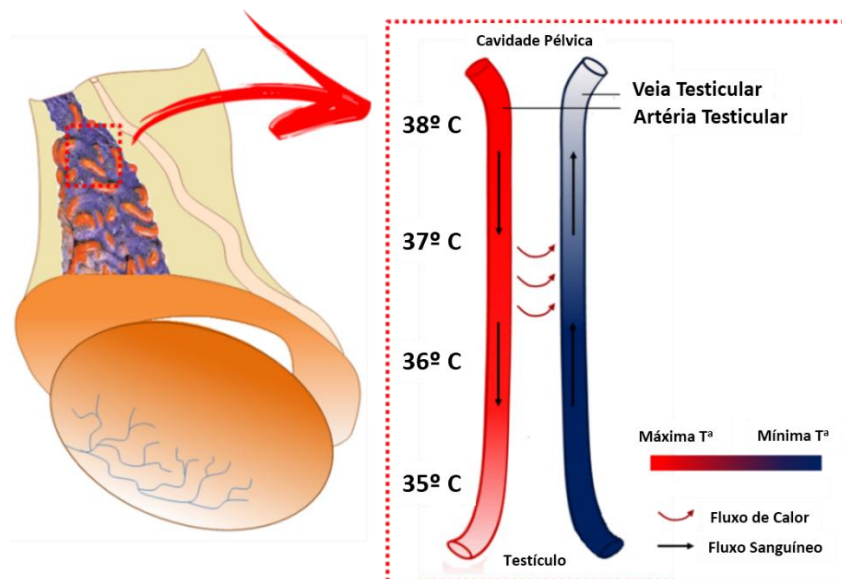


Figura 2. Ilustração do mecanismo de contracorrente entre artéria testicular e a veia testicular (em forma de plexo pampiniforme) na região do funículo espermático. A artéria, que conduz o sangue arterial a uma temperatura média de 38° C da região abdominal em direção ao testículo, perde calor para o sangue venoso que retorna do testículo em direção ao abdômen a uma temperatura média de 35° C (Arquivo Pessoal).

A temperatura testicular é ainda influenciada pela posição do testículo em relação à parede abdominal e esse posicionamento está sobre o controle das musculaturas dartos e cremaster. A túnica dartos é uma camada singular de músculo liso associada a tecido conjuntivo fibro-elástico em contato íntimo com a derme do escroto (Junqueira e Carneiro, 2013). Essas fibras musculares são sensíveis à temperatura do ambiente devido a grande quantidade de receptores térmicos que possuem (Dellmann e Brown, 1982). Em situações de temperaturas amenas ambas as musculaturas se contraem, reduzindo a área de troca de calor com o meio ambiente e aproximando o testículo da cavidade abdominal aquecida. Em temperaturas elevadas as musculaturas relaxam promovendo o relaxamento do escroto e testículo, permitindo maiores trocas de calor entre este e meio ambiente (Amann, 2011).

Nos cavalos, a espermatogênese normal ocorre a uma temperatura intra-testicular média de 3 a 4° C abaixo da corporal. A maioria dos problemas testiculares em garanhões está relacionada com alterações na capacidade para controlar a temperatura da gônada (Alvarenga e Papa, 2009). Em situações em que há aumento da temperatura corporal ou aumento de temperatura do testículo por influência do meio ambiente ou de condições patológicas (Blanchard *et al.*, 1996), o animal pode não conseguir manter a temperatura

escrotal ideal, ainda que os processos de termorregulação continuem atuando (Figura 3), culminando em um processo degenerativo (Moule e Waites, 1963).

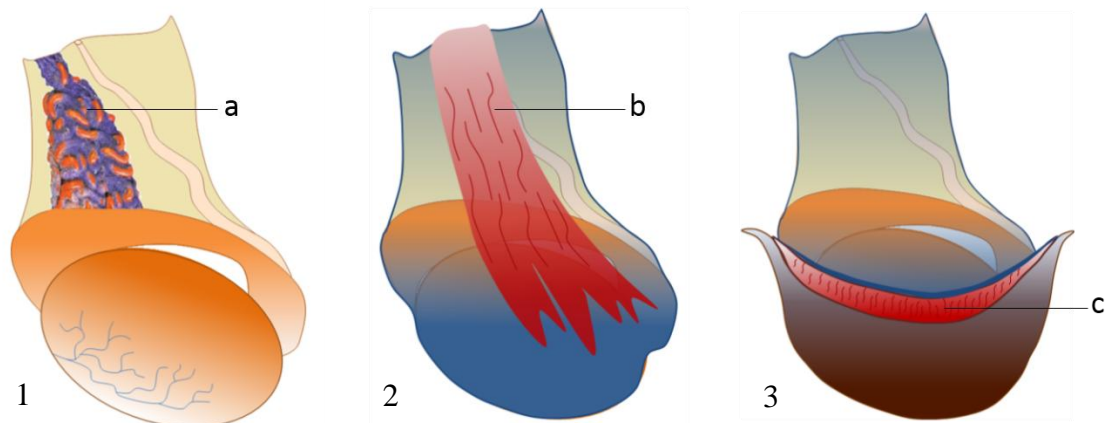


Figura 3. Mecanismos que asseguram a termorregulação testicular no garanhão. 1) Plexo pampiniforme (a) responsável pela retirada de calor do sangue que irriga o parênquima testicular. 2) Músculo cremaster (b) que ao contrair e relaxar suas fibras aproximam e afastam o testículo da cavidade pélvica, respectivamente. 3) Túnica dartos (c) que ao se contrair e relaxar, respectivamente, reduz e aumenta a superfície escrotal de troca de calor com o ambiente (Arquivo Pessoal).

#### 2.1.2.2. Espermatogênese

O parênquima testicular é composto basicamente pelos túbulos seminíferos e tecido intersticial (Junqueira e Carneiro, 2013). Cada túbulo é revestido internamente pelo epitélio seminífero, formado basicamente por células de sustentação (células de Sertoli), e germinativas em desenvolvimento, uma população proliferativa de células, que migram continuamente da periferia do túbulo para a superfície luminal à medida que se dividem ao se diferenciarem em espermatozoides (Dym, 1981; Johnson *et al.*, 1997).

Apesar de no passado ter sua função subestimada, atualmente é sabido que as células Sertoli possuem papel crucial no desenvolvimento normal dos espermatozoides (Johnson, 1990). Conhecidamente estas células participam na formação da barreira hemato-testicular e propiciam um microambiente necessário à espermatogênese; fornecem suporte estrutural e nutricional às células germinativas; movimentam as células germinativas em desenvolvimento; liberam e transportam espermatozoides; fagocitam células germinativas degeneradas e corpos citoplasmáticos residuais; secretam fluídos e proteínas para o desenvolvimento das células germinativas; intermedeiam a comunicação entre as diferentes gerações de um estágio celular; produzem hormônios e fatores

necessários à modulação da estereoidogênese e do funcionamento adequado da espermatogênese (Amann, 1981b; Griswold, 2016).

Externamente os túbulos seminíferos são circundados por uma lâmina basal e células mióides que ao se contraírem auxiliam no transporte dos espermatozoides até um local de convergência dos túbulos seminíferos, conhecido como *rede testis* (Johnson e Neaves, 1981). Os túbulos seminíferos encontram-se imersos em um tecido conjuntivo frouxo que abriga vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células de Leydig, também denominadas células intersticiais (Figura 4). Estas células são as maiores responsáveis pela estereoidogênese na gônada masculina (Junqueira e Carneiro, 2013).

A espermatogênese tem sido definida como um conjunto de eventos que ocorrem no testículo, onde uma célula diplóide germinativa com baixo grau de diferenciação origina células haplóides altamente especializadas: os espermatozoides (Johnson *et al.*, 1997). Este processo é dependente de mecanismos regulatórios endócrinos, parácrinos e autócrinos que coordenam de maneira equilibrada a proliferação celular, diferenciação e apoptose (Amman, 1981b).

Basicamente quatro tipos celulares integram o epitélio seminífero: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e os espermatozoides (Setchel, 1992; Russel, 1995). No início do desenvolvimento embrionário, células germinativas primordiais migram da região do saco vitelínico para as gônadas indiferenciadas. Depois de atingirem a gônada fetal, as células dividem-se várias vezes até formarem os gonócitos. No macho, um pouco antes da puberdade, estes gonócitos se diferenciam em espermatogônias (Garner e Hafez, 1993).

Por ocasião da puberdade, com o aumento das gonadotrofinas circulantes, as espermatogônias começam a se dividir e, normalmente, este processo continua por toda a vida do garanhão (Johnson *et al.*, 1997). Porém, consideráveis variações nas características seminais e no comportamento sexual do macho equino têm sido notadas e discutidas quanto suas relações com a idade e a sazonalidade (Pickett, 1993). Sendo a espermatogênese mais ativa durante a estação reprodutiva e menos intensa em animais idosos (Johnson *et al.*, 1997).

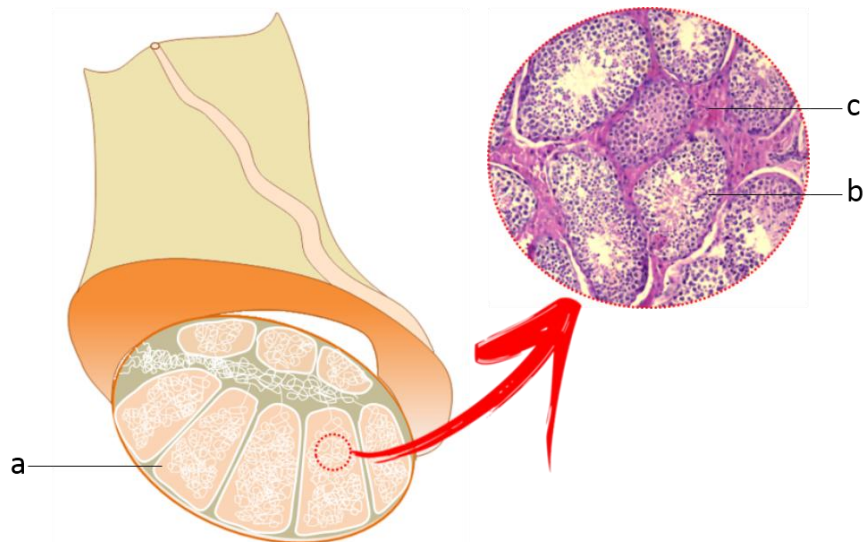


Figura 4. Ilustração do parênquima testicular, que é dividido em lóbulos (a) contendo os túbulos seminíferos e tecido intersticial. Em destaque um corte histológico corado em hematoxilina-eosina em um aumento de 100x em microscópio óptico de luz, demonstrando o parênquima testicular de um cavalo sadio, contendo túbulos seminíferos (b), revestidos internamente pelo epitélio germinativo e células de Sertoli, entremeados pelo tecido intersticial (c), constituído de tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e células de Leydig (Arquivo Pessoal).

O processo de espermatogênese pode ser categorizado em três fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese (Amann, 1981b; Little e Holyoak, 1992; Johnson et al., 1997). A espermatocitogênese se inicia com o desenvolvimento das células germinativas mais imaturas, as espermatogônias, e termina com a diferenciação destas em espermátócitos primários. As primeiras são células relativamente pequenas que povoam a porção basal do epitélio seminífero e são sustentadas pelas células de Sertoli (Junqueira e Carneiro, 2013). Ao iniciarem sua primeira divisão mitótica, as espermatogônias tipo-A originam células-filhas que podem seguir dois diferentes caminhos: permanecerem indiferenciadas como células-tronco ou diferenciar-se durante sucessivos ciclos de divisão, tornando-se espermatogônias tipo-B (Johnson *et al.*, 1997).

As espermatogônias que seguem o caminho da proliferação e, mais tarde diferenciação, apresentam alta taxa mitótica e, conseqüentemente, são mais sensíveis a agentes que afetam a espermatogênese (Amann, 1981b). Ao final da espermatocitogênese as espermatogônias do tipo B se diferenciam em espermátócitos primários pré-leptotenos e esta fase dura aproximadamente 15-19 dias (Birch, 2008).

Perdas de células germinativas ocorrem durante a espermatogênese na maioria dos mamíferos e defeitos podem ocorrer durante qualquer fase, porém as perdas são

maiores durante a espermatocitogênese e meiose, que levam a uma diminuição substancial do potencial de produção espermática dos ganhões (Johnson, 1990).

Acredita-se que a apoptose das células germinativas possa ser um evento normal de perda destas células nos ganhões adultos, mesmo naqueles sadios do ponto de vista reprodutivo (Heninger *et al.*, 2002), e uma redução natural do número de espermatogônias durante a proliferação é essencial para que as células de Sertoli possam suprir melhor as células que permanecem e dão continuidade ao processo (Johnson *et al.*, 1997).

Após sua formação, os espermatócitos pré-leptótenos entram na primeira divisão meiótica, a prófase (Amann, 1981b; Russel *et al.*, 1990), sendo esta um dos períodos mais demoradas da espermatogênese (Birch, 2008). Nesta fase os espermatócitos são capazes de duplicar seu DNA e apresentar atividade de recombinação genética (*crossing-over*) formando células diferentes do progenitor (Amann, 1981b; Russel *et al.*, 1990). Após a troca de fragmentos de DNA os espermatócitos primários se dividem em dois espermatócitos secundários possuindo metade do material genético inicial (32 cromossomos), porém os cromossomos ainda possuem cromátides irmãs. Posteriormente estas células se dividem novamente, separando as cromátides irmãs, para formarem quatro células haplóides, as espermatídes (Russel *et al.*, 1990). Desta forma, a fase meiótica é concluída e dura cerca de 20-22 dias nos equinos, passando por aproximadamente 10 dias na fase de espermatócito inicial e 12 dias na fase de espermatócito secundário (Swierstra *et al.*, 1974; Amann, 1981b).

A espermiogênese é a etapa final da produção espermática. Nela ocorre a transformação de espermatídes iniciais (células redondas) em espermatozoides, células altamente especializadas, dotadas de um formato e compartimentos celulares bastante peculiares e portadoras do material genético paterno que será transferida ao oócito no momento da fecundação (Junqueira e Carneiro, 2013). Estas células sofrem alterações morfológicas progressivas até se transformarem em espermatozoides (Figura 5), porém nesta fase não há divisões celulares (Barth e Oko, 1992).

As espermatídes possuem tamanho e núcleo pequeno, dado à condensação da cromatina já evidente, e situam-se próximas ao lúmen do túbulo seminífero. Durante a espermiogênese ocorre a formação do acrossomo, condensação e alongamento nuclear, desenvolvimento do flagelo, organização mitocondrial na peça intermediária e perda de citoplasma (Kretser e Kerr, 1994, Junqueira e Carneiro, 2013). Após aproximadamente 15 dias sofrendo inúmeras transformações (Swierstra *et al.*, 1974), os espermatozoides são produzidos e em seguida são liberados na luz do túbulo seminífero por ação das



células de Sertoli, num processo conhecido como espermiacção (Johnson *et al.*, 1997). A espermiacção acontece ainda com a presença da gota citoplasmática proximal aderida aos espermatozoides, mantendo-se durante o trânsito pela *rete testis*, ducto eferente e cabeça do epidídimo (Little e Holyoak, 1992).

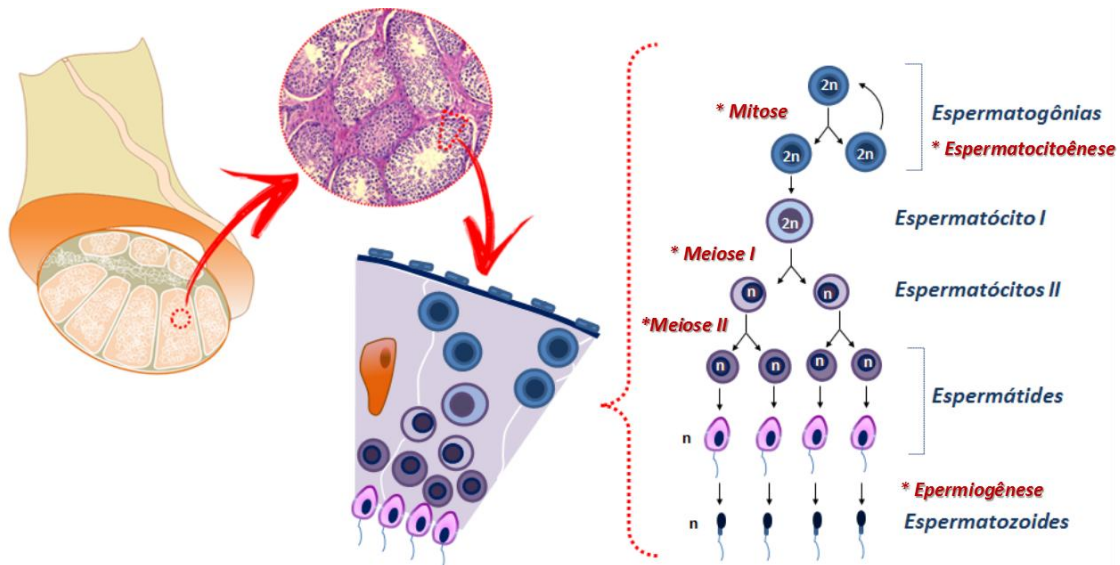


Figura 5. Ilustração do processo de formação de gametas masculinos (espermatogênese). Na primeira fase (espermatocitogênese) parte das espermatogônias dividem-se ativamente por mitose e se diferenciam em espermatogônias tipo B. Esta linhagem aumenta seu volume e se diferencia em espermatócitos primários pré-leptotenos que realizam a meiose I se dividindo em dois espermatócitos secundários, com metade do material genético inicial. Estas novas células sofrem meiose II, equacionando as cromátides irmãs, dando origem a quatro espermátides também haplóides. As espermátides sofrem diversas modificações estruturais (espermiogênese) e transformam-se em espermatozoides. No final do processo há a liberação dos espermatozoides na luz do túbulo seminífero, fenômeno conhecido como espermiacção (Arquivo Pessoal).

Após a espermatogênese, os espermatozoides ainda não são capazes de fertilizar o oócito e essa capacidade é adquirida durante o trânsito epididimário, onde sucessivas modificações morfofuncionais contribuem para sua maturação (Dacheux *et al.*, 2003). Durante o trânsito de aproximadamente 9-12 dias no epidídimo equino – passando sequencialmente pela cabeça, corpo e cauda – o gameta masculino recebe diversas micro e macromoléculas que conferem motilidade, habilidade de reconhecer e ligar-se a zona pelúcida e capacidade de fusão com o oócito (Swierstra *et al.*, 1974; Gatti *et al.*, 2004).

### 2.1.2.3. Endocrinologia da reprodução

A função reprodutiva masculina é controlada pelo sistema neuroendócrino, constituído pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). Os componentes desse eixo se inter-relacionam de forma sincrônica e harmônica, por meio da secreção de mensageiros químicos – os neurotransmissores, hormônios e os neuromônios – que ditam o ritmo e intensidade da produção de espermatozoides e de hormônios sexuais pela gônada masculina.

Outros mecanismos de regulação local da função testicular contribuem para a função gonadal, como a regulação parácrina, onde um fator produzido por uma célula atua na vizinha, e autócrina, quando o fator produzido pela célula atua nela mesma (Holdcraft e Braun 2004; Roser, 2008). Diversas proteínas, esteroides e peptídeos parecem estar envolvidos nesse sistema regulatório, como os próprios hormônios sexuais testosterona e estrógeno, além da inibina, ativina, interleucinas, fatores de crescimento, transferrinas e fatores de diferenciação celular, que agem em células vizinhas ou na própria célula secretora. Embora identificados, a maneira exata como esses fatores se relacionam e atuam modulando a função intra-testicular dos equinos ainda não foi completamente elucidada (Spiteri-Grech e Nieschlag, 1993; Roser, 2001).

O primeiro integrante do eixo HHG, o hipotálamo, é parte integrante do diencefalo do cérebro e é constituído de neurônios que produzem diversos hormônios que atuam controlando o metabolismo e funcionamento corporal, entre eles o GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) e a Ocitocina. O GnRH produzido é lançado diretamente na circulação porta hipotalâmica-hipofisária, chegando rapidamente à hipófise, sem passar pela circulação sistêmica. Já a ocitocina é conduzida pelos axônios neuronais até a neurohipófise, sendo liberadas na corrente sanguínea sistêmica ou ficando armazenada até que seja demandada (Senger, 2003).

Regiões hipotalâmicas distintas estão relacionadas à secreção do GnRH em dois padrões: o centro controlador de secreção tônica, que secreta GnRH de forma basal e contínua, estimulando a liberação predominante de FSH na hipófise, e o centro controlador de secreção episódica, que secreta elevada quantidade de GnRH de forma pontual e estimula, assim, a liberação predominante de LH pela hipófise (Thompson, 1985 e Roser, 2008).

O segundo integrante do eixo HHG, a hipófise, conecta-se ao hipotálamo pelo pedículo hipofisário e é formada por duas regiões: região anterior ou adenohipófise, constituída por células glandulares; e a região posterior ou neurohipófise, constituída por

terminações dos axônios neuronais hipotalâmicos (Reimers, 2003). É na adenohipófise que a maioria dos hormônios que regulam as atividades corporais são produzidos e secretados. Dentre diversas células glandulares que povoam essa região, como as corticotróficas (produtoras de ACTH), somatotróficas (produtoras de GH), tireotróficas (produtoras de TSH), nesta região também situam-se células gonadotróficas que regulam a função reprodutiva, uma vez que sintetizam e liberam os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) e, também, as células mamotróficas, responsáveis pela produção de prolactina (Hafez e Hafez, 2004).

Quando os hormônios FSH e LH são lançados na corrente sanguínea, eles encontram seus receptores na membrana de células do parênquima testicular, estimulando a produção dos hormônios sexuais e de espermatozoides. Sendo assim, o terceiro elemento deste eixo neuroendócrino é a gônada masculina (Amann, 2011).

Sob estímulo do LH, que chega ao testículo via artéria testicular, as células de Leydig produzem hormônios esteroides: andrógenos e estrógenos. Já as células de Sertoli são estimuladas pelo FSH a produzirem as glicoproteínas inibina e ativina, além da proteína ligadora de andrógenos ABP, que se liga à testosterona para manter as concentrações deste hormônio elevadas no interior da gônada, permitindo que apenas uma parte deste hormônio alcance os vasos sanguíneos para ser distribuído para todo o organismo (Hall, 1988). As células de Sertoli, ainda, são capazes de converter andrógenos a estrogênios quando necessário (Thompson, 1985) e atuam coordenando espermatogênese, nutrindo as células germinativas e as protegendo do sistema imune (Fawcett, 1973; Berndtson, 1983; Amann, 2011).

A testosterona desempenha papel fundamental na espermatogênese, no funcionamento dos epidídimos e glândulas sexuais acessórias, assim como, na expressão de características sexuais primárias, secundárias e libido (Berndtson, 1983; Hall, 1988). A concentração elevada deste esteróide intra-testicular é fundamental para a manutenção e qualidade da espermatogênese, enquanto que o FSH influencia a quantidade de espermatozoides produzidos (Roser, 2001).

Apesar do papel do estrógeno na espermatogênese ainda não estar bem definido, este hormônio parece ter enorme importância na produção dos espermatozoides, principalmente nos garanhões, onde é produzido em quantidades atipicamente elevadas, comparado às demais espécies. Alguns estudos apontam uma ação na modulação da espermatogênese de forma local, por ação parácrina-autócrina deste esteroide (Roser, 2001; Roser, 2008).

Para que ocorra a manutenção da homeostase testicular, é necessário um equilíbrio da atividade endócrina de cada integrante do eixo HHG, de forma a ativar ou inibir a liberação dos mensageiros químicos envolvidos, conforme seus requerimentos, por mecanismos regulatórios denominados *feedbacks* positivo e negativo, respectivamente (Hafez e Hafez, 2004).

Thompson *et al.* (1979) observaram que cavalos castrados tratados com estradiol ou testosterona tiveram redução dos níveis circulantes de FSH. Estudos *in vitro* demonstraram que o  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) promove *feedback* positivo na liberação de LH e *feedback* negativo na secreção de FSH. A hipótese mais aceita é a que o estrógeno atue no hipotálamo, alterando a amplitude e frequência de liberação de GnRH, modificando assim, a relação de LH e FSH secretados pela adenohipófise, como observado em ratos e primatas (Thompson, 1979; Roser, 2001; Roser, 2008). Embora a testosterona não tenha efeito no estímulo à liberação de LH, a secreção de FSH também é modulada negativamente pelos níveis circulantes deste esteroide (Holdcraft, 2004). A inibina secretada pelas células de Sertoli parece auxiliar na diminuição da secreção de FSH em equinos (Roser, 2001), enquanto a ativina, sob estímulo do FSH, atua na hipófise anterior estimulando uma maior secreção deste hormônio, em um mecanismo de retroalimentação positiva (Holdcraft, 2004; Roser, 2008).

No garanhão, a liberação de LH está positivamente correlacionada com o comprimento do dia, ocorrendo a elevação das concentrações deste hormônio no início da estação reprodutiva. As concentrações basais de LH no verão são duas vezes maiores do que na temporada de inverno (Gerlach e Aurich, 2000). Há relatos conflitantes sobre mudanças sazonais de FSH no garanhão. As concentrações médias de FSH plasmática nos garanhões são relativamente constantes ao longo do ano e apenas experimentam pequenos aumentos durante a estação reprodutiva (Roser, 2001).

Além destas alterações sazonais durante a primavera e verão, acontece um aumento no tamanho e peso testicular, na produção e liberação de espermatozoides, nas concentrações de testosterona,  $17\beta$ -estradiol, inibina e prolactina e uma visível melhora na libido dos garanhões (Thompson *et al.*, 1978, Clay, 1988). Por esse motivo, o garanhão tem sido classificado como um reprodutor de dias longos, já que sua máxima capacidade reprodutiva é atingida durante períodos de aumento gradual no comprimento dos dias (Clay *et al.*, 1987; Roser, 2001). Entretanto, ao contrário das éguas que se tornam anovulatórias fora da estação reprodutiva, os garanhões não são azoospérmicos durante este mesmo período (Clay *et al.*, 1988; Berson *et al.*, 2002; Schrammel *et al.*, 2016).

Sinais luminosos ambientais são captados pela retina e convertidos em sinais nervosos que são conduzidos pelo nervo óptico ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo, e daí para o gânglio cervical superior, de onde as fibras ganglionares posteriores alcançam, finalmente, a glândula pineal (Hafez e Hafez, 2004). Na espécie equina o aumento da luminosidade provoca diminuição da secreção de melatonina pela glândula pineal, estimulando o hipotálamo a secretar GnRH em maiores quantidades, ativando o eixo HHG (Figura 6), aumentando a atividade gonadal (Ewing, 1977). Apesar destas características serem bem visualizadas em garanhões situados em regiões temperadas, onde as estações do ano são bem definidas, estudos desenvolvidos no em regiões tropicais não encontraram diferenças quanto ao tamanho testicular, libido e qualidade seminal, sugerindo que nessas regiões o efeito da sazonalidade no macho equino é bastante questionável, o que pode ser explicado pela pequena diferença no comprimento dos dias entre as estações do ano nessas localidades (Leme *et al.*, 2012).

Além de variações no fotoperíodo, diversos outros fatores podem influenciar no controle do eixo HHG como a disponibilidade de alimentos, manejo, presença de outros reprodutores, distúrbios em componentes que participam do eixo, entre outros (Irvine et al, 1986).

Tratamentos exógenos com a ocitocina, pouco antes da ejaculação, aumentaram o número de espermatozoides na ejaculação de touros, carneiros, coelhos e ratos, sugerindo que este efeito seja mediado por uma resposta contrátil nos testículos e ductos excorrentes, o que aumenta o transporte espermático. Dessa forma, o papel desse hormônio no sistema reprodutor masculino parece estar relacionado ao controle do trânsito espermático, além de aumentar a secreção de fluídos pelas glândulas sexuais acessórias (Watson et al., 1999).

A prolactina possui receptores no testículo e glândulas sexuais acessórias e parece estimular a expressão e manutenção de receptores de LH nas células de Leydig e também da fixação do LH a esses receptores, aumentando a síntese e secreção de testosterona (Roser, 2001).

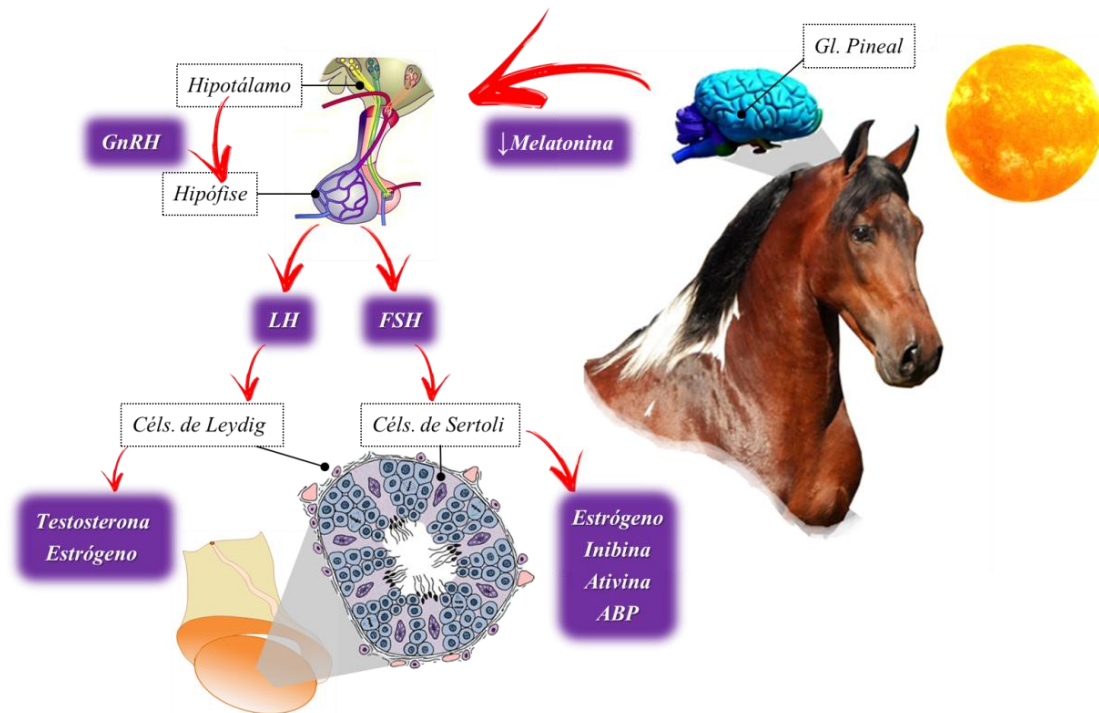


Figura 6. O aumento do fotoperíodo promove uma diminuição de melatonina circulante, reativando os centros hipotalâmicos que passam a secretar maiores quantidades de GnRH. Este hormônio atua na adenohipófise estimulando a liberação de LH e FSH. O LH, por sua vez, estimula a síntese dos hormônios esteroides testosterona e estrógeno nas células de Leydig. Já o FSH atua nas células de Sertoli, promovendo a secreção de inibina, ativina e ABP e a modulação da estereoidogênese, estimulando a produção de estrógeno (Arquivo Pessoal).

O hormônio anti-Mulleriano (AMH) é uma glicoproteína também produzida e secretada pelas células de Sertoli e inibe o desenvolvimento dos ductos de Muller no feto masculino (Cate *et al.*, 1986). No entanto, muitos estudos têm demonstrado que o AMH tem um papel importante durante diferentes processos fisiológicos após o nascimento (Rey *et al.*, 2003; Ball *et al.*, 2008b; Claes *et al.*, 2013). As concentrações periféricas de AMH são significativamente maiores em animais pré-púberes do que nos pós-púberes e variam de forma sazonal em machos maduros influenciados pelo fotoperíodo, apresentando concentrações mais elevadas durante a estação reprodutiva (Claes *et al.*, 2013).

Este hormônio tem papel importante na diferenciação das células de Leydig e regulação da esteroidogênese, diminuindo a expressão do RNA mensageiro da enzima citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase / C17-20 lase, diminuindo a conversão de pregnenolona a testosterona (Rey *et al.*, 1993).

Além disso, as concentrações séricas de AMH foram significativamente mais elevadas em garanhões criptorquidas, em comparação a garanhões intactos ou castrados, (Ball *et al.*, 2008b; Murase *et al.*, 2015) e em cães que apresentam neoplasia das células de Sertoli, tumor conhecido como sertolioma, funcionando como um biomarcador para estas condições (Holst e Dreimanis, 2015). Embora conhecido com um marcador de perturbações às células de Sertoli, ainda não foram desenvolvidos estudos que avaliaram as concentrações do AMH em casos de degeneração testicular em equinos (Ball *et al.*, 2008b; Claes *et al.*, 2013).

O controle neuroendócrino, associado aos mecanismos de regulação local da atividade reprodutiva nos machos, podem ser facilmente perturbados pela administração de esteróides sintéticos ou por disfunções em componentes do eixo HHG, interferindo na libido e fertilidade do reprodutor. Dessa forma, o conhecimento da fisiologia e endocrinologia reprodutiva é fundamental para um correto manejo e para o reconhecimento da origem de algumas alterações no trato genital ou no sêmen do macho (Roser, 2008).

## **2.2. Degeneração Testicular (DT)**

A degeneração testicular (DT) pode ser definida como o processo patológico que provoca a deterioração e perda da arquitetura histológica do parênquima testicular, resultando em produção anormal de espermatozoides, com consequente perda da função da gônada masculina (Turner, 2007).

### **2.2.1. Incidência**

A DT é a alteração mais frequente e que mais contribui para a infertilidade dos machos mamíferos terrestres. Isso se deve ao fato do epitélio seminífero ser extremamente sensível a adversidades externas e internas (Amann, 1981b; Setchel, 1998). Nos equinos, a incidência da DT não é diferente, correspondendo à principal enfermidade reprodutiva adquirida a causar subfertilidade e infertilidade nesta espécie. Como tal, gera grandes perdas econômicas nesta indústria devido à redução nas taxas de fertilidade e perda de valiosa genética do macho infértil (Turner, 2007).

Os custos associados a um garanhão com baixa fertilidade surgem a partir do aumento do custo por potro nascido, devido à necessidade de coberturas extras ou maior número de transportes de sêmen, exames e tratamentos, serviços veterinários, diárias dos animais em centrais ou haras, além dos custos de manutenção de éguas não prenhas,

impactando esta cadeia produtiva como um todo (Blanchard e Varner, 1997).

### **2.2.2. Etiologia**

A DT pode ser dividida em duas grandes categorias: DT adquirida, quando resulta de um insulto testicular conhecido; e degeneração testicular idiopática (DTI), também denominada senil ou idade-relacionada, quando não há uma causa aparente e geralmente ocorre em garanhões idosos (Turner, 2007; Birch 2008).

Uma grande variedade de fatores etiológicos pode resultar em DT adquirida, incluindo estresse térmico ambiental, estresse térmico escrotal, inflamações e infecções no escroto ou em seus componentes, febre, trauma, neoplasias, torção testicular, hérnia ínguino-escrotal, exposição a toxinas, distúrbios endócrinos, deficiências nutricionais e tratamentos medicamentosos, especialmente esteroides anabólicos e antiinflamatórios (Edwards, 2008; Turner, 2007; Beard, 2011). Em muitos casos alguns destes fatores podem atuar em sinergismo para o estabelecimento de problemas circulatórios locais e falhas na termorregulação testicular (Edwards, 2008).

A DT é, portanto, causada por processos que precedem o dano testicular, não sendo uma afecção primária e sim o resultado de doenças que se refletem secundariamente na gônada masculina. É possível que as diferentes formas da DT constituam um grupo heterogêneo de doenças que levam todos a um ponto final comum, a deterioração do parênquima do testículo (Turner, 2003; Turner, 2007; Edwards, 2008).

Entretanto, em muitos casos não se consegue chegar a uma conclusão quanto ao agente causal, principalmente em garanhões de meia-idade ou senis, sendo esta denominada de DT idiopática. Nesse caso, observam-se alterações vasculares degenerativas que se processam de forma progressiva e que frequentemente evoluem para os quadros de sub ou infertilidade, comuns aos animais idosos (Turner, 2007; Turner e Zang, 2012).

Os processos degenerativos podem ser ainda classificados como bilaterais ou unilaterais de acordo com a sua localização; em discretos, moderados ou severos, dependendo da gravidade; ou ainda em temporários ou permanentes, quanto à duração da injúria (Beard, 2011).

Geralmente, quando unilateral está associada a algum tipo de insulto local, como trauma, infecção ou neoplasia, enquanto que em insultos sistêmicos (como episódios de febre, estresse térmico, exposição a toxinas e administração de androgênios exógenos), ambos os testículos são acometidos. Já a degeneração idiopática sempre abrange ambos



os testículos de maneira uniforme e possui causa genética com transmissão hereditária, que tem sido intensamente investigada recentemente (Turner, 2007). Geralmente a DTI leva à deterioração progressiva do parênquima testicular, resultando invariavelmente em um declínio da fertilidade e, muitas vezes, completa infertilidade (Turner e Zang, 2012).

A extensão da DT é frequentemente determinada pelo tempo de permanência e gravidade do insulto. Se a causa do processo for removida e o testículo for apenas brevemente afetado, o parênquima testicular tende a se recuperar completamente. Mesmo se o testículo for gravemente afetado, quando a causa é retirada, o processo degenerativo geralmente não progride ainda que a função testicular não seja completamente recuperada (Turner, 2007). O reestabelecimento da função testicular, por meio do retorno da homeostase escrotal, é possível, pois as espermatogônias-tronco, células de Sertoli e de Leydig possuem maior resistência aos insultos gonadais, permitindo o retorno da espermatogênese em aproximadamente 60 dias (Lagerlof, 1938; Nascimento e Santos, 2003).

#### **2.2.2.1. Estresse térmico escrotal**

O incremento da temperatura escrotal consiste na fonte dos problemas mais recorrentes da espermatogênese (Alvarenga e Papa, 2009). Todos os tecidos são susceptíveis a danos causados pelo calor, no entanto, os testículos são incomuns, pois são danificados pela exposição às temperaturas normalmente encontradas no abdômen (Setchell, 1998). Embora se originem dentro da cavidade abdominal em muitos mamíferos as gônadas masculinas descem para o escroto ainda durante o desenvolvimento fetal ou neonatal (Beaupré et al, 1997). O fato de se localizarem dentro do escroto, fora da cavidade abdominal, em condições fisiológicas, se deve justamente à necessidade de funcionar a uma temperatura diferente dos demais órgãos corporais (Setchell, 1978; Waites and Setchell, 1990). Evidências de que a temperatura testicular é menor do que a temperatura corporal são bem estabelecidas e documentadas na maioria dos mamíferos terrestres. Entretanto, o exato mecanismo do efeito nocivo do calor ao parênquima testicular ainda é discutido e não totalmente elucidado (Setchell, 1998).

Algumas técnicas já foram descritas para estudar os efeitos do calor sobre a gônada masculina em diversas espécies, como por aquecimento integral do corpo (Ray et al., 1968; Magai et al., 1981; Zelst *et al.*, 1995; Mawyer *et al.*, 2012; Ramires-Neto *et al.*, 2013); aquecimento local dos testículos por criptorquidia induzida, varicocele

induzida, insulação escrotal ou imersão do escroto em banho-maria; e aquecimento de tecidos ou preparações celulares *in vitro* (Setchell, 1998).

As consequências do estresse térmico escrotal já foram estudadas em bovinos (Austin *et al.*, 1961; Gerona *et al.*, 1970; Ross *et al.*, 1979; Vogler *et al.*, 1991; Kastelic *et al.*, 1996; Kastelic *et al.*, 1997a e b; Fernandes *et al.*, 2008); Ovinos (Kastelic *et al.*, 1999; Rasooli *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2016; Hamilton *et al.*, 2016); Caprinos (Glover, 1955; Braden *et al.*, 1970; Williamson, 1974; e Bayers *et al.*, 1984); Equinos (Freidman *et al.*, 1991; Leme, 1998; Love e Kenney, 1999; Blanchard *et al.*, 1996; 2000); Ratos (Yin *et al.*, 1997; 1998; Lue *et al.*, 1999; Rockett *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2013) e Primatas (Lue *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2007).

Em ratos, poucas horas de aquecimento (de 15 a 60 minutos) foram suficientes para causar alterações da termorregulação e comprometer a espermatogênese, levando à degeneração testicular (Yin *et al.*, 1997; 1998; Lue *et al.*, 1999; Rockett *et al.*, 2001). Em equinos os métodos utilizados para induzir o estresse térmico escrotal consistiram no uso de um tecido de lã ao redor do testículo durante 24 a 48 horas (Freidman *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 1996) ou no uso de bolsa térmica contendo água aquecida em contato com a região escrotal (Leme, 1998).

Inúmeros efeitos do estresse térmico sobre o testículo foram descritos, como a alterações do peso, histologia, bioquímica e endocrinologia; diminuição do número, motilidade, viabilidade, morfologia e capacidade de fertilização espermática; e baixa qualidade dos embriões gerados (Vogler *et al.*, 1991; 1993; Barth e Bowman 1994; DeJarnette *et al.*, 2000; Thundathil *et al.*, 2000; 2001; Brito *et al.*, 2004; Walters *et al.*, 2005; 2006; Fernandes *et al.*, 2008; Newton *et al.*, 2009).

A exposição ao calor induz à formação anormal de espermatozoides, produzindo um gameta que pode ser capaz de fertilizar, mas o embrião morre durante seu desenvolvimento (Gabaldi e Wolf, 2002). Em ratos Perez-Crespo *et al.* (2008), Yin *et al.* (1997) e Yaeram *et al.* (2006) demonstraram que espermatozoides gerados de células germinativas expostas à hipertermia contém DNA danificado, são susceptíveis à apoptose e possuem baixa capacidade fertilizante *in vivo* e *in vitro*.

Estudos que avaliaram gônadas retidas no abdômen ou no canal inguinal de animais criptorquidas, demonstraram que estes testículos são menores do que os escrotais (Bishop *et al.*, 1964; Arighi *et al.*, 1987; Al-Bagdadi *et al.*, 1991; Aupperle *et al.*, 1999) e, histologicamente, são semelhantes aos testículos com degeneração avançada do epitélio seminífero (Nascimento e Santos, 2003). Dentre as alterações, vacuolização de células

germinativas (Arighi *et al.*, 1987; Al-Bagdadi *et al.*, 1991), aumento do tecido conjuntivo intersticial (Al-Bagdadi *et al.*, 1991; Nascimento e Santos, 2003), discreta hiperplasia das células intersticiais de Leydig (Nascimento e Santos, 2003), redução no diâmetro dos túbulos seminíferos (Coryn *et al.*, 1981; Arighi *et al.*, 1987) e no número de camadas de células espermatogênicas (Arighi *et al.*, 1987), foram demonstradas. Na maioria desses animais observou-se interrupção da espermatogênese e infertilidade, entretanto, a concentração sérica de testosterona apresentou-se similar a de ganhões normais (Coryn *et al.*, 1981; Arighi *et al.*, 1986; Cattelan, 2002).

Quando a temperatura do ar em que o animal está submetido excede 40° C, a temperatura escrotal aumenta para valores normalmente encontrados no abdômen. Nessas condições a evaporação do suor da pele escrotal não é eficiente em manter a o escroto mais frio, levando a um aquecimento testicular (Setchell e Mieusset, 1996). Em situações onde há eventos de febre ou aumento local na temperatura testicular, devido a condições ambientais ou patológicas, como infecções, trauma, hidrocele, dermatite da pele escrotal (Blanchard *et al.*, 1996), neoplasias e torção testicular (Ball, 2008a), o animal pode não conseguir manter uma temperatura escrotal dentro dos limites ideais, mesmo que os processos de regulação da temperatura intra-testicular permaneçam ocorrendo (Moule e Waites, 1963). Qualquer fator que interfira nos mecanismos de termorregulação, seja na perda de calor pela superfície escrotal, na contração das musculaturas dartos e cremaster ou ainda na troca de calor entre o plexo pampiniforme e artéria testicular, comprometem a manutenção da temperatura testicular (Amann, 2011).

No Brasil a DT é uma condição bastante frequente na clínica equina e, dentre os inúmeros agentes causais, a babesiose, que é endêmica no país, ocupa posição de destaque, não pela doença em si, mas pelos picos febris que esta ocasiona. Estes picos podem ser bastante elevados atingindo temperaturas corporais próximas de 41° C (Alvarenga e Papa, 2009). A elevação da temperatura ambiente tem sido referenciada como o principal fator de subfertilidade em reprodutores bovinos (Kastelic *et al.*, 1997b).

Ramires-Neto *et al.* (2013) compararam a temperatura corporal com a temperatura da superfície escrotal de ganhões férteis, por termografia, antes e após uma hora de exposição ao sol (no período de maior intensidade de calor do dia). Nesse estudo, os autores não observaram aumento da temperatura da superfície escrotal entre os dois momentos avaliados, ainda que a temperatura corporal tenha sofrido incremento. Com isso, demonstraram a eficiência na termorregulação testicular de ganhões férteis em situações de aumento da temperatura ambiental. O aumento da temperatura corporal, sem

umentar significativamente a temperatura escrotal, também foi observado por Mawyer *et al.* (2012) em Mini-horses antes e após exercício físico utilizando sensores subcutâneos.

Em homens, diversos fatores podem contribuir para o estresse térmico testicular. Esses fatores termogênicos são categorizados em: fatores ligados ao estilo de vida e comportamento, como vestimentas, postura corporal, frequência a saunas e banhos quentes, uso de laptop sobre a região pélvica, prática de ciclismo e obesidade; fatores ocupacionais e ambientais, como profissões que lidam constantemente com o calor, longos deslocamentos sentado e exposição ao calor ambiental; e fatores clínicos resultantes de condições fisiopatológicas, como criptorquidismo, varicocele e episódios de febre (Durairajanayagam *et al.*, 2015).

A análise individual de ganhões mostrou que cavalos naturalmente com maiores temperaturas testiculares têm uma maior ocorrência de alterações na morfologia do espermatozoide (Ramires-Neto *et al.*, 2013). Este efeito também foi relatado por Mieusset *et al.* (1987), ao observarem que a temperatura média escrotal em homens inférteis é maior do que em homens férteis e notaram que a qualidade espermática deteriora-se ainda mais em temperaturas escrotais mais elevadas. Wang *et al.* (1997) observaram que o aumento escrotal de 1° C em homens, implica em uma redução de 14% na espermatogênese e conseqüentemente em uma menor produção de espermatozoides.

A elevação dos defeitos espermáticos em decorrência do estresse térmico escrotal é consistente com relatos de pesquisas em bovinos onde Fernandes *et al.* (2008) e Vogler *et al.* (1991) observaram uma redução na qualidade do sêmen com aumento de defeitos espermáticos a partir de duas semanas após insulação escrotal. Entre as células germinativas, os tipos mais vulneráveis ao calor são os espermatócitos nos estágios de paquíteno e diplóteno e as espermátides iniciais redondas (Lue *et al.*, 1999; Carlsen *et al.*, 2003). As espermatogônias são mais resistentes ao estresse térmico do que as outras células da linhagem germinativa, por isso é possível obter uma recuperação do epitélio seminífero dentro de dois meses, tempo aproximado da espermatogênese (Turner, 2007). As células somáticas, de Leydig e Sertoli, também são mais resistentes ao estresse por calor, sendo apenas afetadas em casos severos de degeneração testicular. Por isso, geralmente as concentrações dos hormônios esteróides não são alteradas após insulto térmico testicular (Setchell, 1998; Arighi *et al.*, 1986; Cattelan, 2002).

Por ser um mecanismo único e altamente especializado, a produção de espermatozoides ocorre em condições próprias bastante específicas. Existem muitas

hipóteses sobre a necessidade da espermatogênese ocorrer em temperatura inferior à abdominal, já que na maioria dos mamíferos, os testículos são mantidos no escroto de dois a oito graus Celsius abaixo da temperatura corporal (Takahashi, 2012; Kim et al., 2013).

#### Primeira Teoria

A primeira teoria advém do fato de o processo espermatogênico se desenvolver com um suprimento de sangue e oxigênio bastante limitado em condições fisiológicas e, conseqüentemente, ser sensível às variações que possam ocorrer no suprimento deste elemento. Por esse motivo, geralmente o fluxo sanguíneo testicular ocorre de maneira bastante independente de mudanças em outros leitos vasculares do corpo (Setchell, 1998).

As elevadas taxas de divisões celulares inerentes à espermatogênese implicam em taxas correspondentemente elevadas de consumo de oxigênio mitocondrial pelo epitélio germinativo. No entanto, a limitada vascularização dos testículos resulta em baixa tensão de oxigênio neste tecido, gerando uma intensa competição por esse elemento vital (Freeman et al., 1990; Setchell, 1998; Pérez-Crespo et al., 2008; Hansen, 2009; Paul et al., 2009). Por esse motivo, de forma a funcionar adequadamente, este órgão possui um limiar muito baixo em permitir variações nas taxas de suprimento sanguíneo. Em temperaturas mais elevadas o metabolismo celular é aumentado, porém o fluxo sanguíneo ao testículo não aumenta na mesma proporção, com isto, a hipóxia celular é estabelecida levando a danos celulares (Free *et al.*, 1976; Peltola *et al.*, 1995; Setchell, 1998; Pérez-Crespo et al., 2008; Paul et al., 2009; Reyes *et al.*, 2012; Queiroz et al., 2013; Alves et al., 2016). Apesar desta hipótese ter sido levantada por diversos autores, há divergências na literatura quanto ao real efeito da hipóxia na espermatogênese.

Estudo conduzido por Kastelic *et al.* (2008) demonstrou que ratos submetidos a estresse térmico em ambiente com elevada saturação de oxigênio (hiperóxia), não foram beneficiados, apresentando lesões degenerativas testiculares e deterioração do sêmen semelhantes aos ratos em normóxia ou hipóxia. Este mesmo estudo foi repetido por Kastelic e colaboradores (dados não publicados) em carneiros, sendo estes submetidos à insulação escrotal e diferentes saturações de oxigênio no ambiente, e o mesmo resultado do experimento anterior foi obtido. Com isso, os autores concluíram que as lesões testiculares promovidas em condições de aumento da temperatura ambiental ou local se devem mais à hipertermia do que à hipóxia testicular.

Entretanto, Yao et al. (2016) demonstraram que ratos submetidos a hipóxia hipobárica intermitente, situação semelhante encontrada em locais com altas altitudes, apresentaram importantes alterações seminais, como redução da densidade e motilidade espermática; alterações testiculares, como diminuição da imunoexpressão de enzimas androgênicas (3 $\beta$ -HSD e STAR) e desorganização e redução do epitélio seminífero; modificações bioquímicas locais, tal como a redução da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) no parênquima testicular; e finalmente alterações bioquímicas sistêmicas, tais como elevação na peroxidação lipídica sérica, concluindo que a hipóxia leva sim a alterações importantes, induzidas por estresse oxidativo.

### Segunda Teoria

A segunda teoria está atrelada à primeira e diz respeito às mudanças no metabolismo energético celular após o estresse térmico da gônada masculina. Existem poucas investigações sobre as alterações bioquímicas e metabólicas que precedem as alterações histológicas nos testículos sob estresse térmico (Schanbacher, 1966). Estudos metabólicos *in vitro* sugerem que o aumento da temperatura, modifica a via de geração de energia nas células germinativas, aumentando a utilização da via anaeróbica, devido ao limitado suprimento de oxigênio e substrato orgânico para a respiração celular nessa situação (Ewing and VanDemark, 1960; Ewing and VanDemark, 1961; Ewing and VanDemark, 1963; Davis and Morris, 1963; Le Vier, 1968). De acordo com esta hipótese, o aumento da temperatura testicular modifica a atividade de determinadas enzimas metabolizadoras da glicose antes das alterações histológicas no tecido.

Ewing e VanDemark (1960; 1961; 1963) atribuem os danos espermatozoides, causados pelo aumento da temperatura testicular, a um transtorno no metabolismo da glicose, já que o testículo é mais dependente da glicose exógena do que qualquer outro tecido estudado. A demonstração de que a hipoglicemia aguda causa danos severos ao epitélio germinativo em ratos adultos, suporta o conceito de que a falta deste substrato resulta em degeneração testicular (Mancini et al., 1960). O fluxo sanguíneo testicular é apenas adequado para fornecer oxigênio e glicose para os processos metabólicos em animais com testículos em temperatura inferior a corporal. Sendo assim, o alto metabolismo oxidativo e a baixa tensão de oxigênio podem favorecer o metabolismo anaeróbico por glicólise em condições de estresse térmico (Schanbacher, 1966). Essa hipótese é reforçada ao se constatar que a principal via de produção energética no testículo de galos, localizados fisiologicamente no abdômen, ocorre por glicólise. Em contraste, os

testículos de coelho localizados no escroto metabolizam a glicose pela via aeróbia de forma preferencial (Baldwin e Ewing, 1967).

Portanto, a exposição do testículo escrotal a temperaturas mais elevadas, como a da cavidade corporal, aumenta o metabolismo oxidativo e concomitantemente reduz a tensão de oxigênio no líquido extracelular, ativando a via glicolítica anaeróbica. Em determinado momento a demanda por glicose passa a ser maior do que a circulação testicular fornece ao testículo. Estas circunstâncias criam uma demanda adicional de glicose e, conseqüentemente, este substrato torna-se limitante da velocidade de eventos celulares, como da divisão e modificações celulares requeridas para a espermatogênese (Ewing and VanDemark, 1960; 1961; 1963; Davis and Morris, 1963; Schanbacher, 1966; Baldwin e Ewing, 1967; Le Vier, 1968) que invariavelmente cessa na ausência de energia (Moore, 1951). Além disso, a via glicolítica é menos eficiente na geração de energia para a célula do que a respiração celular.

Dessa forma, o impedimento da espermatogênese em situações de incremento calórico seria consequência da falta de oxigênio e glicose suficientes para geração de energia necessária ao tecido. Essa teoria foi reforçada por Means e Hall (1968) ao observarem que a produção de ATP foi aproximadamente um terço menor do que a normal quando a glicose exógena foi excluída do meio de incubação em cultivos testiculares *in vitro*. Além disso, observaram que na ausência completa de glicose, ocorreu uma redução substancial no conteúdo proteico testicular, mas quando a glicose foi adicionada ao meio, esta quantidade aumentou duas a quatro vezes acima dos valores anteriores. Com isso, demonstraram que a biossíntese proteica no testículo está diretamente relacionada ao nível de ATP e glicose disponível a este tecido.

Outra teoria que tenta explicar os efeitos deletérios da hipertermia no testículo leva em conta o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em decorrência do aumento do metabolismo mitocondrial (Ishii et al., 2005; Aitken e Roman, 2008; Shiraishi et al., 2010). Nesta condição, pode se estabelecer um desequilíbrio oxidativo, já que o aumento do metabolismo celular leva a uma maior produção de moléculas pró-oxidativas que se sobrepõem a moléculas antioxidantes presentes no testículo (Halliwell e Gutteridge, 2007). Esta situação tem sido descrita em estudos que avaliaram o efeito do estresse térmico na supressão da função testicular e diminuição da fertilidade em bovinos (Rahman et al., 2011), ovinos (Hamilton *et al.*, 2016), murinos (Peltola et al., 1995; Li et al., 2009; Queiroz et al., 2013) e humanos (Agarwal et al., 2012;

Shiraishi et al., 2012). Estes estudos concluíram que o estresse oxidativo é o principal fator responsável pelos danos causados pelo estresse térmico.

Radicais livres são moléculas com, pelo menos, um elétron não emparelhado, tornando-os extremamente instáveis e altamente reativos. Eles colidem com moléculas vizinhas e causam reações em cadeia de propagação que produzem ainda mais radicais livres (Tremellen, 2008). As espécies reativas de oxigênio (EROs) causam peroxidação lipídica de membranas celulares, lesões mitocondriais, fragmentação de DNA e RNA, indução da apoptose, danos teciduais e infertilidade (Ball, 2008c; Vignera *et al.*, 2011). O excesso de moléculas oxidantes leva a danos teciduais irreversíveis que culminam em um processo degenerativo (Aitken e Roman, 2008; Takahashi, 2012).

Em condições fisiológicas a geração de EROs ocorre a partir das mitocôndrias e de uma variedade de enzimas, incluindo as xantinas-oxidases, NADPH-oxidases, e os citocromos P450s. Essas enzimas se especializam na geração de EROs ou produzem metabólitos tóxicos como consequência da atividade bioquímica de geração de energia. Para resolver este risco, os testículos desenvolveram um conjunto sofisticado de sistemas antioxidantes que compreendem constituintes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os componentes enzimáticos desse sistema, destacam-se as enzimas SOD, GPx, glutationa-S-transferase (GST) e CAT (Ahotupa and Huhtaniemi, 1992; Peltola et al., 1995; Yao et al., 2016).

Além das principais enzimas que degradam as EROs, os testículos dependem fortemente de fatores antioxidantes de pequeno peso molecular para proteção contra danos oxidativos (Aitken e Roman, 2008; Paul et al., 2009; Agarwal et al., 2012; Takahashi, 2012). A administração de zinco demonstrou atenuar o dano oxidativo ao DNA de células germinativas induzido por metais pesados como o cádmio e chumbo, bem como em minimizar o declínio na produção de espermatozoides e secreção de testosterona induzida por estes agentes tóxicos (Gupta et al., 2004; Chang et al., 2007; Oliva et al., 2009). A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) - poderoso antioxidante lipofílico que é absolutamente vital para a manutenção da espermatogênese dos mamíferos - está presente em quantidades elevadas nas células de Sertoli e espermátócitos no estágio de paquiteno e, em menor extensão, em espermátides redondas. A vitamina C (ácido ascórbico) também contribui para o suporte da espermatogênese, através da sua capacidade de manter a ação antioxidante da  $\alpha$ -tocoferol em estado ativo (Suleiman et al., 1996; Ghosh et al., 2002).



A melatonina também é uma molécula que desempenha importante papel em manter o balanço oxidativo do testículo. Níveis de melatonina no plasma seminal estão deprimidos em pacientes inférteis com baixa motilidade espermática, piospermia, varicocele e azoospermia não-obstrutiva, efeitos causados pelo aumento do estresse oxidativo no trato masculino. Além disso, a administração de melatonina demonstrou reduzir o estresse oxidativo nos testículos após indução experimental de varicocele em ratos (Semercioz et al., 2003; Awad et al., 2006).

A mitocôndria é gravemente afetada pelo aumento dos níveis na produção de EROs, sofrendo colapso do potencial de sua membrana interna e aumento da permeabilidade, resultando em ruptura e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (Loeffler e Kremer, 2000; Gupta, 2003). Com a liberação destas moléculas há perda da homeostasia celular pela interrupção da síntese de ATP e novo aumento da geração de EROs. Além disso, é sabido que as EROs induzem a ativação das caspases 9 e 3. Desta forma, a resposta mitocondrial ao dano oxidativo é uma via importante do início da apoptose (Goettlieb et al., 2000; Green e Kroemer, 2004).

#### Terceira Teoria

A terceira teoria diz respeito às alterações que o calor por si só causam à célula, mediante danificação de seus componentes bioquímicos por desnaturação, incorreto dobramento e desdobramento de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Uma variedade de insultos testiculares, como o calor, podem induzir alterações na estrutura da cromatina celular, resultando em danos no DNA (Love e Kenney, 1999). Dessa forma, o dano ao DNA altera os níveis de expressão de diversos genes de uma maneira complexa. No entanto, ainda é discutível se a modulação dos níveis de expressão gênica é diretamente causada pelo estresse térmico ou indiretamente causada por outras alterações celulares resultantes desse estresse, como danos oxidativos (Setchell, 1998).

#### Quarta Teoria

Tem sido relatado por diversos autores que o estresse por calor além de prejudicar diretamente a síntese e integridade de DNA, interfere na síntese de RNA, de proteínas e pode causar desnaturação proteica e condensação anormal da cromatina (Banks et al, 2005; Perez-Crespo et al, 2007). As modificações nos níveis de expressão gênica em conjunto com alterações pós-traducionais levam a variações na localização e forma das proteínas produzidas pós-insulto, gerando uma transformação na composição protéica das células germinativas (Kim et al., 2013).

Em geral, em resposta à hipertermia alguns genes são ativados (*upregulados*) para desempenharem papéis defensivos ou reguladores que são necessários para a defesa e reparação celular (Neuer et al., 2000; Rockett et al., 2001). Rockett et al. (2001) encontraram grupos de genes específicos expressos em resposta ao estresse térmico, tais como genes de choque térmico (genes *HSPs*), genes de resposta ao estresse não-HSP e genes de sinalização celular. A ativação dos genes *HSPs* levam à produção de proteínas de choque térmico (HSPs) e a extensão desta produção depende da intensidade e duração da exposição ao calor; quanto maior a temperatura e a exposição, maior a quantidade de HSPs produzidas (Legare et al., 2004).

Esse fenômeno é conhecido como resposta ao choque térmico e é parte de um mecanismo de proteção inato conservado através da evolução. As proteínas de choque térmico (HSPs) protegem as células do stress por calor por meio da ligação a proteínas celulares, impedindo que sejam danificadas por desnaturação e incorreto dobramento (Neuer et al., 2000; Rockett et al., 2001). Diante de um estresse térmico testicular o gene *Hsf1* é ativado, iniciando a produção da proteína Hsf1 (fator de choque térmico 1) intracelular. Esta proteína tem dois papéis paradoxais: primeiramente ativa rapidamente a produção de HSPs, promovendo assim a sobrevivência celular, e por outro lado ativa vias de apoptose quando há extensivo dano celular, assegurando uma produção de células germinativas de boa qualidade (Izu et al., 2004; Widlak et al., 2007).

Henriksen et al. (1995) observaram uma redução no número de células germinativas em ratos criptorquidas e sugeriram que estas células estavam sendo eliminadas por apoptose. Dois anos mais tarde Yin et al. (1997) confirmaram este processo ao evidenciarem a apoptose em espermatócitos primários e espermátides redondas ao utilizarem coloração histoquímica em lâminas de testículos danificados pela hipertermia após criptorquidia induzida. Após esses estudos, outros pesquisadores que avaliaram os efeitos da criptorquidia em animais, também encontraram aumento na apoptose de células germinativas, causado pelo efeito permanente do estresse térmico no DNA. O resultado revelou um declínio no peso dos testículos e infertilidade (Setchell, 1998; Banks et al., 2005).

A exposição dos testículos ao calor por imersão do escroto em água aquecida também resultou em morte de células germinativas por mecanismos apoptóticos em macacos (Lue et al., 2003) e ratos (Rockett et al., 2001). A curta imersão do escroto em banho quente a 43° C por 15-20 min foi suficiente para causar danos graves ao

parênquima gonadal (Rockett et al., 2001). A lesão do DNA é a principal ação precursora da apoptose nas células germinativas masculinas (Shaha et al., 2010).

Além do impacto direto à célula e ao DNA, o calor também pode desnaturar as pontes citoplasmáticas necessárias para a sobrevivência celular e afeta a composição do fluido epididimário, dificultando a maturação adequada dos espermatozoides (Rockett et al., 2001). A consequência mais significativa do estresse térmico no testículo é a perda de células germinativas via apoptose. Este evento também é conhecido como morte celular programada tipo I e envolve alterações celulares identificáveis, como a fragmentação do DNA, o encolhimento do volume celular e protrusões da membrana plasmática (Liu, 2010).

A ativação da apoptose pode ocorrer de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). Estas vias (Figura 7) são essenciais para a regulação do crescimento celular e para eliminação de células com defeitos induzidos por estresse genotóxico e não genotóxico (Vogelstein et al., 2000; Shaha et al., 2010).

A via apoptótica intrínseca é dependente das mitocôndrias, uma vez que os sinais que são traduzidos em resposta ao insulto celular convergem principalmente para esta organela (Desagher e Martinou, 2000; Hengartner, 2000). Iniciando esta via, o gene pró-apoptótico *Bax* responde ao estresse por calor aumentando a concentração de sua proteína na membrana externa mitocondrial. Por outro lado, o gene anti-apoptótico *Bcl-2* é inativado por fosforilação, reduzindo a quantidade da proteína Bcl-2 na superfície dessa organela. Uma vez inserida na membrana externa, a proteína Bax leva a mudanças conformacionais e aumenta a permeabilidade mitocondrial, permitindo a liberação do citocromo C no citosol. O citocromo C interage com Apaf-1 (Fator de Ativação da Protease Apoptótica 1) para formar um complexo, que ao se ativar, liga-se à caspase 9 e ativa proteoliticamente a cascata de caspases 3, 6 e 7 (Gottlieb et al., 2000; Hikim et al., 2003; Kim et al., 2013). O mecanismo de apoptose em células germinativas masculinas é fortemente dependente da via intrínseca de ativação do gene *Bax* e inativação do gene *Bcl* (Gottlieb et al., 2000; Rucker et al., 2000).

A via apoptótica extrínseca também é iniciada após a exposição da célula ao estresse térmico. Sob esse estímulo a proteína de morte Fas se liga ao seu receptor FasL na membrana plasmática e ativa FADD (domínio de morte associado a Fas). Este complexo ativa a cascata de caspases iniciadoras 8 e 10, culminando na ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7 (Liu, 2010; Vera et al., 2004).

Também durante a hipertermia o gene *p53*, um supressor tumoral que aumenta a expressão de genes pró-apoptóticos, é deslocado para o núcleo, onde se liga ao DNA causando a parada do ciclo celular. A proteína *p53* participa da via extrínseca ativando FADD, mas também atua na via intrínseca aumentando a expressão de *Bax* e diminuindo a expressão de *Bcl-2* (Yin et al., 1997; 1998; Gottlieb et al., 2000).

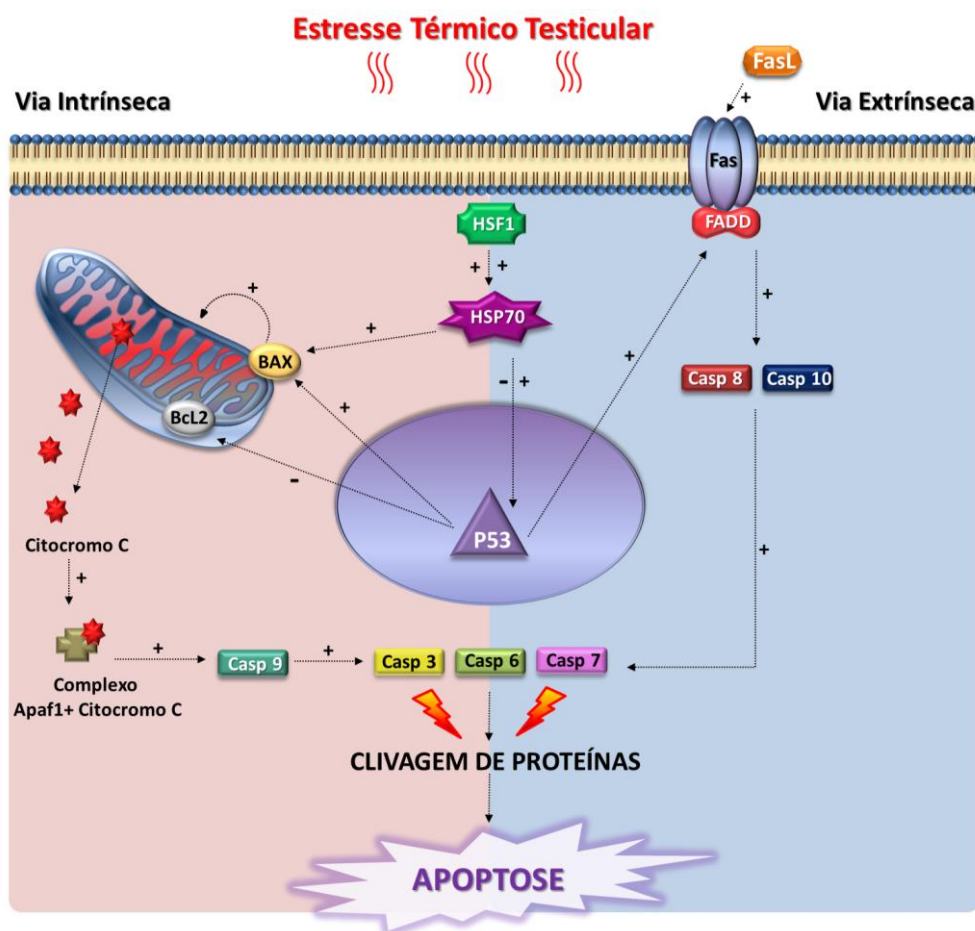


Figura 7. Ilustração simplificada das vias intrínseca e extrínseca de apoptose, ativadas pelo estresse térmico testicular. A via intrínseca é ativada quando a expressão de *Bax* supera a de *Bcl2*, levando a modificações mitocondriais e favorecendo a liberação do citocromo C para o citosol. Uma vez liberado o citocromo C se liga ao Apaf1, formando um complexo que ativa *Casp9* e consequentemente a cascata de caspases efetoras (3,6 e 7). A via extrínseca é iniciada quando Fas se liga ao seu receptor FasL, ativando FADD e consecutivamente as caspases 8 e 10, que por sua vez ativarão as caspases efetoras. O gene *p53* também é *upregulado* pelo calor, e ativará ambas as vias de apoptose, assim como a *Hsp70* em casos de extensos danos celulares. Quando as caspases efetoras são ativadas o mecanismo de apoptose se completa (Arquivo Pessoal).

Ambas as vias intrínsecas e extrínsecas convergem na cascata de caspase efetoras 3, 6 e 7, que clivam proteínas citoplasmáticas causando modificações celulares responsáveis pela morte das células germinativas. As Hsp70, ativadas pelo Hsf1 em condições de estresse térmico, atuam inicialmente protegendo a célula das alterações pelo calor e inativando o gene *p53*. Entretanto, em situações onde as lesões se tornam irreversíveis essas proteínas são moduladas de forma a ativarem a via intrínseca pela ativação de *Bax* e extrínseca pela ativação de *p53* (Rockett et al., 2001; Vera et al., 2005).

Como consequência final do estresse térmico testicular, observa-se danos ao epitélio seminífero e produção de células espermáticas morfologicamente anormais, além de redução do número de células germinativas causada pela apoptose (Figura 8).

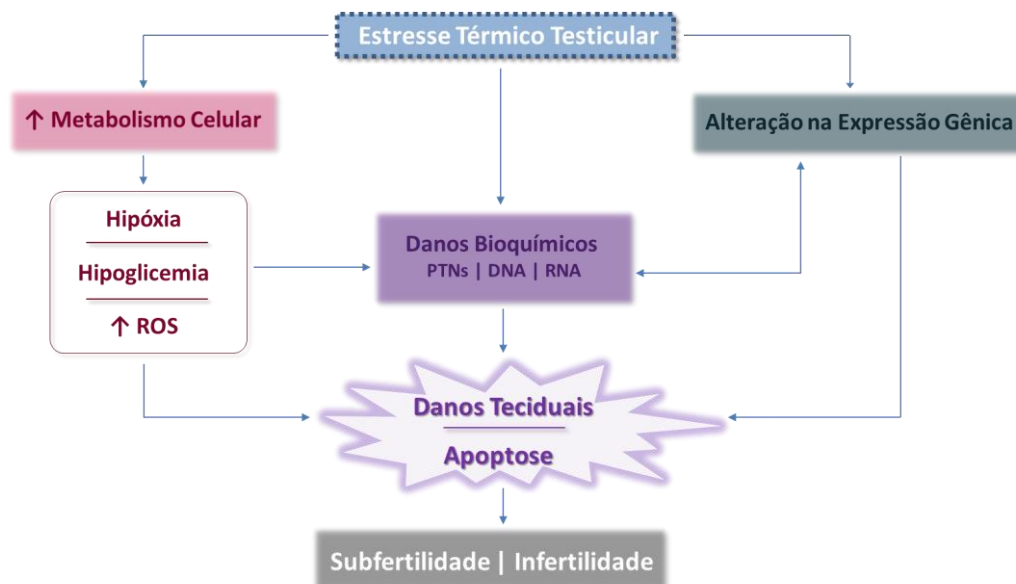


Figura 8. Diagrama proposto sobre os possíveis danos causados pelo estresse térmico ao parênquima testicular. O incremento calórico da gonada leva a um aumento do metabolismo celular e consequente aumento da demanda por oxigênio e glicose, que passam a não ser supridos adequadamente, culminando em hipóxia e hipoglicemia, respectivamente. Além disso, o aumento do metabolismo eleva a produção de EROs, que em dado momento se sobrepõe aos mecanismos antioxidantes da célula. Tais eventos levam a danos bioquímicos como paralisação da produção proteica, desnaturação de proteínas, fragmentação de DNA e RNA e oxidação de lipídios. O calor por si só também é capaz de causar danos bioquímicos, como desnaturação de proteínas e enzimas, além de danos aos ácidos nucleicos. Finalmente, o estresse térmico leva a expressão gênica de proteínas envolvidas em vias de apoptose. Todos os mecanismos relacionados ao efeito do estresse térmico no testículo convergem para o dano tecidual, produção de espermatozoides defeituosos e apoptose, resultando em subfertilidade ou infertilidade do macho (Arquivo Pessoal).

Entre alguns dos danos teciduais observados, destacam-se a redução da fluidez e ruptura de membranas lipídicas, tumefação celular, incapacidade de manutenção do gradiente iônico celular, diminuição do tamanho dos túbulos seminíferos e do número de camadas do epitélio germinativo, aumento do tecido intersticial, vacuolizações citoplasmáticas, núcleos picnóticos, entre outros (Turner, 2007; Edwards, 2008; Yao et al., 2016).

### **2.2.3. Diagnóstico da DT**

Identificar os mecanismos causais responsáveis pela infertilidade masculina é desafiador devido aos inúmeros processos que afetam a produção de gametas (Roser, 2008) e a ausência de parâmetros individuais altamente preditivos para a fertilidade do macho representa a alta complexidade da fisiologia reprodutiva desta espécie (Ball, 2008a; Roser, 2008). Desta forma, a combinação de diversas técnicas e métodos de avaliação do sistema reprodutor e sêmen se torna imprescindível para uma maior acurácia diagnóstica (Voss *et al.*, 1981; Casey, 1997).

Apesar da DT ser causada por inúmeros estímulos e fatores diferentes, quase sempre a resposta tecidual se manifesta clinicamente da mesma maneira: pela alteração do tamanho gonadal, da arquitetura histológica e da produção anormal de espermatozoides (Watson et al., 1994; Johnson et al., 1997). Assim, o diagnóstico de degeneração testicular é bastante direto e conclusivo, entretanto a identificação do fator causal pode ser bastante laboriosa.

O diagnóstico da DT geralmente é baseado no exame físico, incluindo a inspeção e palpação testicular, na avaliação seminal, além de especial atenção ao histórico clínico geral e reprodutivo do animal (Beard, 2011). Uma história completa é necessária antes que se possa fazer um diagnóstico de DT, uma vez que tanto clinicamente como histologicamente esta condição é indistinguível da hipoplasia testicular (Blanchard et al., 1990; Turner, 2007). Os achados testiculares no exame físico e histológico e as características do sêmen são muito semelhantes entre essas duas condições, ainda que a libido não seja afetada (Watson et al., 1994; Birch, 2008).

A degeneração é uma condição que acontece posterior ao nascimento e geralmente tem natureza temporária, devido à regeneração do epitélio seminífero quando o insulto é removido. Em contraste a hipoplasia testicular é um defeito congênito irreversível (Watson et al., 1994). Na ausência de uma história adequada, a diferenciação entre as duas enfermidades pode ser impossível (Blanchard et al., 1990; Beard, 2011).

Um diagnóstico preciso de DT começa com uma anamnese detalhada da atividade reprodutiva do garanhão, como informações sobre o manejo de coberturas/coletas de sêmen e índices de fertilidade. Além disso, a investigação da etiologia da DT se inicia apurando no histórico possíveis fatores causais, como trauma do testículo, doença associada com febre, administração de esteroides anabolizantes ou outras substâncias que afetam a gônada. Nestes casos, geralmente o início da infertilidade é súbito e intimamente associado à causa (Birch, 2008).

O prognóstico da fertilidade futura é geralmente melhor nos casos em que a causa incitante pode ser identificada e removida, do que casos em que não há um fator aparente. Os garanhões, especialmente os mais velhos, que não apresentam história de insulto testicular conhecido, doença sistêmica e declínio da fertilidade ao longo do tempo, devem ser considerados para DTI (Turner, 2003; Turner, 2007; Turner e Zang, 2012).

Na fase aguda do processo o testículo degenerado inicialmente se apresenta tumefeito e com consistência macia à palpação. Em seguida ocorre uma diminuição paulatina do tamanho, caracterizada por atrofia e flacidez (Oristaglio-Turner, 2007). Com a progressão da degeneração e da atrofia gonadal, a flacidez vai dando lugar ao enrijecimento do tecido testicular e, a medida que o processo se cronifica, os epidídimos tornam-se mais proeminentes e desproporcionais em relação à gônada (Blanchard et al., 2001). A exposição testicular ao calor leva à redução do peso, da massa e circunferência escrotal (Setchell et al., 1998). Ratos expostos a um ambiente a 35° C por quatro dias (Meistrich et al., 1973) e submetidos à imersão escrotal em banho-maria a 43° C por 15 minutos (Queiroz et al., 2013) apresentaram diminuição do peso testicular nos dias subsequentes ao estresse térmico. De modo semelhante, a exposição de ovinos a um ambiente aquecido durante 14 dias provocou uma redução de 70% do peso testicular (Gomes et al., 1971).

A diminuição progressiva da fertilidade após o insulto testicular é um sinal clínico comum a todos os equinos com DT (Turner, 2007), entretanto, em casos onde o monitoramento da qualidade seminal não é realizado ou o manejo de coberturas naturais é utilizado, esta queixa pode ocorrer tardiamente, quando os índices de fertilidade do plantel já estão gravemente afetados (Blanchard e Varner, 1997). A redução da fertilidade esta relacionada à baixa qualidade seminal de pacientes com DT (Blanchard et al., 2000), uma vez que a redução da motilidade total e progressiva, bem como o aumento de defeitos espermáticos (cabeças destacadas e anormais, gotas proximal e distal, anormalidade geral da parte média e caudas enroladas) estão associados a um menor índice de prenhez, como

demonstrado por Love (2011).

O decréscimo da motilidade e concentração espermática e o número de espermatozoides morfologicamente normais, representam bons indicativos do processo de degeneração da gônada (Sieme, 2009). Com o agravamento do processo, o ganhão pode se tornar oligo ou azoospermico (Blanchard e Varner, 1993) e se observa células germinativas (células redondas) e células gigantes multinucleadas no ejaculado (Watson et al., 1994; Blanchard e Johnson, 1997; Blanchard et al., 2001).

Friedman et al. (1991) realizaram o primeiro experimento em equinos para avaliar os efeitos da hipertermia testicular nos parâmetros espermáticos e observaram diminuições da motilidade total e progressiva e do número total de espermatozoides por ejaculado. Os autores demonstraram, ainda, que a extensão desses danos é proporcional ao tempo de permanência do insulto térmico. Alguns anos mais tarde, em experimento semelhante, Blanchard et al. (1996) observaram também diminuição da motilidade progressiva e concentração espermática no ejaculado de ganhões maduros, reforçando a consistência desses resultados.

Uma baixa produção diária de espermatozoides (DSO/ml), conjuntamente a uma baixa porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais no ejaculado têm sido recomendados como bons indicadores da possível presença de DT (Love et al., 1991; Thompson et al., 2004; Turner, 2007). A DSO é medida pela coleta de sêmen por no mínimo sete dias consecutivos, em ganhões em repouso sexual, a fim de esgotar as reservas extra-gonadais. O valor médio da concentração espermática nos últimos três dias de coleta é utilizado para representar a DSO/mL real (Thompson et al., 2004). Adicionalmente, a DSO/mL pode ser predita dividindo o número total de espermatozoides no ejaculado pelo volume testicular total (Turner, 2007), ou aplicando a fórmula de regressão  $DSO = 0.024 \times (\text{volume testicular esquerdo} + \text{volume testicular direito}) - 0,76$  (Love et al., 1991). Quando a DSO/mL de um ganhão declina progressivamente ao longo do tempo ou o valor não corresponde ao esperado de acordo com o volume testicular apresentado, o diagnóstico de DT deve ser considerado (Love et al., 1991; Thompson et al., 2004; Turner, 2007). A eficiência espermatogênica pode ser representada como uma porcentagem, e é determinada pela fórmula  $\text{Eficiência Espermatogênica} = (DSO \text{ real} / DSO \text{ predita}) \times 100$  (Varner et al., 2008).

Na medicina também se observa diminuição na produção de espermatozoides após estresse térmico testicular. O aumento da temperatura corporal após pirexia (MacLeod e Hotchkiss, 1941), ou aquecimento local dos testículos (Watanabe, 1959,



Tokuyama, 1963) é seguido por uma diminuição na concentração de espermatozoides no sêmen entre três e onze semanas mais tarde em homens. Procope (1965) e Brown-Woodman et al. (1984) avaliaram a qualidade seminal após exposição de pacientes à sauna e French et al. (1973) avaliaram após hipertermia local do escroto e todos eles observaram uma diminuição no número de espermatozoides dentro do período de uma semana após o aquecimento.

Dentre os sinais clínicos observados no espermiograma de pacientes com DT, a elevação da porcentagem de gametas defeituosos é um dos achados mais clássicos. Na espécie bovina, o incremento calórico corporal, após exposição a temperaturas ambientais elevadas, produziu aumento dos defeitos e morte de espermatozoides, com aparecimento no ejaculado dentro de uma semana e persistindo até 60 dias do insulto (Casady et al., 1953; Skinner e Louw, 1966). Resultado semelhante foi observado por Kastelic et al. (1995) e Fernandes et al. (2008) quanto à morfologia espermática após indução de hipertermia local. Entre os resultados relevantes, ocorreu a diminuição da porcentagem de espermatozoides normais e o aumento da incidência de defeitos na região da cabeça e peça intermediária. Entretanto, não houve modificações na incidência das anormalidades de cauda. O aumento do aparecimento de gotas foi observado por Kastelic et al. (1995) mas não por Fernandes et al. (2008).

Em equinos o número de espermatozoides normais decresceu a partir da segunda semana, atingiu menores valores entre os dias 20 e 40 e retornou a valores normais por volta do dia 55 pós-insulação (Friedman et al., 1991). Blanchard et al. (1996) observaram diminuição da porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais no sêmen já na primeira semana, menores valores sendo alcançados após três semanas e retorno a valores anteriores ao insulto após sete semanas do estresse térmico escrotal. Ambos os autores (Friedman et al., 1991; Blanchard et al., 1996) relataram que a evolução dos parâmetros de cinética e morfologia espermática não seguiram um padrão uniforme entre os garanhões avaliados, sendo a resposta individual ao insulto térmico escrotal bastante variável.

Vogler et al. (1993) ao observarem que a motilidade e integridade acrossomal de espermatozoides bovinos decrescem entre a primeira e segunda semana após o insulto térmico escrotal, concluíram que os espermatozoides contidos no epidídimo também sofrem prejuízos com a elevação da temperatura testicular. Love e Kenney (1999) avaliaram os efeitos da insulação escrotal na estrutura da cromatina espermática (SCSA) de garanhões e demonstraram que a susceptibilidade do DNA do espermatozoide à

desnaturação é dependente do estágio celular espermatogênico em que a célula germinativa/espermatozoide se encontrava no momento do insulto. Ao observarem maiores índices de desnaturação do DNA entre os dias 10 e 24 e entre os dias 38 e 46 após insulação escrotal, concluíram que os estágios celulares mais afetados pelo insulto térmico correspondem às espermátides e espermatócitos primários.

A ultrassonografia modo-B e Doppler são ferramentas úteis na avaliação reprodutiva de garanhões, sendo uma técnica interessante na investigação de causas que antecipam a DT, como no caso de tumores e distúrbios circulatórios que levam ao acúmulo de líquido (Ball, 2008a). Em casos crônicos de DT, pode-se observar aumento generalizado da ecogenicidade, redução do tamanho e da circulação do parênquima testicular, exemplificado pela perda de visibilidade da veia central. As artérias que penetram na túnica albugínea também podem aparecer mais proeminentes na periferia dos testículos, devido a uma redução no fluxo sanguíneo do parênquima testicular (Love e Varner, 1998).

A mensuração rotineira dos testículos pode facilitar a identificação precoce de DT, com a observação da diminuição de alguma medida ou volume total (Turner, 2007). O tamanho testicular é tão hereditário em garanhões como é em touros e esse parâmetro correlaciona-se fortemente com a produção de espermatozoides (Birch, 2008). Recomenda-se que as medidas testiculares de garanhões em atividade sexual sejam obtidas e registradas pelo menos uma vez por ano, de forma a serem parâmetros de consulta em casos de suspeita de diminuição do testículo. Da mesma forma, o hábito de registrar os parâmetros seminais é de grande valia no auxílio diagnóstico em casos de suspeita de DT (Blanchard e Varner, 1993; 1997).

As mensurações podem ser obtidas com paquímetro ou por ultrasonografia e devem incluir a medida do comprimento, largura e altura de cada testículo. Estas medidas devem ser utilizadas para calcular o volume testicular e para determinar se o garanhão está produzindo números de espermatozoides adequados para seu volume testicular (Love et al., 1991). Em um estudo de Bailey et al. (1998) as medidas testiculares foram avaliadas por paquímetro e ultrassom em touros para determinar qual método era o mais exato. Verificou-se que as medidas do comprimento realizadas com o paquímetro foram mais confiáveis do que os comprimentos derivados do ultrassom.

O volume de um único testículo pode ser calculado utilizando a fórmula *Volume Testicular Individual = 0,053 x comprimento x largura x altura* e o volume testicular total é obtido somando o volume do testicular direito ao esquerdo (Love et al., 1991).

Em carneiros, dois estudos que avaliaram modificações na irrigação sanguínea testicular após insulação escrotal, observaram discreta elevação do fluxo sanguíneo gonadal nas primeiras 24 horas pós-insulto, mas em seguida os valores retornaram às taxas originais (Dutt et al, 1977; Mieusset et al, 1992). Entretanto, um estudo em ratos demonstrou que o aquecimento escrotal a 43° C por 30 minutos resultou em uma redução significativa no fluxo sanguíneo por testículo. O fluxo sanguíneo testicular decresceu acompanhando o peso testicular, entre os dias 2 e 4 e atingindo valores mínimos entre os dias 14 e 21 após o aquecimento. Tanto o fluxo sanguíneo por testículo como o peso testicular começaram a se recuperar 35 dias e alcançaram a normalidade aos 56 dias após o tratamento térmico, embora o peso testicular ainda estivesse ligeiramente reduzido neste momento (Galil e Setchell, 1988).

Apesar de algumas pesquisas terem encontrado variações hemodinâmicas, a maioria dos estudos em ratos e carneiros, que avaliaram o fluxo sanguíneo total ou capilar através do testículo em condições de estresse térmico gonadal, indicaram que o fluxo sanguíneo através do testículo não aumenta até que a temperatura do testículo alcance valores muito acima da temperatura corporal (Waites and Setchell, 1964; Setchell et al, 1966; Waites et al, 1973; Godinho and Setchell, 1975; Damber and Janson, 1978; Setchell et al, 1995). No entanto, a medida que o peso dos testículos diminui, a tendência do fluxo sanguíneo por testículo é diminuir na mesma proporção, isto é, o fluxo sanguíneo se adapta à nova unidade de peso da gônada masculina (Galil e Setchell, 1988).

O índice Doppler de resistividade (IR) indica a resistência do fluxo sanguíneo causado pelo leito microvascular distal ao local de medição. Já o índice de pulsatilidade (PI) quantifica a pulsatilidade da forma da onda. Os aumentos do IR e PI indicam diminuição da perfusão do tecido avaliado. No entanto, o IR é o índice mais sensível e comum utilizado na detecção de distúrbios do fluxo sanguíneo testicular em humanos (Biagiotti et al., 2002). Em termos gerais, esses parâmetros aumentam nos processos isquêmicos ou degenerativos, bem como nos testículos atróficos e diminui nas condições inflamatórias devido à hiperemia (Jee et al., 1997, Lefort et al., 2001, Ekerhovd e Westlander, 2002).

Recentemente, dois outros parâmetros de fluxo sanguíneo estão sendo usados em andrologia: total de fluxo sanguíneo arterial (TABF) e taxa de fluxo sanguíneo arterial total (TABF *rate*). Estes parâmetros, especialmente o último, são melhores indicadores de perfusão testicular e são afetados por distúrbios vasculares mais cedo do que os índices tradicionais (Tarhan *et al.*, 2003).

Nos gananhões, os índices Doppler (PI e RI) apresentaram correlação negativa com o número total de espermatozoides e com o número total de espermatozoides morfolologicamente normais com motilidade progressiva (Pozor *et al.*, 2014). O RI aumenta significativamente em homens oligospermicos e é menor nos homens com contagem normal de espermatozoides (Pinggera *et al.* 2008).

Microscopicamente a aparência histológica da DT é evidenciada pela diminuição do diâmetro e espessura dos túbulos seminíferos, mineralização e espessamento da membrana basal tubular, vacuolização citoplasmática, picnose nuclear, fibrose intersticial, diminuição do número e descamação de células germinativas, desorganização do epitélio seminífero, atividade espermatogênica diminuída ou ausente e túbulos seminíferos apresentando poucos ou raros espermatozoides, principalmente nos estágios mais avançados da doença (Blanchard, 2001; Oristaglio-Turner, 2007; Edwards, 2008). Ocorre, uma gradativa diminuição no número de espermatócitos, espermátides e, em quadros severos, de células de Sertoli (Sieme, 2009), formação de células gigantes intratubulares, espermiostase, hemorragia, e hiperplasia de células Leydig (Watson *et al.*, 1994; Gehlen *et al.*, 2001; Turner, 2007).

Há ainda em casos mais severos a perda completa ou redução da espermatogênese, espessamento hialino do interstício, ondulação da membrana basal, como resultado do colapso dos túbulos seminíferos (Gehlen *et al.*, 2001; Turner, 2007). O tecido fibroso pode se tornar abundante e calcificado e os túbulos seminíferos ficam quase desprovidos de células espermatogênicas, restando apenas células de sustentação (Humphrey e Ladds, 1975).

É importante evidenciar que testículos normais podem ter algumas áreas focais de anormalidades na espermatogênese. Portanto, a porcentagem do parênquima testicular que é afetada e a gravidade das lesões histológicas devem ser consideradas antes do diagnóstico de DT (Birch, 2008). A biópsia e a citologia aspirativa por agulha fina são úteis nos quadros de DT grave acompanhada de azoospermia que impede uma avaliação testicular através do exame andrológico, fornecendo informações quanto a funcionalidade dos testículos através da avaliação da espermatogênese (Leme e Papa, 2002).

As alterações histológicas descritas anteriormente só podem ser visualizadas mediante realização de biópsia, permitindo um diagnóstico conclusivo do quadro (Metcalf, 2007; Turner, 2007; Ball, 2008a). Entretanto, a utilização da biópsia testicular raramente é realizada, uma vez que pode levar a danos no parênquima funcional testicular, hemorragia e desencadeamento de autoimunidade (Veeramachaneni *et al.*, 1986;

DelVento et al., 1992). Contudo, em alguns casos clínicos, como na investigação da etiologia da azoospermia, a biópsia é uma das poucas ferramentas de diagnóstico disponíveis (Gehlen *et al.*, 2001) e Faber e Roser (2000) demonstraram que as biópsias testiculares podem ser realizadas com segurança e com danos mínimos ao restante do parênquima testicular.

As variações nos níveis sistêmicos de hormônios envolvidos no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em machos com DT têm sido discutidas por diversos autores, com resultados bastante variáveis (Blanchard et al., 1996; 2000; Alves et al., 2016).

Os níveis hormonais periféricos não são bons preditores de DT leve/moderada, já que há significativa variação entre ganhões saudáveis, assim como em ganhões com redução de fertilidade (Blanchard e Varner, 1993). Algumas células são mais afetadas do que outras pelo estresse térmico escrotal; geralmente em casos brandos desta enfermidade somente as células germinativas são afetadas, entretanto, em casos extremos pode ocorrer perda de células somáticas do parênquima testicular afetando a esteroidogênese (Setchell, 1998).

Mudanças na função endócrina após indução da hipertermia testicular tem sido descrita em diversas espécies. Em ratos o criptorquidismo experimental resultou em elevação das secreções de FSH e LH, enquanto os níveis de inibina decresceram até quase não serem detectáveis (Jegou, 1991; Walsh e Swerdloff, 1973; Seethalakshmi e Steinberger, 1983; Bergh e Damber, 1984). Em homens a hipertermia escrotal também está associada com o aumento das concentrações periféricas de FSH e LH, mas não nas concentrações de testosterona. Em ganhões criptorquidizados bilaterais as concentrações de estrógeno total parecem ser maiores e de andrógenos totais menores do que em ganhões normais (Ganjam e Kenney, 1975).

Friedman et al. (1991) observaram um efeito agudo da insulação escrotal em ganhões sobre os níveis periféricos hormonais nos primeiros cinco dias pós-insulto. A concentração plasmática de inibina, estradiol e estrógeno conjugado decresceram enquanto as concentrações plasmáticas de testosterona se elevaram após o insulto térmico. Entre 10 e 40 dias após a hipertermia testicular os níveis de FSH, LH e estrógeno conjugado se elevaram, quando a espermatogênese sofreu maiores prejuízos pelo insulto térmico. Após a diminuição inicial dos níveis de inibina, ocorreu uma elevação nos níveis desse hormônio a partir do dia 25 pós-insulação e se estendeu até os 40 dias de avaliação.

Em contraste aos resultados encontrados pelos autores anteriores, Blanchard et al. (1996) observaram elevação de LH e redução de testosterona imediatamente após a

insulação testicular de garanhões por insulados por 36 horas. Passado as horas iniciais, as concentrações de LH e testosterona se normalizaram. Contudo, as concentrações de LH voltaram a se elevar na fase de recuperação testicular (8 semanas pós-insulação). Esses autores também observaram aumento dos níveis plasmáticos de FSH e diminuição dos níveis de estrogênios em garanhões com baixa fertilidade relacionada à DT.

Em ratos submetidos à insulação escrotal durante 28 dias foram observadas modificações progressivas nas concentrações hormonais plasmáticas periféricas. Durante a primeira semana, os níveis de FSH foram elevados e de testosterona reduzidos. Após sete dias de insulação, os valores de LH se elevaram, embora os níveis médios de testosterona permaneceram inalterados. Após 14 dias de estresse térmico escrotal, os níveis médio e basal de testosterona foram significativamente reduzidos enquanto os valores médios de LH foram elevados (Byers e Glove, 1994). Esses resultados corroboram com os achados de Alves et al. (2016), que notaram redução dos níveis séricos de testosterona durante 90 dias de observação em carneiros submetidos a hipertermia escrotal, em relação ao grupo controle.

Altos níveis plasmáticos de FSH e LH com baixo estradiol são frequentemente úteis no diagnóstico de DT em garanhões (Burns e Douglas 1984, Douglas e Umfenour, 1992) e o diagnóstico de altas concentrações plasmáticas de FSH em homens é considerado um indício de lesão irreversível ao epitélio seminífero (Krester et al., 1974). Garanhões subférteis/inférteis mais severamente afetados por DTI apresentaram níveis elevados de LH e FSH no plasma sanguíneo, diminuição dos níveis plasmáticos de inibina e estradiol e diminuição das concentrações intratesticulares de inibina (Roser, 1995; Stewart e Roser, 1998).

#### **2.2.4. Tratamento da degeneração testicular**

Não há tratamento conhecido comprovado para DT. Se a causa da degeneração é conhecida e essa causa primária for removida, poderá haver gradualmente uma melhora na qualidade seminal nos próximos dois meses (Blanchard e Varner, 1993; Turner, 2007), período necessário para que o ciclo espermatogênico pós-insulto gere espermatozoides saudáveis (Birch, 2008), ou pelo menos, evitará a progressão da doença (Turner, 2007). Em casos muito graves de DT, pode ser necessários mais de cinco meses para recuperação e retorno à função reprodutiva (Blanchard e Varner, 1993). Entretanto, o prognóstico reprodutivo é variável, pois enquanto alguns animais apresentam retorno da fertilidade ao mesmo nível de antes do insulto, em outros casos pode não haver total recuperação

(Turner, 2007).

Existem alguns relatos na literatura de tratamentos bem-sucedidos com GnRH em garanhões com infertilidade. Entretanto, esses resultados não foram repetidos em estudos controlados para DT (Evans e Finely, 1990; Shiner et al., 1993). Sendo a etiologia do processo na maioria das vezes relacionada a um dano tecidual local por morte celular e danos oxidativos, qualquer terapia hormonal não traria benefícios (Alvarenga e Papa, 2010).

Há descrições na literatura sobre os efeitos benéficos da suplementação com antioxidantes solúveis em gordura sobre a qualidade do sêmen em garanhões, como por exemplo, o ácido docosaexaenóico (DHA) que consiste em um ácido graxo poliinsaturado (PUFA) (Brinsko et al., 2005). No entanto, os efeitos deste tratamento em garanhões com problemas de fertilidade ainda não foram determinados. Turner et al. (2007) sugeriram um possível efeito benéfico na qualidade seminal e fertilidade de garanhões suplementados com nutracêuticos contendo DHA ou substâncias semelhantes. Em ratos os efeitos benéficos dos PUFAs foram demonstrados por Castilho et al. (2015), quanto à capacidade em reduzir os danos oxidativos causados pela hipóxia intermitente. Este efeito foi demonstrado mediante elevação da atividade antioxidante das enzimas (SOD e GPx) no testículo e da atividade antioxidante no plasma sanguíneo.

Estudos em homens e ratos com disfunções na espermatogênese demonstraram que o tratamento com pentoxifilina, foi eficiente em aumentar a motilidade total, progressiva e concentração espermática (Moein *et al.*, 2005; 11; Yao *et al.*, 2016). Outro estudo demonstrou que a associação de PTX com zinco e ácido fólico foi eficiente em reduzir a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais no sêmen de homens com varicocele (Oliva et al., 2009). Além disso, a PTX foi eficiente em aumentar o fluxo sanguíneo testicular em ratos submetidos à torção testicular após a reverão do processo (Savas et al., 2002).

Devido à ausência de tratamento comprovado para DT, algumas pesquisas foram realizadas visando minimizar os efeitos desta condição na fertilidade, por meio da adoção de algumas estratégias de manejo de cobertura/inseminações e do processamento do sêmen (Hinrichs e Choi, 2000; Varner et al., 2008; Mari et al., 2011; Blanchard et al., 2012).

Éguas a serem inseminadas com o sêmen de garanhões com DT devem ser frequentemente examinadas a fim de se identificar o momento mais próximo da ovulação, uma vez que a longevidade desses espermatozoides é reduzida. Além disso, garanhões

com baixa qualidade espermática podem ser beneficiados com técnicas avançadas de reprodução assistida, como pela injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Hinrichs e Choi, 2000).

Varner et al. (2008; 2011) e Blanchard et al. (2012) avaliaram métodos de manipulação de sêmen para ganhões subfêrteis com baixa qualidade seminal, objetivando aumentar a fertilidade desses animais e aumentar suas vidas reprodutivas. Os métodos avaliados incluíram a centrifugação em gradiente de seleção espermática, centrifugação com coloide no fundo do tubo e a inseminação na extremidade do corno uterino, próximo ao momento da ovulação. A seleção espermática se mostrou eficiente em remover espermatozoides com defeitos não compensatórios, prevenindo a competição com espermatozoides saudáveis. Entre os espermatozoides com morfologia anormal que foram eficientemente removidos estão os com defeitos em cabeça, peça intermediária e cauda. Além disso, a centrifugação com solução coloidal no fundo do tubo reduziu a compactação espermática e aumentou a qualidade do sêmen após esse processamento. Entretanto, Blanchard et al. (2012) não observaram diferenças nos índices de fertilidade entre o sêmen processado e não processado, utilizando baixa dose inseminante na extremidade do corno uterino, apesar de verificarem melhoria da qualidade seminal. Já Mari et al. (2011) observaram que a utilização de gradiente de seleção espermática no processamento de ejaculados de ganhão subfertil-oligospérmico permitiu uma taxa de prenhez normal por ciclo em um programa de reprodução comercial.

#### **2.2.4.1. Pentoxifilina**

A pentoxifilina (fórmula molecular:  $C_{13}H_{18}N_4O_3$ ) é um fármaco derivado da metilxantina (Figura 6), cuja principal finalidade é de aumentar a perfusão sanguínea periférica. Essa ação se deve ao aumento da capacidade de deformação das células vermelhas do sangue (efeito conhecido como hemorreológico), por atuar na fosforilação e ligação cruzada de proteínas da membrana plasmática, aumentando sua maleabilidade (Ward e Clissold, 1987). Além disso, esse medicamento promove redução da viscosidade do sangue, diminuição do potencial para a agregação de plaquetas e formação de trombos e aumenta a síntese de prostaglandina, que é uma potente substância vasodilatadora (Collingridge e Rockell, 2000; Meru *et al.*, 2006).



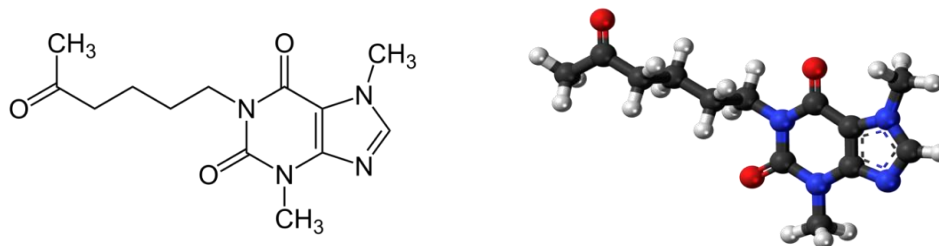


Figura 9. Fórmula estrutural bidimensional (A) e tridimensional (B) da pentoxifilina (Fonte: <https://es.wikipedia.org/wiki/Pentoxifilina>, acessado em 05/03/2017).

Associado à ação circulatória, a PTX possui uma série de propriedades imunológicas. A ação inibitória da enzima fosfodiesterase promove a hidrólise de nucleotídeos cíclicos, resultando no aumento dos níveis de AMP cíclico intracelular, ativação de Proteína Kinase A (PKA), inibição da síntese de fator de necrose tumoral (TNF) e leucotrienos, inibição de transcrição proteica de citocinas pró-inflamatórias e estimulação da transcrição de citocinas anti-inflamatórias (Ward e Clissold, 1987; Rieneck *et al.*, 1993; Neuner *et al.*, 1994; Deree *et al.*, 2008). Com isso, o efeito final é a redução da resposta inflamatória (Pozor, 2011). Esse efeito é observado em sua ação anti-apoptótica, anti-carcinogênica, miorelaxante e na melhoria da função cardíaca (Collingridge e Rockell, 2000).

A PTX é indicada ainda em alterações respiratórias, pois inibe receptores de adenosina na superfície celular, modulando a atividade da adenilato ciclase, reduzindo a constrição de vias aéreas e inibindo a liberação de histamina por mastócitos nessa região (Ward e Clissold, 1987; Marques *et al.*, 1999).

Esse fármaco tem sido amplamente utilizado na medicina, principalmente no tratamento de alterações circulatórias, como nos casos de claudicação intermitente, resultante da obstrução de artérias nos membros inferiores (Meru *et al.*, 2006), em pacientes com diabetes mellitus no intuito de minimizar os efeitos na irrigação sanguínea de tecidos periféricos (Piryaei *et al.*, 2015), em enfermidades neurológicas decorrentes de alterações vasculares como a demência, na prevenção de acidentes vasculares cerebrais e pode ser utilizada no controle circulatório de pacientes com anemia falciforme (Ward e Clissold, 1987). Também tem sido utilizada no tratamento de náuseas e dores de cabeça causadas por mudanças de altitudes, tratamento de hepatite, presumivelmente através de sua capacidade de inibir TNF- $\alpha$ , e associada a outros fármacos, reduz a extensão das lesões fibróticas em casos de câncer de mama e endometriose (Delaninan *et al.*, 2005).

Na medicina veterinária a PTX foi introduzida baseada nas aplicações terapêuticas

em humanos, e tem sido intensamente utilizada em cães para tratamentos dermatológicos (Olivry e Mueller, 2003; Singh *et al.*, 2010), em casos de lesões neurológicas (Durgut *et al.*, 2004) e hepáticas (Creamer *et al.*, 2001). Nos equinos este medicamento tem sido empregado nos casos de endotoxemia (Baskett *et al.*, 1997), laminite (Barton, 2011), placentite (Bailey *et al.*, 2010) e endometrite (Tsunoda *et al.*, 2014).

Na medicina tem sido, ainda, utilizada em centros de reprodução assistida nas diversas biotécnicas da reprodução, como na fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozoides e no preparo de sêmen para inseminação artificial antes ou após a descongelação (Yovich, 1993; Brennan e Holden, 1995; Stanic *et al.*, 2002; Esteves *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da motilidade espermática está associado ao aumento dos níveis intra-espermáticos de mediadores responsáveis pela ativação dessa célula, como íons de hidrogênio ( $H^+$ ), AMPc e íons cálcio (Hoskins *et al.*, 1978; Kann e Serres, 1980). Dessa maneira, o efeito da PTX na qualidade seminal pode ser explicado por seu mecanismo de ação de inibição da fosfodiesterase com consequente aumento intracelular de AMPc, levando à ativação e aumento da motilidade espermática (Yovich, 1993; Calogero, 1998). Além disso, em concentrações elevadas, essa substância promove a fosforilação da tirosina, levando ao início da capacitação espermática, de modo que na presença dela, o fenômeno ocorre em uma velocidade dose-dependente enquanto que em sua ausência ocorre de forma tempo dependente (Visconti *et al.*, 1995). Outro efeito benéfico que a PTX promove na qualidade seminal é a redução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), por neutralizar formas de peróxidos do meio e elevar níveis de AMPc, levando a uma inibição da via das ciclooxigenases (Gavela *et al.*, 1991).

Em equinos a PTX foi estudada como um estimulante de motilidade no sêmen refrigerado (Goular *et al.*, 2004), no sêmen descongelado (Gradil e Ball, 2000; Marques *et al.*, 2002) e nos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo (Guasti *et al.*, 2013). O baixo estado metabólico dos espermatozoides após a descongelação acarreta a presença de uma grande proporção de células espermáticas imóveis com a membrana íntegra. Assim, a adição de pentoxifilina ao sêmen descongelado parece melhorar os padrões de movimento espermático (Makler *et al.*, 1980).

A PTX tem sido utilizada também na terapia de homens subférteis com resultados promissores. Um estudo conduzido por Shill (1982) avaliou homens com problemas de fertilidade, sendo 25 deles devido à baixa motilidade espermática e 40 devido a oligospermia. Os pacientes foram tratados com pentoxifilina oral durante 90 dias e ao

término do tratamento foi observado aumento da motilidade progressiva no grupo astenozoospermico, no grupo oligospermico foi notado apenas um aumento no volume e nos níveis de frutose do ejaculado, sem diferenças quanto às características espermáticas. Estudo semelhante realizado por Moein *et al.* (2005) avaliou o efeito do tratamento oral com PTX por um período de três meses em homens astenozoospermicos e, semelhante ao estudo anterior, foi observado aumento significativo da motilidade progressiva.

Estudos moleculares e genéticos têm fornecido uma visão mais aprofundada a respeito das causas de redução da qualidade seminal e função espermática em homens com alterações que levam à degeneração testicular, como na varicocele. O aumento da temperatura gonadal leva a um aumento do processo de apoptose em células germinativas em desenvolvimento, resultando em redução da concentração espermática, além de aumentar os níveis de EROs, que leva à redução da motilidade espermática. Outro efeito é o aumento da concentração de agentes tóxicos, tais como cadimo no plasma seminal, o que pode levar ao aparecimento de espermatozoides morfologicamente anormais (Marmar, 2001). Dessa forma, os efeitos da PTX na qualidade seminal de homens com alterações testiculares foram atribuídos principalmente a melhorias da vascularização testicular, integridade de DNA e equilíbrio do estresse oxidativo (Oliva *et al.*, 2009; Pozor, 2011).

Yao *et al.* (2016) observaram que administração oral de PTX minimizou as alterações patológicas no testículo e aumentou a qualidade seminal após indução de hipóxia intermitente em ratos. Esse efeito foi atribuído ao aumento da atividade antioxidante sanguínea e testicular, maior motilidade e densidade espermática, além de menor desorganização e esfoliação de células do epitélio seminífero nos animais tratados com o fármaco. Enquanto a hipóxia intermitente diminuiu a atividade de enzimas esteroidogênicas a pentoxifilina reverteu esse efeito e preveniu mudanças morfológicas das células de Sertoli, observadas no grupo não tratado.

Queiroz *et al.* (2013) avaliaram os efeitos da pentoxifilina na regeneração testicular de ratos após estresse térmico testicular. Nos dias 3, 7 e 15 após o insulto térmico, a análise histopatológica mostrou degeneração testicular na maioria dos animais submetidos ao estresse escrotal por calor. No entanto, os animais tratados com 50 mg/kg de pentoxifilina apresentaram lesões patológicas menos graves e alguns estágios do ciclo do epitélio seminífero preservados. Já os animais tratados com 100 mg/kg de pentoxifilina não apresentaram degeneração testicular e todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero estavam presentes aos 60 dias pós-choque térmico. Os animais que não foram

tratados só apresentaram recuperação parcial da espermatogênese entre os dias 30 e 60 pós-insulto. A pentoxifilina, ainda, inibiu a apoptose das células germinativas aos 30 e 60 dias pós-choque térmico quando se utilizou a dose de 100 mg/kg. No entanto, a pentoxifilina não preveniu reduções do peso testicular e das concentrações periféricas de testosterona, que foram notadas em todos os grupos após hipertermia escrotal.

Em equinos apenas um estudo realizado por Pozor *et al.* 2011, avaliou o efeito da suplementação oral de PTX na qualidade seminal e perfusão testicular em garanhões sadios. Nele, seis garanhões Mini-horse foram suplementados com o fármaco, em um primeiro momento, por apenas três dias. Durante e após uma semana do término do tratamento houve aumento significativo da perfusão testicular, mas a qualidade seminal não foi afetada significativamente. O mesmo achado foi encontrado quando esses animais foram suplementados durante um período de 60 dias, durante e no mês seguinte ao tratamento.

Em estudo similar, Moein *et al.* (2005) demonstraram que o tratamento oral de homens inférteis com pentoxifilina, que apresentavam baixa motilidade espermática decorrente ou não de varicocele, apresentaram melhora significativa da porcentagem de espermatozoides rápidos. Com isso, concluíram que o tratamento oral com este fármaco é útil para a melhoria dos problemas de movimento espermático em pacientes com ejaculados astenozoospermicos, além do benefício à pacientes com varicocele.

Oliva *et al.* (2009) examinaram o efeito de 12 semanas de administração oral diária de pentoxifilina associada ao sulfato de zinco e ácido fólico na qualidade do sêmen de 36 homens com histórico de infertilidade associada a varicocele. Após quatro semanas do início do tratamento, a proporção de espermatozoides morfolologicamente normais foi significativamente superior ao momento pré-tratamento esse resultado perdurou até quatro semanas após o término da administração oral dos fármacos. Quando apenas os pacientes com parâmetros seminais abaixo dos limites da Organização Mundial da Saúde (OMS) foram avaliados, a morfologia espermática melhorou significativamente durante e após o tratamento. O volume seminal também aumentou ligeiramente entre as semanas 8 e 16, enquanto que a motilidade espermática se elevou na semana 12 após o início do tratamento.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vencer obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

- Avaliar a eficácia do tratamento oral com pentoxifilina na recuperação das funções testiculares em garanhões submetidos ao estresse térmico testicular;
- Avaliar se o método de insulação utilizado foi eficiente em induzir degeneração testicular em garanhões.
- Auxiliar no melhor entendimento da degeneração testicular na espécie equina.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Capítulo 1 - Avaliar o efeito do tratamento oral com pentoxifilina sobre os parâmetros espermáticos de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal;
- Capítulo 2 - Avaliar o efeito do tratamento oral com pentoxifilina sobre a morfometria, histologia e expressão gênica testicular de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal;

*“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”*

*Eleanor Roosevelt*

#### 4. REFERÊNCIAS

- Alvarenga, M.A.; Papa, F.O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal Suplemento*, n.6, p.204-09, 2009.
- Alves, M.B.R.; Andrade, A.F.C.; Arruda, R.P.; Batissaco, L.; Florez-Rodriguez, S.A.; Oliveira, B.M.M.; Torres, M.A.; Lançoni, R.; Ravagnani, G.M.; Prado-Filho, r.R.; Vellone, V.S.V.; Losano, J.D.A.; Franci, C.R.; Nichi, M.; Celeghini, E.C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. *Theriogenology*, v. 86, p.795–805, 2016.
- Amann, R.P. A review of anatomy and physiology of the stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 1, p. 83-105, 1981a.
- Amann, R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal of Andrology*, v. 2, p. 37-58, 1981b.
- Amann, R.P. Functional anatomy of the adult male, In: McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, E.and Varner, D.D. *Equine Reproduction*, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Philadelphia, London, p. 867-80 11, 2011.
- Arruda, R.P.; Celeghini, E.C.C.; Garcia, A.R.; Santos, G.D.C.; Leite, T.G., Oliveira, L.Z.; Rodrigues, M.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 39, n. 1, p. 47-60, 2015.
- Awad, H.; Halawa, F.; Mostafa, T. Melatonin hormone profile in infertile males. *International Journal of Andrology*, v.29, p.409-13, 2006.
- Bailey, T.L.; Hudson, R.S.; Powe, T.A.; Riddell, M.G.; Wolfe, D.F.; Carson, R.L. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. *Theriogenology*, v. 49, p. 581-94, 1998.
- Bailey, C.S.; Macpherson, M.L.; Pozor, M.A.; Troedsson, M.H.T.; Benson, S.; Giguere, S.; Sanchez, L.B.; LeBlanc, M.M.; Vickroy, T.W. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. *Theriogenology*. v. 74, n. 3, p. 402–12, 2010.
- Ball, B. A. Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.28, n.11, p.650-55, 2008a.
- Ball, B.A.; Conley, A.J.; Grundy, S.A.; Sabeur, K.; Liu, I.K. Expression of anti-Mullerian hormone (AMH) in the equine testis. *Theriogenology*. v. 15, n.69, p. 624-31, 2008b.
- Ball, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, v. 107, n. 3, p. 257-67, 2008c.
- Banks, S.; King, S.A.; Irvine, D.S.; Saunders, P.T. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, v. 129, p. 505-14, 2005.
- Barton, M.H. Is there a role for pentoxifylline in laminitis? *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 31, n. 10, p. 587-88, 2011.
- Baskett, A.; Barton, M.H.; Norton, N.; Anders, B.; Moore, J.N. Effect of pentoxifylline, flunixin meglumine, and their combination on a model of endotoxemia in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 58, n. 11, p. 1291-99, 1997.
- Blanchard, T.L; Bretzlaff, K.; Varner, D.D. Identifying testicular hypoplasia in large animals. *Veterinary Medicine*, v. 85, p. 405-08, 1990.



- Blanchard, T.L.; Varner, D.D. Testicular Degeneration. In *Equine Reproduction*. McKinnon AO, Voss JL. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 855-60, 1993.
- Blanchard, T.L.; Jorgensen, J.B.; Varner, D.D.; Forrest, D.W.; Evans, J.W. Clinical observations on changes in concentrations of hormones in plasma of two stallions with thermally-induced testicular degeneration. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.16, n. 5, p. 195-201, 1996.
- Blanchard, T. L.; Varner, D. D. Evaluating breeding soundness in stallions: Predicting potential fertility. *Veterinary Medicine*, v. 5, p. 815-18, 1997.
- Blanchard, T.L.; Johnson, L. Increased germ cell degeneration and reduced germ cell:Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. *Theriogenology*, v. 47, p. 665-77, 1997.
- Blanchard, T.L.; Varner, D.D.; Johnson, L. Testicular and hormonal changes occurring in stallions with thermally-induced testicular degeneration. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, v. 56, p. 51-9, 2000.
- Blanchard, T.L.; Johnson, L.; Varner, D.D.; Rigby, S.; Brinsko, S.; Love, C.C. Low daily sperm output per ml of testis as a diagnostic criteria for testicular degeneration in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 21, p. 11-35, 2001.
- Blanchard, T.L.; Brinsko, S.P.; Love, C.C.; Vest, D.D.; Berezowski, C.B.; Wendt, K.M.; Stich, K.; Varner, D.D. Case study of processing and insemination techniques: attempts to improve fertility of an aged stallion with dilute semen of poor quality. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 31, n. 32, p. 5-11, 2012.
- Brennan, A.L.; Holden, C.A. Pentoxifylline-supplemented cryoprotectant improves human sperm motility after cryopreservation. *Human Reproduction*, v.10, p. 2308-12, 1995.
- Burns, P.J.; Douglas, R.H. Effects of a single injection of GnRH or equine pituitary extract on plasma LH and FSH concentrations in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 4, n. 6, p. 281-83, 1984.
- Calogero, A.E. Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Human Reproduction*, v.13, p.911-15, 1998.
- Carlsen, E.; Andersson, A.M.; Petersen, J.H.; Skakkebaek, N.E. History of febrile illness and variation in semen quality. *Human Reproduction*, v. 18, p. 2089-92, 2003.
- Cate, R.L.; Mattaliano, R.J.; Hession, C.; Tizard, R.; Farber, N.M.; Cheung, A.; Ninfa, E.G.; Frey, A.Z.; Gash, D.J.; Chow, E.P.; Fisher, R.A.; Bertoni, J.M.; Torres, G.; Wallner, B.P.; Ramachandran, K.L.; Ragin, R.C.; Manganaro, T.F. ; MacLaughlin, D.T.; Donahoe, P.K. Isolation of the bovine and human genes for mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, v. 45, n. 5, p. 685-98, 1986.
- Chang, S.I.; Jin, B.; Youn, P. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 218, p. 196-203, 2007.
- Claes, A.; Ball, B.A.; Almeida, J.; Corbin, C.J.; Conley, A.J. Serum anti-Mullerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology*, v. 79, n. 9, p. 1229-35, 2013.

- Collingridge, D.R.; Rockell, S.; Pentoxifylline improves the oxygenation and radiation response of BA1112 rat rhabdomyosarcomas and EMT6 mouse mammary carcinomas. *International Journal of Cancer*, v. 20, n. 90, p. 256-64, 2000.
- Creamer, K.M.; McCloud, L.L.; Fisher, L.E.; Ehrhart, I.C. Pentoxifylline rescue preserves lung function in isolated canine lungs injured with phorbol myristate acetate. *Chest*, v.119, n. 6, p.1893-900, 2001.
- Delanian, S.; Porcher, R.J.; Lefaix, J.L. Kinetics of Response to Long-Term Treatment Combining Pentoxifylline and Tocopherol in Patients With Superficial Radiation-Induced Fibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 34, p. 8570-79, 2005.
- Dellmann, H.D.; Brown, E. M. *Histologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- DelVento, V.R.; Amann, R.P.; Trotter, G.W.; Veeramachaneni, D.N.R.; Squires, E.L. Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallions. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, p. 2094-101, 1992.
- Deree, J.; Martins, J.O.; Melbostad, H.; Loomis, W.H.; Coimbra, R. Insights into the regulation of TNF- $\alpha$  production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics*, v. 63, n. 3, p. 321-28, 2008.
- Desagher, S.; Martinou, J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. *Trends of Cellular Biology*, v. 10, p. 369-76, 2000.
- Douglas, R.H.; Umphenour, N. Endocrine abnormalities and hormonal therapy. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 8, p. 237-49, 1992.
- Durgut, K.; Hosgor, K.; Gormus, N.; Ozergin, U.; Solak, H. The cerebroprotective effects of pentoxifylline and aprotinin during cardiopulmonary bypass in dogs. *Perfusion*. v.19, n. 2, p. 101-06, 2004.
- Edwards, F.J. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. *Animal Reproduction Science*, v. 107, p. 197-207, 2008.
- Esteves, S.C.; Spaine, D.M.; Cedenho, A.P. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor nitrogen. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, v.40, p.985-92, 2007.
- Faber, N.F.; Roser, J.F. Testicular biopsy in stallions: diagnostic potential and effects on prospective fertility. *Journal of Reproduction Fertility Supply*, v. 56, p. 31-42, 2000.
- Garner, D.L.; Hafez, E.S.E. Spermatozoa and seminal plasma. In: *Reproduction in Farm Animals*, 6th edition. E.S.E. Hafez (Ed). Philadelphia: Lea and Febiger, p.165-187, 1993.
- Gehlen, H.; Bartmann, C.P.; Klug, E.; Schoon, H.A. Azoospermia due to testicular degeneration in a breeding stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 21, p. 137-39, 2001.
- Gerlach, T.; Aurich, J.E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 197-213, 2000.
- Ghosh, D.; Das, U.B.; Misro, M. Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitami-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: A correlative approach to oxidative stress. *Free Radical Research*, v, 36, p. 1209-18, 2002.

- Gottlieb, E.; Vander Heiden, M.G.; Thompson, C.B. Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Molecular Cellular Biology*, v. 20, p. 5680-689, 2000.
- Goulart, H.M.; Silva, A.E.D.F.; McManus, C.; Papa, F.O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de eqüinos, após o resfriamento a 50°C. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, p.112-122, 2004.
- Gradil, C.M.; Ball, B.A. The effects of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.1041-1047, 2000.
- Griswold, M.D. "Spermatogenesis: the commitment to meiosis." *Physiological Reviews*, v. 96, n.1. p. 1. p. 17, 2016.
- Guasti, P.N.; Monteiro, G.A.; Maziero, R.R.; Martin, I.; Avanzi, B.R.; Dellaqua, J.A.; Papa, F.O. Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. *Journal of equine veterinary Science*, v. 33, n. 12, p. 1153-56; 2013.
- Gupta, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *International Journal of Oncology*, v. 22, p. 15-20, 2003.
- Gupta, R.S.; Gupta, E.S.; Dhakal, B.K.; Thakur, A.R.; Ahnn, J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Molecular Cells*, v. 17, n. 1, p. 132-139, 2004.
- Hafez, B.; Hafez, E.S.E. *Animal Reproduction*. 7ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2004.
- Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v. 407, p. 770-76, 2000.
- Hikim, A.P.; Lue, Y.; Yamamoto, C.M.; Vera, Y.; Rodriguez, S.; Yen, P.H.; Soeng, K.; Wang, C.; Swerdloff, R.S. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology*, v. 144, p. 3167-175, 2003.
- Hinrichs, K.; Choi, Y. Assisted Reproductive techniques in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 4, p. 210-18, 2000.
- Holst, B.S.; Dreimanis, U. Anti-Mullerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours. *BMC Veterinary Research*, v.11, p. 166, 2015.
- Humphrey, J.D.; Ladds, P.W. A quantitative histological study of changes in the bovine testis and epididymis associated with age. *Research in Veterinary Science*, v. 19, p. 135-41, 1975.
- Irvine, C.H.; Alexander, S.L.; Turner, J.E. Seasonal variation in the feedback of sex steroid hormones on serum LH concentrations in the male horse. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 76, p. 221-230, 1986.
- Ishii, T.; Matsuki, S.; Iuchi, Y.; Okada, F.; Toyosaki, S.; Tomita, Y.; Ikeda, Y.; Fujii, J.; Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radical Research*, v. 39, p. 697-705, 2005.
- Izu, H.; Inouye, S.; Fujimoto, M.; Shiraishi, K.; Naito, K.; Nakai, A. Heat shock transcription factor 1 is involved in quality control mechanisms in male germ cells. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 18-24, 2004.
- Jia, Y.; Hikim, A.P.; Lue, Y.H.; Swerdloff, R.S.; Vera, Y.; Zhang, X.S.; Hu, Z.Y.; Li, Y.C.; Liu, Y.X.; Wang, C. Signaling pathways for germ cell death in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) induced by mild testicular hyperthermia and exogenous testosterone treatment. *Biology of Reproduction*, v. 77, p. 83-92, 2007.

Johnson, L.; Petty, C.S.; Neaves, W.B. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biology of Reproduction*, v. 22, p. 1233–44, 1980.

Johnson, L.; Neaves, W.B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, v. 24, p. 703-12, 1981.

Johnson, L.; Nguyen, H.B. Annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 76, p. 311-16, 1986.

Johnson, L. Spermatogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*. Edited by Cupps P. New York: Academic Press, p. 173-219, 1990.

Johnson, L.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D.; Scrutchfield, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*, v. 48, p. 1199-216, 1997.

Kastelic, J.P.; Coulter, G.H.; Cook, R.B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology* 44:147–152, 1995.

Kastelic, J.P.; Coulter, G.H.; Cook, R.B. 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.

Kastelic, J.P.; Cook, R.B.; Coulter, G.H. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 13, n.2, p. 271-82, 1997a.

Kastelic, J.P.; Cook, R.B.; Coulter, G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Animal Reproduction Science*, v. 45, p. 255–61, 1997b.

Kastelic, J.P.; Cook, R.B.; Coulter, G.H. Effects of ambient temperature and scrotal fleece cover on scrotal and testicular temperatures in rams. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 63, p. 157–60, 1999.

Kastelic, J.P.; Wilde, R.; Bielli, A.; Genovese, P.; Bilodeau-Goeseels, S.; Thundathil, J. Hyperthermia is more important than hypoxia as a cause of disrupted spermatogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p.166, 2008.

Kim, B.; Park, K.; Rhee, K. Heat stress response of male germ cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 70, p. 2623–36, 2013.

Lagerlof, N. Infertility in male domestic animals. *Veterinary Medicine*, v. 33, p. 550-61, 1938.

Legare, C.; Thabet, M.; Sullivan, R. Expression of heat shock protein 70 in normal and cryptorchid human excurrent duct. *Molecular Human Reproduction*, v. 10, p. 197–202, 2004.

Leme, D.P.; Papa, F.O. Testicular fine needle aspiration cytology from a stallion with testicular degeneration after external genitalia trauma. *Journal of Equine Veterinary Science* v.22, n. 3, p.121-24. 2002.

Liu, Y.X. Temperature control of spermatogenesis and prospect of male contraception. *Frontiers in Bioscience* v. 2, p. 730-55, 2010.

Loeffler, M.; Kroemer, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Experimental Cell Research*, v. 256, p. 19-26, 2000.

Love, C.C.; Garcia, M.C.; Riera, F.R.; Kenney, R.M. Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, v. 44, p. 99–105, 1991.

Love, C.C.; Kenney, R.M. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 615-20, 1999.

Love, C.C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, v. 76, n. 3, p. 547-557, 2011.

Lue, Y.H.; Hikim, A.P.; Swerdloff, R.S.; Im, P.; Taing, K.S.; Bui, T.; Leung, A.; Wang, C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, v. 140, p.1709-17, 1999.

Lue, Y.H.; Lasley, B.L.; Laughlin, L.S.; Swerdloff, R.S.; Hikim, A.P.; Leung, A.; Overstreet, J.W.; Wang, C. Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Andrology*, v. 23, p. 799–805, 2002.

Lue, Y.H.; Sinha, H.A.P.; Wang, C.; Leung, A.; Swerdloff, R.S. Functional role of inducible nitric oxide synthase in the induction of male germ cell apoptosis, regulation of sperm number, and determination of testes size: evidence from null mutant mice. *Endocrinology*, v. 144, p. 3092-100, 2003.

Marmar, J.L. Varicocele and male infertility. Part II. The pathophysiology of varicocele in the light of current molecular and genetic information. *Human Reproduction Update*. v.7, p. 46-72, 2001.

Mari, G.; Castagnetti, C.; Rizzato, G.; Mislei, B.; Iacono, E.; Merlo, B. Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility Original Research Article *Animal Reproduction Science*, v. 126, n 1-2, p. 96-100, 2011.

Marques, L.J.; Zheng, L.; Poulakis, N.; Guzman, J.; Costabel, U. Pentoxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory Critical Care Medical*, v. 159, n. 2, p. 508-11, 1999.

Marques, A.; Arruda, R.P.; Celeghini, E.C.C.; Gobesso, A.A.O.; Neves-Neto, J.R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology*, v.58, p.257-60, 2002.

Meru, V.A.; Mitra, S.; Thyagarajan, B.; Chugh, A. Intermittent claudication: An overview. *Atherosclerosis*, v. 187, n. 2, p. 221-37, 2006.

Moein, M.R.; Khalili, M.A.; Davoudi, A. The effect of oral administration of pentoxifylline on sperm motility of asthenozoospermic ejaculates from men with or without testicular varicocele. *Journal of Reproduction Medicine*, v. 3, p. 25–9, 2005.

Murase, H; Saito, S; Amaya, T; Sato, F; Ball, B.A; Nambo, Y. Anti-Mullerian hormone as an indicator of hemi-castrated unilateral cryptorchid horses. *Journal of Equine Science*, v. 26, n.1, p. 15-20, 2015.

Neuner, P.; Kosner, G.; Shauer, E. Pentoxifylline in vivo down regulates the release of IL1 $\beta$ , IL6, and Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$  by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*, v. 83, p. 262-67, 1994.

- Olivry, T.; Mueller, R.S. International task force on canine atopic dermatitis. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 14, n. 3, p. 121-46, 2003.
- Paul, C.; Teng, S.; Saunders, P.T. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biology of Reproduction*, v. 80, p. 913-19, 2009.
- Peltola, V.; Huhtaniemi, I.; Ahotupa, M. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. *Biology of Reproduction*, v.53, p.1146-50, 1995.
- Perez-Crespo, M.; Pintado, B.; Gutierrez-Adan, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, p. 40-7, 2008.
- Ponce, A.A.; Cuneo, M.F.; Ruiz, R.D.; Vincenti, L.M.; Santillá, M.E.; Stutz, G.; Lacuara, J.L. Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. *Archives of Andrology*, v.43, p.77-84, 1999.
- Pozor, M.A.; McDonnell, S.M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology*, v. 61, p. 799–810, 2004.
- Pozor, M. Effect of pentoxifylline treatment on testicular perfusion and semen quality in Miniature horse stallions. *Theriogenology*. v. 76, p. 1027-35, 2011.
- Ramires-Neto, C.; Monteiro, G.A.; Delfiol, D.J.Z.; Farras, M.C.; Dell'aqua, J.A.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A. The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. *Livestock Science*, v. 157, p. 358-63, 2013.
- Rey, R.; Lordereau-Richard, I.; Carel, J.C.; Barbet, P.; Cate, R.L.; Roger, M. Antimullerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 77, p. 1220-6, 1993.
- Rey, R.; Lukas-Croisier, C.; Lasala, C.; Bedecarras, P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 211, p.21-31, 2003.
- Rockett, J.C.; Mapp, F.L.; Garges, J.B.; Luft, J.C.; Mori, C.; Dix, D.J. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 229-39, 2001.
- Roser, J.F. Endocrine regulation of reproductive function in fertile, subfertile and infertile stallions. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 30, p. 245-50, 1995.
- Roser, J.F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Animal Reproduction Science*, v. 68, p. 139-51, 2001.
- Roser, J.F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science*, v. 107, p.179-196, 2008.
- Rucker, E.B.; Dierisseau, P.; Wagner, K.U.; Garrett, L.; Wynshaw-Boris, A.; Flaws, J. A.; Hennighausen, L. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular Endocrinology*, v. 14, p. 1038-52, 2000.
- Schill, W.B. Therapy of idiopathic astheno- and oligozoospermia with pentoxifylline. *Fortschr Medicine*. v. 100, p. 696 –700, 1982.

- Semercioz, A.; Onur, R.; Ogras, S. Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuro Endocrinology Letter*, v. 24, p.86-90, 2003.
- Setchell, B.; Maddocks, S.; Brooks, D. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill JD. New York: Raven Press, 1994.
- Setchell, B.P. The Parkes lecture Heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 114, p. 179-94, 1998.
- Setchell, B.P.; Ploen, L.; Ritzen, E.M. Reduction of long-term effects of local heating of the testis by treatment of rats with a GnRH agonist and an anti- androgen. *Reproduction*, v. 122, p.255-63, 2001.
- Setchell, B.P.; Ploen, L.; Ritzen, E.M. Effects of local heating of rat testes after suppression of spermatogenesis by pre-treatment with a GnRH agonist and an anti-androgen. *Reproduction*, v. 124, p. 133-40, 2002.
- Setchell, B.P. The effects of heat on the testes of mammals. *Animal Reproduction*, v.3, n.2, p.81-91, 2006.
- Shaha, C.; Tripathi, R.; Mishra, D.P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, v. 27, n. 365, p. 1501-15, 2010.
- Shiraishi, K.; Matsuyama, H.; Takihara, H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Introduction Journal of Urology*, v. 19, p. 538-50, 2012.
- Singh, S.K.; Dimri, U.; Saxena, S.K.; Jadhav, R.K. Therapeutic management of canine atopic dermatitis by combination of pentoxifylline and PUFAs. *Journal of Veterinary Pharmacol Therapy*, v. 33, n. 5, p.495-98, 2010.
- Stanic, P.; Sonicki, Z.; Suchanek, E. Effect of pentoxifylline and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v.25, p.186-90, 2002.
- Stewart, B.L.; Roser, J.F. Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 15, p. 129-39, 1998.
- Suleiman, S.A.; Ali, M.E.; Zaki, Z.M. Lipid peroxidation and human sperm motility: Protective role of vitamin E. *Journal of Andrology*, v. 17, p. 530-7, 1996.
- Swierstra EE, Gebauer MR, Pickett BW. Reproductive physiology of the stallion I. Spermatogenesis and testis composition. *J Reprod Fertil* 1974; 40:113–123.
- Swierstra, E.E.; Pickett, B.W.; Gebauer, M.R. Spermatogenesis and duration of transit of spermatozoa through the excurrent ducts of stallions. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, v. 23, p. 53-7, 1975.
- Takahashi, M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2012.
- Tesarik, J.; Thebault, A.; Testart, J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Human Reproduction*, v.7, p.1257–1263, 1992.

- Thompson, J.A.; Love, C.C.; Stich, K.L.; Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D. A Bayesian approach to prediction of stallion daily sperm output. *Theriogenology*, v. 62, p. 1607–17, 2004.
- Tremellen, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction*, v.14, p.243–58, 2008.
- Tsunoda, R.H.; Celeghini, E.C.C.; Arruda, R.P.; Recalde, E.C.S.; Oliveira, B.M.M.; Nichi, M.; Florez-Rodriguez, S.A.; Thome, H.E. The effect of semen extender supplemented with pentoxifylline on post-breeding inflammation response assessed by endometrial cytology. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 34, n. 1, p. 156, 2014.
- Turner, R.M.; Casas-Dolz, R. Differential gene expression in stallions with idiopathic testicular degeneration. *Theriogenology*, v. 58, p. 421-24, 2002
- Turner, R.M. Testicular Abnormalities. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine reproduction*. Philadelphia: Saunders. p. 715-45, 2003.
- Turner, R.M. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 6, p. 278-284, 2007.
- Turner, R.M.; Zeng, W. The Emerging Pathophysiology of Age-related Testicular Degeneration with a Focus on the Stallion and an Update on Potential Therapies. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 4, p. 178-86, 2012.
- Vadiei, K.; Tucker, S.D.; Lopezberestein, G.; Wasan, K.M. Nephroprotective mechanism(s) of pentoxifylline-reduction of erythrocyte-mediated vascular congestion and inhibition of nitric oxide releases. *Pharmacology and Toxicology*, v. 78-174, 1996.
- Varner, D.D.; Love C.C.; Brinsko S.P.; Blanchard, T.L.; Hartman, D.L. Semen Processing for the Subfertile Stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 28, p. 677-85, 2008.
- Varner, D.D.; Love, C.C.; Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Hartman, D.L.; Bliss, S.B. Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Animal Reproduction Science*, v. 126, p. 96-100, 2011.
- Veeramachaneni, D.N.; Ott, R.S.; Heath, E.H.; McEntee, K.; Bolt, D.J.; Hixon, J.E. Pathophysiology of small testes in beef bulls: relationship between scrotal circumference, histopathologic features of testes and epididymides, seminal characteristics, and endocrine profiles. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, p. 1988-99, 1986.
- Vera, Y.; Diaz-Romero, M.; Rodriguez, S.; Lue, Y.; Wang, C.; Swerdloff, R.S. Mitochondria-dependent pathway is involved in heat-induced male germ cell death: lessons from mutant mice. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 1534-40, 2004.
- Vera, Y.; Rodriguez, S.; Castanares, M.; Lue, Y.; Atienza, V.; Wang, C.; Swerdloff, R.S.; Sinha Hikim, A.P. Functional role of caspases in heat-induced testicular germ cell apoptosis. *Biology of Reproduction*, v. 72, p. 516-22, 2005.
- Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature*, v. 408, p. 307-10, 2000.
- Waites, G.M.; Moule, G.R. Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.2, p.213-24, 1961.
- Ward, A.; Clissold, S.P. Pentoxifylline. *Drugs*, v. 34, n. 1, p 50-97, 1987.
- Watson, E.D.; Clarke, C.J.; Else, R.W.; Dixon, P.M. Testicular degeneration in 3 stallions. *Equine Veterinary Journal*, v. 26, p. 507-10, 1994.



Watson, E.D.; Nikolakopoulos, E.; Gilbert, C.; Goode, J. Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. *Theriogenology*, v. 51, p. 855-65, 1999.

Widlak, W.; Winiarski, B.; Krawczyk, A.; Vydra, N.; Malusecka, E.; Krawczyk, Z. Inducible 70 kDa heat shock protein does not protect spermatogenic cells from damage induced by cryptorchidism. *International Journal of Andrology*, v. 30, p. 80-7, 2007.

Yao, C.; Li, G.; Qian, Y.; Cai, M.; Yin, H.; Xiao, L.; Tang, W.; Guo, F.; Shi, B. Protection of pentoxifylline against testis injury induced by intermittent hypobaric hypoxia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-9, 2016.

Yin, Y.; DeWolf, W.C.; Morgentaler, A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 492-6, 1998.

Yin, Y.; Hawkins, K.L.; Dewolf, W.C.; Morgentaler, A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *Journal of Andrology*, v. 18, n. 2, p. 159-165, 1997.

Yovich, J.L. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Human Reproduction*, v.8, p.1786-91, 1993.

*“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”*

*Thomas Edson*

O artigo a seguir foi redigido de acordo com as normas do periódico científico **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/guidelines/>

## **Benefícios do tratamento oral com pentoxifilina nos parâmetros espermáticos de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal**

### **Resumo**

O presente estudo propõe avaliar o efeito do tratamento oral com pentoxifilina na qualidade seminal de garanhões submetidos a estresse térmico escrotal. Os garanhões, foram divididos em três grupos: Controle (CT, n=4), Degenerado (DT, n=5) e Degenerado Tratado (PTX, n=5). O estresse térmico escrotal foi induzido nos grupos DG e PTX durante uma hora, duas vezes ao dia, durante dois dias. No dia seguinte, o tratamento oral com 17 mg/kg de pentoxifilina (a cada 12 horas) foi iniciado no grupo PTX, e conduzido por 30 dias. Os animais foram avaliados durante 60 dias quanto a cinética, morfologia e viabilidade espermática. Dentre os resultados obtidos, o tratamento com pentoxifilina apresentou efeito benéfico na motilidade total e na porcentagem de espermatozoides rápidos. Além disso, a pentoxifilina minimizou a peroxidação lipídica e preveniu a ativação de mecanismos de apoptose, além de reduzir o número de defeitos espermáticos. O grupo PTX atingiu valores similares ao grupo CT, quanto a motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática, de forma mais precoce do que o DG. No entanto, mais estudos quanto a dose e tempo de tratamento com a pentoxifilina são necessários para ampliar o conhecimento e efetividade dessa droga em enfermidades testiculares em equinos.

Palavras-chave: equinos, degeneração testicular, espermatozoide, citometria de fluxo, apoptose, estresse oxidativo.

### **Introdução**

Os mecanismos responsáveis pela infertilidade masculina ainda são desafiadores para se determinar devido à diversidade de processos que interferem na espermatogênese [1]. Dentre todas as afecções, a degeneração testicular é a causa conhecida mais importante da redução da fertilidade nos machos mamíferos terrestres [2-4]

As interferências no mecanismo de termorregulação testicular geralmente consistem no foco inicial do problema, uma vez que a espermatogênese normal ocorre a uma temperatura de 3 a 4° C abaixo da temperatura corporal nos equinos [5]. O aumento

de 1° C na temperatura escrotal implica na diminuição de 14% na espermatogênese [6], causando redução da concentração e motilidade espermática e no aparecimento de espermatozoides morfologicamente anormais no sêmen [7-13].

A hipertermia testicular leva ao incremento do metabolismo tecidual e demanda por oxigênio e glicose, que sem aumento correspondente do suprimento sanguíneo, resulta em hipóxia [4,14-18] e hipoglicemia [19-23]. Além disso, nessas condições, ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) [24-28], danos moleculares a proteínas e ácidos nucleicos [16,29,30] e ativação de mecanismos de apoptose [12,31-37], levando a danos à espermatogênese e conseqüentemente na fertilidade.

Não há tratamento conhecido comprovado para degeneração testicular, porém se a causa primária for removida, poderá haver gradualmente uma melhora na qualidade seminal nos próximos dois meses [4,5,10]. Entretanto, o prognóstico reprodutivo é variável, pois enquanto alguns indivíduos apresentam retorno da fertilidade ao mesmo nível de antes do insulto, em outros casos pode não haver total recuperação do parênquima testicular [10].

Estudos em humanos [38-40] e ratos [28,41] com alterações andrológicas que comprometem a fertilidade, como varicocele, oligospermia e atenozoospermia demonstraram o efeito benéfico da pentoxifilina nos parâmetros espermáticos e testiculares desses pacientes. Esse efeito é atribuído aos mecanismos de ação deste fármaco em aumentar a microcirculação de órgãos, mediante ação na deformabilidade de hemácias, viscosidade sanguínea e vasodilatação, aprimorando, assim, o suporte sanguíneo e refletindo em melhorias da função testicular [42-44]. Além de suas propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, atenuando danos causados à gônada masculina [42-52].

Nos equinos a suplementação por via oral com pentoxifilina, na dose de 8,5 e 17 mg/Kg, foi avaliada apenas em animais sadios, no intuito de avaliar a perfusão testicular e qualidade seminal. Observou-se como resultado um aumento da perfusão testicular durante e uma semana, após ambos os tratamentos, e discreto aumento do número total de espermatozoides no ejaculado, quando a maior dose foi utilizada [53].

Adicionalmente, o efeito deste fármaco como um estimulante de motilidade espermática equina já foi demonstrado em estudos *in vitro* [54-56] e pode ser explicado por seu mecanismo de ação de inibição da enzima fosfodiesterase com conseqüente

aumento intracelular de AMPc, levando à ativação e aumento da motilidade espermática [57,58].

Apesar de a degeneração testicular ter incidência elevada e gerar significativo impacto econômico na indústria equina [7,10], pelo conhecimento dos autores, nenhuma pesquisa se propôs avaliar o efeito da administração oral da pentoxifilina em parâmetros espermáticos de garanhões com esta afecção. Nesse sentido, o presente estudo objetiva avaliar o efeito do tratamento oral com pentoxifilina sobre a qualidade espermática de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal.

## **Material e Métodos**

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Campus de Botucatu, São Paulo, sob protocolo CEUA71/2014.

### *Animais e Local da Pesquisa*

O estudo foi conduzido de julho a dezembro na Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu — São Paulo, Brasil. Os critérios de inclusão dos animais no estudo consistiram em bom estado físico geral, características seminais e testiculares normais previamente estabelecidas para a raça [59].

Foram utilizados quatorze garanhões da raça Minihorse, em maturidade sexual, com idades entre 4 e 8 anos (mediana 5 anos). Os animais foram mantidos em piquete e receberam feno de *Cost-cross (Cynodon dactylon)* e concentrado comercial (Primor Top Horse laminada MP81, Rações Primor, São Paulo, SP, Brasil) duas vezes ao dia e tiveram acesso a água e sal mineral *ad libitum*.

Nos cinco meses anteriores ao período experimental os garanhões foram adaptados ao ambiente do estudo e foram mantidos em uma rotina de duas coletas de sêmen por semana, para esgotamento das reservas extra-gonadais de espermatozoides e estabilização dos parâmetros seminais.

### *Grupos experimentais*

Inicialmente os garanhões foram agrupados com base nos parâmetros seminais (concentração espermática, volume seminal, cinética espermática e porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais) e então foram randomicamente divididos

em três grupos: grupo controle (CT), composto por 4 animais; grupo degeneração testicular (DG), composto por 5 animais submetidos a estresse térmico escrotal; e grupo degeneração testicular tratado com pentoxifilina (PTX), composto por 5 animais submetidos a estresse térmico escrotal e posteriormente tratados com pentoxifilina na forma oral.

#### *Indução da degeneração testicular*

A degeneração testicular foi induzida nos grupos DG e PTX mediante aquecimento da região escrotal. Para isso, uma bolsa térmica acoplada a uma fonte de ar aquecido a 50° C, foi utilizada.

O aquecimento foi realizado nos 10 animais durante uma hora no início da manhã e uma hora no final da tarde durante dois dias consecutivos. A temperatura interna da bolsa variou entre 45-50° C, mensurada por um termômetro digital com sonda (Intercom Comércio de Produtos Químicos, São Paulo, SP/Brasil).

No dia seguinte ao término do estresse térmico escrotal (D1) iniciou-se as coletas de dados de todos os três grupos experimentais e o tratamento dos animais do grupo PTX.

#### *Tratamento com Pentoxifilina*

Foi utilizada a dose de 17.0 mg/Kg de pentoxifilina (Perrigo API Privat Ltd., Maharashtra, Índia) para tratamento do grupo PTX com base nos resultados obtidos por Pozor et al. [53]. O fármaco na forma de xarope foi administrado por via oral, a cada 12 horas, com o auxílio de uma seringa. O tratamento foi iniciado no dia seguinte ao término do aquecimento escrotal (D1) e concluído no dia 30 (D30) do estudo.

#### *Coleta e processamento do sêmen*

A coleta dos ejaculados foi realizada duas vezes por semana, sendo iniciada 24 dias pré-aquecimento (D-24) e conduzida até os 60 dias pós-aquecimento escrotal (D60), utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) e égua estrogenizada como manequim.

A amostra seminal obtida foi filtrada em filtro de nylon (Minitube do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil) para remoção da fração gel. A avaliação do volume seminal livre de gel foi realizada com o auxílio de uma proveta graduada e, em seguida, a concentração espermática foi avaliada em câmara hematimétrica de Neubauer.

### *Análise da cinética espermática*

Parte da amostra seminal foi diluída em meio diluente a base de leite desnatado, Botu-Sêmen (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil), a uma concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL para análise de cinética espermática.

A cinética espermática foi avaliada pelo método computadorizado CASA (Hamilton Thorne Research - HTM IVOS 10, Beverly, MA, USA), quanto aos seguintes parâmetros: porcentagens de espermatozoides com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ) e velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ).

### *Análise da morfologia espermática*

A análise da morfologia espermática foi realizada em microscopia de contraste por interferência diferencial (DIC) em aumento de 100x. Para isso uma preparação úmida, mediante diluição de 500  $\mu\text{L}$  do sêmen em 500  $\mu\text{L}$  de formol salina a 10% (1:2) foi realizada, e 100 células foram avaliadas quanto à morfologia de cabeça, peça intermediária, cauda, presença de gotas, formas teratológicas e células germinativas, resultando em uma porcentagem dos defeitos encontrados.

### *Análise da integridade de membrana plasmática*

A análise de integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides foi realizada pela técnica de microscopia de epifluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Ernst-Leitz-Strabe, Wezlar, Germany), utilizando-se a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) segundo metodologia previamente descrita [60]. Nessa análise, 100 células foram contadas, sendo os espermatozoides corados integralmente em verde considerados íntegros e os espermatozoides corados em vermelho ou em verde e vermelho, considerados lesados.

### *Análise espermática por citometria de fluxo*

As análises espermáticas por citometria de fluxo foram realizadas uma vez por semana utilizando o equipamento LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW, vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Após a análise, os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1.

Em todos os ensaios as amostras foram diluídas em TALP-PVA conforme

previamente validado [61], modificado (100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10,0 mM HEPES-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 5x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, acrescido de Hoescht 33342 (7 mM em H<sub>2</sub>O, 100 µg/mL) para eliminação das partículas não celulares.

Autofluorescência e controles de cada fluorocromo foram adquiridos para ajuste de sobreposição de onda e compensação utilizando-se a matriz de compensação do próprio software. Os dados foram gerados utilizando-se gráficos *dotplot* incluindo eixo *t* (bi-exponencial) tornando todas os eventos visíveis e propriamente compensados. No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas.

A geração intracelular do ânion superóxido foi avaliada utilizando as sondas dihydroethidium (DHE; D23107, Life Technologies) associada a Sytox<sup>®</sup> Green (SG; S7020, Life Technologies). Em 500 µL da solução de sêmen foi adicionado 0,005 µM de SG e 2 µM de DHE, a incubação foi realizada por 15 min a 37° C ao abrigo da luz.

A geração do ânion superóxido na matriz mitocondrial foi avaliado utilizando as sondas MitoSox<sup>™</sup> Red (MSR; M3600, Life Technologies) associada a Sytox<sup>®</sup> Green. Assim, em 500µL da solução de sêmen foi adicionado 0,005 µM de SG e 2 µM de MSR. A incubação foi realizada por 15 min a 37° C ao abrigo da luz.

O índice de peroxidação lipídica foi avaliado utilizando a probe C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes), conforme previamente validado [62]. Uma amostra de 500 µL da solução de sêmen foi acrescida de 1,5 µM de iodeto de propídio e 1 µM C11-Bodipy. A incubação foi realizada por 30 min a 37° C ao abrigo da luz. Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens consecutivas por centrifugação a 300 x g por 5 min com TALP-PVA e o pellet foi ressuspenso em 300 µL de TALP-PVA.

O índice de ativação das caspases 3 e 7 foi acessado pelas sondas caspase 3/7-FITC (C10427, Molecular Probes) associada a iodeto de propídio. Em uma amostra de 500 µL da solução de sêmen foi adicionada de 1,5 µM de iodeto de propídio 1µL de caspase3/7-FITC, de acordo com recomendações do fabricante, e incubada a 37° C por 20 min ao abrigo da luz.

#### *Análise Estatística*

Os dados gerados foram avaliados pelo software JMP 12.0 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Estatísticas descritivas foram produzidas (medidas de tendência central e



dispersão) para caracterizar a amostra deste estudo. Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade usando o teste de adequação de ajuste qui-quadrado (*goodness of fit*), correlacionando os dados da amostra com um gráfico de probabilidade normal (*qq-plot*), e aplicando o teste de Barlett / Levene, respectivamente.

Quando os dados não apresentaram distribuição normal, eles foram transformados em escala logarítmica, e novamente avaliados quanto a distribuição e a dispersão dos resíduos.

Dados contínuos foram analisados usando um modelo misto considerando grupos e dias como efeitos fixos e ganhão como efeito aleatório. O teste de Tukey foi utilizado para análise *post hoc*. Para as amostras que não apresentaram distribuição normal, mesmo após log-transformação (ex. morfologia espermática e índice de apoptose), o teste não paramétrico de Wilcoxon/Kruskal-Wallis foi aplicado.

Os dados foram apresentados como médias não transformadas  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

## Resultados

O volume seminal (Figura 1A) e o número total de espermatozoides no ejaculado não apresentaram diferenças entre os três grupos ao longo do período de avaliação. No entanto, a concentração espermática (Figura 1B) decresceu no sêmen do grupo DG nos dias 12 e 18 após o estresse térmico escrotal em relação ao grupo CT. Já o grupo PTX não diferiu em relação aos demais grupos.

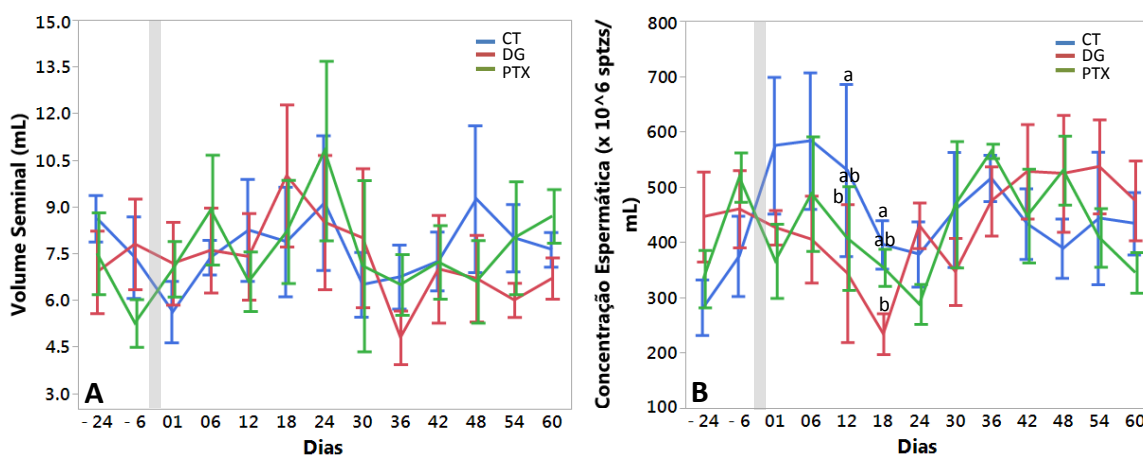
A motilidade total (Figura 2A) declinou um dia após o aquecimento escrotal em nos grupos DG e PTX, em comparação ao grupo CT. Nos dias 12 e 30 este parâmetro atingiu valores ainda menores no grupo DG em relação aos grupos PTX e CT. Apesar do grupo PTX apresentar MT superior ao grupo DG, estes valores ainda permaneceram inferiores ao grupo CT, apenas retornando a valores semelhantes por volta de 42 dias pós-insulto. Já a MT não retornou aos valores semelhantes ao CT no grupo DG durante todo o período de avaliação.

A motilidade progressiva (Figura 2B) também declinou na primeira semana pós-insulto térmico nos grupos DG e PTX em relação ao grupo CT, porém não diferiu entre esses dois grupos. No entanto, o grupo PTX atingiu valores iguais aos do grupo CT no D24, enquanto que o grupo DG só retornou definitivamente a valores similares aos do grupo CT no D48.

Da mesma forma, a porcentagem de espermatozoides rápidos (Figura 2C) reduziu

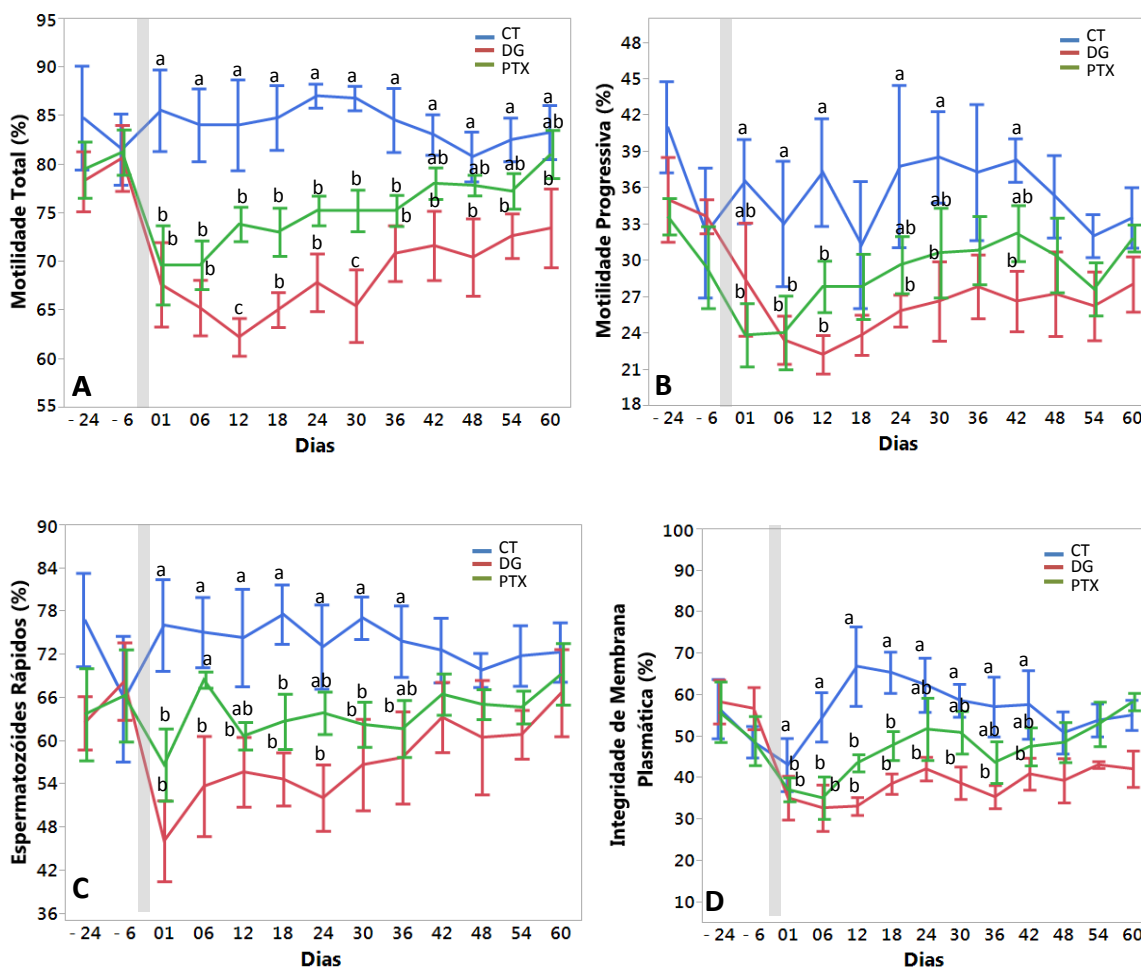
nos grupos submetidos ao aquecimento escrotal (DG e PTX) no D1 comparados ao grupo CT, porém o grupo PTX voltou a apresentar valores similares ao CT seis dias após o estresse térmico escrotal, atingindo valores superiores ao grupo DG nesse período. O grupo submetido ao choque térmico escrotal sem posterior tratamento só retornou a valores similares aos grupos CT e PTX no D42.

Os valores referentes a velocidade de trajeto, velocidade progressiva e velocidade curvilínea não diferiram ao longo da avaliação entre os grupos CT, DG e PTX ( $p>0,05$ ).



**Figura 1.** Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) para o volume seminal (A) e concentração espermática (B), nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde) avaliados 24 dias antes até 60 dias após (D-24 a D60) o término do insulto térmico escrotal. A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p<0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação.

A porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (Figura 2D) foi menor nos grupos DG e PTX em relação ao grupo CT, a partir do primeiro dia após o aquecimento escrotal. No grupo DG, a IMP permaneceu inferior ao grupo CT até o dia 48, não diferindo, no entanto, do grupo PTX em todo o período de avaliação. Já o grupo degenerado tratado com pentoxifilina retornou a valores similares ao grupo CT no dia 24 pós-insulto térmico.



**Figura 2.** Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) para a motilidade total (A), motilidade progressiva (B), espermatozoides rápidos (C) e integridade de membrana plasmática (D) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde) avaliados 24 dias antes até 60 dias após (D-24 a D60) o término do insulto térmico escrotal. A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação.

O total de defeitos espermáticos (Figura 3A) se elevou na primeira semana pós insulto escrotal nos grupos DG e PTX em relação ao grupo CT, entretanto foi similar em ambos os grupos submetidos ao estresse térmico escrotal somente até o D18, quando apresentou valores superiores no grupo DG, comparado aos demais grupos. Este parâmetro não retornou aos valores normais nos grupos DG e PTX durante todo o período de avaliação.

Quando os defeitos foram agrupados em defeitos maiores (Figura 3B), resultado muito semelhante ao anterior (Figura 3A), foi encontrado para os três grupos.

Já os defeitos menores (Figura 3C) se elevaram no sêmen dos grupos DG e PTX apenas a partir da segunda semana de avaliação, mas não diferiram entre si, e se mantiveram superiores ao grupo CT em praticamente todo o período de avaliação. Somente a partir do D48 a porcentagem de defeitos menores retornou aos valores normais em ambos os grupos submetidos a hipertermia escrotal, entretanto no D60 esses valores voltaram a se elevar no grupo DG em relação aos outros dois grupos, o que não foi observado no grupo degenerado tratado com pentoxifilina.

Os defeitos de cabeça se elevaram (Figura 3D), comparado ao grupo CT, no sêmen dos grupos DG e PTX a partir do D18, e no D36, foram maiores no grupo DG comparado ao grupo PTX até o final da avaliação. O grupo degenerado tratado começou apresentar valores semelhantes ao CT no D42, entretanto no D54 esses valores voltaram a se elevar e permaneceram em valores intermediários ao grupo DG e CT durante toda a avaliação.

Os defeitos de peça intermediária (Figura 3E) foram superiores nos dois grupos submetidos ao insulto térmico escrotal a partir do D18 em relação ao grupo CT, mas não diferiram entre si. Por volta do D30 o grupo PTX apresentou uma redução na porcentagem desses defeitos, se igualando ao grupo CT e diferindo do DG, entretanto, a partir do D48 esses valores voltaram a se elevar, se igualando a DG, e permaneceram superiores ao CT até praticamente o fim da avaliação.

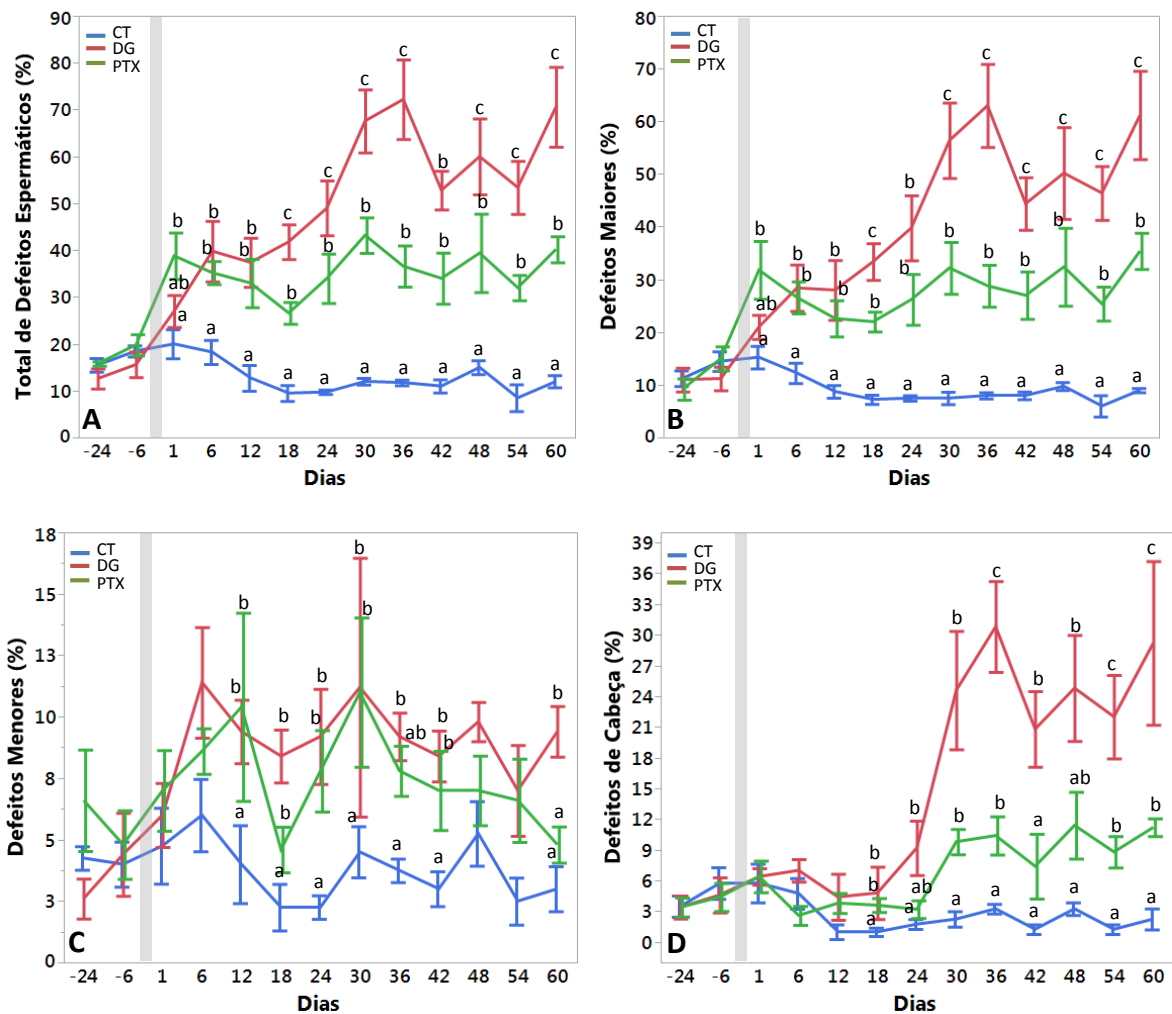
Os defeitos de cauda (Figura 3F) emergiram no sêmen a partir do D1 nos grupos DG e PTX em relação ao grupo CT, porém não diferiram entre esses dois grupos até o D18, quando atingiu valores maiores no grupo degenerado sem tratamento, comparado aos demais grupos. Entretanto, a partir do D24 os grupos submetidos ao aquecimento escrotal voltaram a se igualar, permanecendo com valores superiores ao grupo CT em praticamente toda a avaliação. O grupo PTX no D42 apresentou valores semelhantes ao grupo CT e DG, mas voltou a se elevar em relação ao grupo CT a partir o D54.

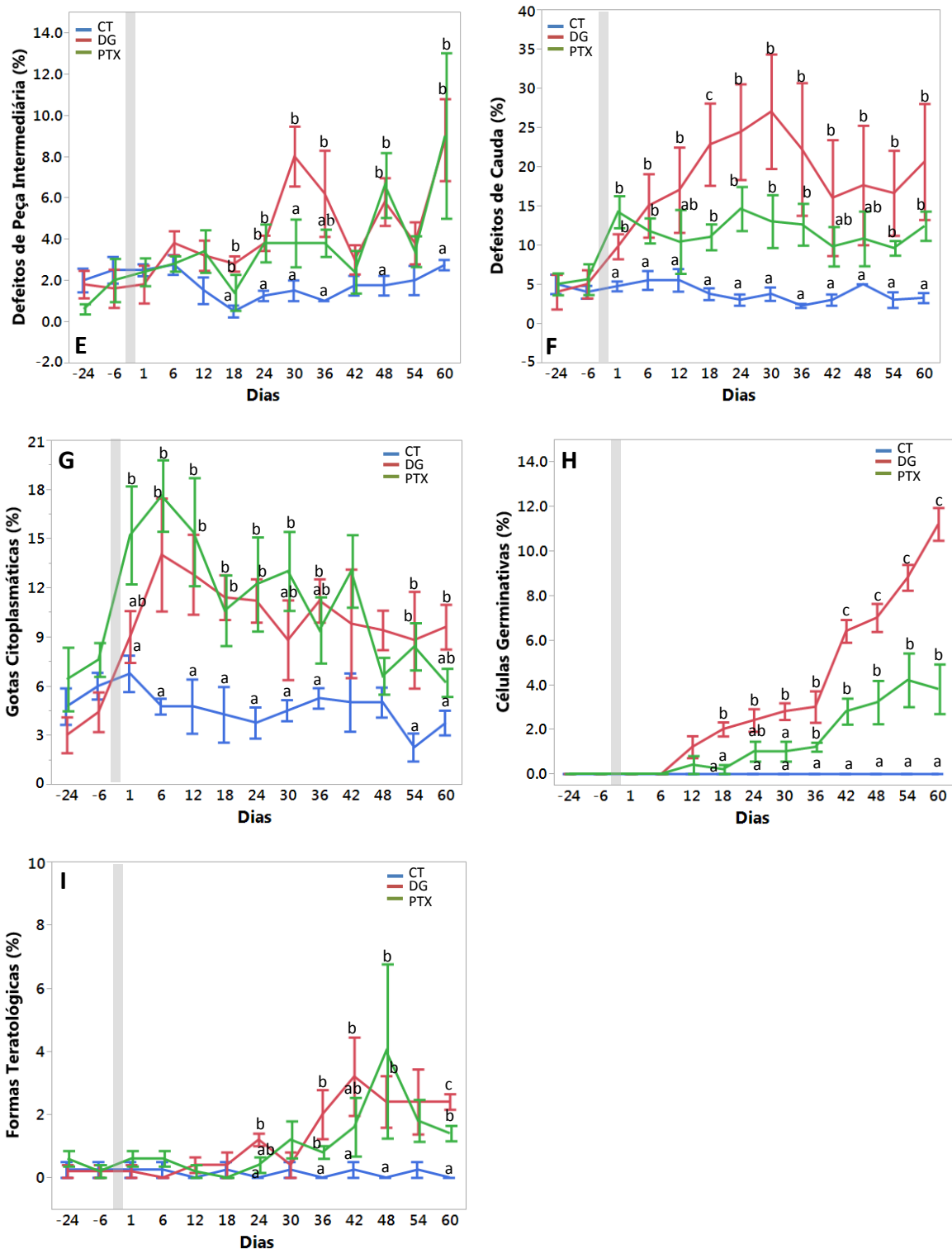
As gotas citoplasmáticas (Figura 3G) se elevaram a partir da primeira semana no ejaculado de ambos os grupos submetidos ao insulto térmico, comparados ao grupo CT. No D30 esse parâmetro retornou a valores de normalidade no grupo DG, ainda que não diferiu do grupo PTX. Por volta do D42 os três grupos apresentaram quantidades semelhantes de gotas citoplasmáticas, entretanto, no D48 os valores voltaram a aumentar nos grupos DG e PTX. No último dia de avaliação o grupo PTX voltou a apresentar valores semelhantes ao grupo CT, porém sem diferir do grupo DG.

A presença de células germinativas no sêmen (Figura 3H) aumentou a partir do D18 no grupo DG em relação aos demais grupos, persistindo até os 60 dias de avaliação. O grupo

PTX permaneceu com valores iguais ao grupo CT até o D36, quando se elevou em relação a esse grupo, porém foi inferior ao grupo DG durante toda a avaliação.

Um maior número de formas teratológicas (Figura 3I) surgiu no sêmen do grupo DG a partir do D24, após o estresse térmico escrotal em relação aos demais grupos. No D36 os grupos DG e PTX se igualaram, apresentando valores superiores ao grupo CT, no entanto no D60, o grupo DG voltou a superar o grupo PTX. Embora o grupo degenerado tratado tenha apresentado valores inferiores ao grupo DG, este grupo não se igualou ao CT ao final da avaliação.





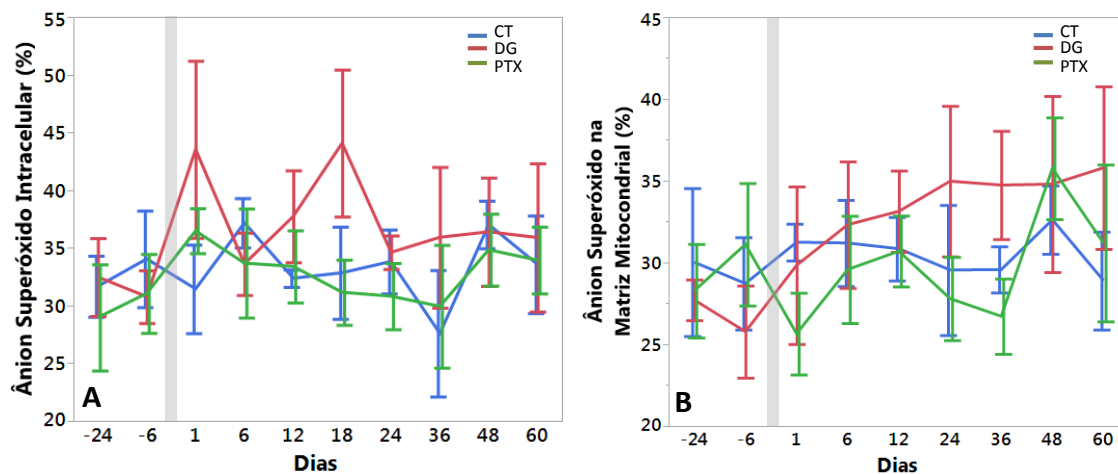
**Figura 3.** Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) para o total de defeitos espermáticos (A), defeitos maiores (B), defeitos menores (C), defeitos de cabeça (D), defeitos de peça intermediária (E), defeitos de cauda (F), gotas citoplasmáticas (G), células germinativas (H) e formas teratológicas (I) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde) avaliados 24 dias antes até 60 dias após (D-24 a D60) o término do insulto térmico escrotal.

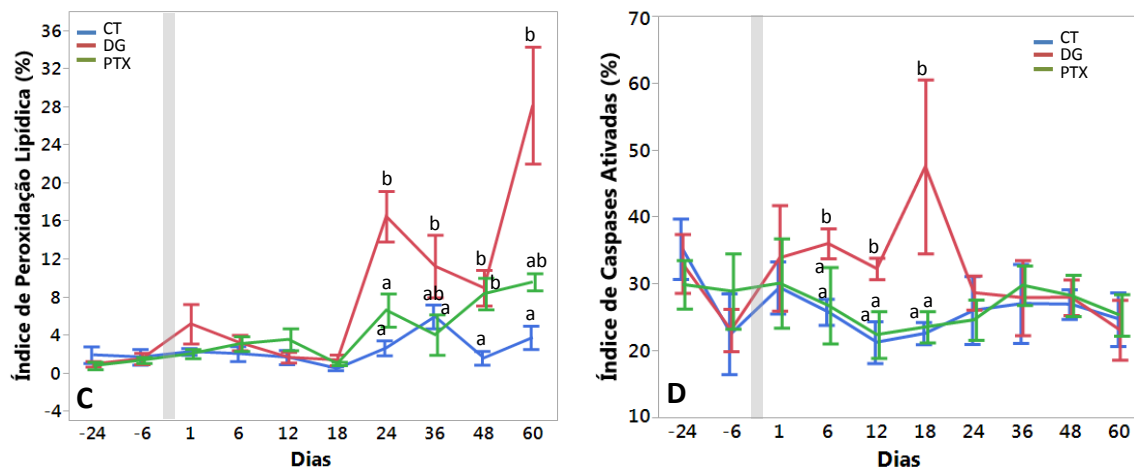
A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação.

A geração do ânion superóxido intracelular (Figura 4A) e na matriz mitocondrial (Figura 4B) não foi afetada pelo estresse térmico testicular nos grupos DG e PTX, que permaneceram com valores semelhantes ao grupo CT durante todo o período de avaliação, em ambos os ensaios.

O índice de peroxidação lipídica (Figura 4C) se elevou no grupo DG, em relação aos demais grupos, 24 dias após a hipertemia escrotal e permaneceu elevado até o último dia de avaliação. No entanto, no grupo tratado com pentoxifilina esse parâmetro só sofreu incremento no D48, permanecendo em valores similares ao grupo CT em todos os outros dias de avaliação.

O índice de caspases ativadas 3 e 7 (Figura 4D) se elevou apenas no grupo degenerado sem tratamento do D6 ao D18 após o incremento calórico testicular, diferindo dos grupos CT e PTX. Este parâmetro retornou aos valores de normalidade apenas no D24.





**Figura 4.** Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) para a geração intracelular do ânion superóxido (A), geração do ânion superóxido na matriz mitocondrial (B), Índice de peroxidação lipídica (C) e Índice de caspases 3 e 7 ativadas (D) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde), avaliados 24 dias antes até 60 dias após (D-24 a D60) o término do insulto térmico escrotal. A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação.

## Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram que o aumento da temperatura escrotal teve efeito deletério na espermatogênese e nos espermatozoides contidos no epidídimo. Além disso, o tratamento com pentoxifilina oral promoveu benefícios em minimizar e, até mesmo, prevenir a deterioração de algumas características seminais estudadas.

Estimando-se que o trânsito de espermatozoides pelo epidídimo ocorra por volta de 12 dias no garanhão [3], observamos que os defeitos espermáticos encontrados no ejaculado do dia 1 ao dia 12 pós-estresse térmico podem ser atribuídos a uma disfunção epididimária causada pelo calor. Neste período, ocorreu a elevação dos defeitos de cauda e gotas citoplasmáticas, sobretudo de defeitos graves, como a porcentagem de caudas fortemente dobradas e gotas proximais, o que promoveu também o aumento de defeitos maiores e consequentemente dos defeitos totais neste período, em ambos os grupos submetidos ao estresse térmico escrotal. O aumento de defeitos espermáticos entre as duas primeiras semanas após insulto térmico também foi verificado por diversos autores [7,63-66].

Esses resultados demonstram que o tratamento com pentoxifilina iniciado no D1



não foi eficiente em prevenir o aparecimento destes defeitos causados pelo calor no epidídimo nas primeiras duas semanas. A persistência de gotas citoplasmáticas em conjunto com a elevação de caudas dobradas nos grupos submetidos ao aquecimento escrotal demonstram que o aquecimento do escroto causou prejuízos ao funcionamento epididimário, uma vez que é durante o trânsito espermático por este órgão que ocorre a migração da gota citoplasmática da região proximal para a distal, estabilização e coerência flagelar e estabilização da membrana plasmática e acrossomal; modificações morfofuncionais que conferem maturidade e capacidade fertilizante ao espermatozoide [67-68].

O mecanismo de desprendimento da gota não é bem compreendido [69], entretanto, Amann et al. [70] demonstraram que a presença elevada deste defeito (superior a 15%) comprometeu a cinética espermática, fertilidade e desenvolvimento embrionário em bovinos. Em nosso estudo a porcentagem de espermatozoides com gotas citoplasmáticas foi superior a 15% em ambos os grupos submetidos ao estresse térmico escrotal durante este período. Este achado, associado aumento de defeitos de cauda nos grupos DG e PTX, pode explicar a redução da porcentagem de espermatozoides epididimários com motilidade total e progressiva após o insulto térmico entre o D1 e D12. Joseph et al. [71] observaram que quando o ambiente epididimário apresenta condições osmóticas diferentes daquelas encontradas nos túbulos testiculares, ocorre o choque osmótico no espermatozoide, o qual responde enrolando/dobrando a cauda, comprometendo a motilidade e a capacidade de fertilização deste gameta.

Apesar disso, a porcentagem de espermatozoides epididimários rápidos foi superior no grupo degenerado tratado com pentoxifilina comparado ao não tratado. Esse resultado pode ser atribuído a ação deste fármaco em inibir a enzima fosfodiesterase com consequente aumento intracelular de AMPc, levando à ativação e aumento da mobilidade espermática [57,58]. Esta ação foi também verificada no tratamento de homens com astenozoospermia utilizando este fármaco [38,39].

Também durante o trânsito pelo epidídimo, o decréscimo da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, nos grupos DG e PTX, pode estar relacionado ao contato desses espermatozoides com os fluídos epididimários após estresse térmico escrotal. Já que em situações de disfunção epididimária ocorrem alterações da composição iônica dos fluídos secretados, podendo conter níveis anormais de Ca, Mg, Zn e Se, afetando a estabilidade das membranas celulares que se rompem, prejudicando a capacidade fecundante dos gametas [72,73].

A pentoxifilina parece proteger as células espermáticas contidas no epidídimo e as espermatídes após a hipertermia escrotal contra a ativação de mecanismos de apoptose do D6 ao D18, uma vez que neste período o grupo DG apresentou elevação do índice de caspases ativadas 3/7, comparado ao PTX e CT. Esse resultado pode estar relacionado aos mecanismos anti-apoptóticos deste fármaco, como já descrito por diversos estudos [31,42,46-49]. Queiroz et al. [41] reforçam esse resultado ao demonstrarem inibição da apoptose nas células germinativas de ratos tratados com pentoxifilina, aos 30 e 60 dias pós-choque térmico.

A ação anti-apoptótica da pentoxifilina é novamente evidenciada, ao observarmos que coincidentemente neste período do D12-D18 o grupo PTX não apresentou diminuição da concentração espermática em relação aos demais grupos, enquanto o DG sofreu diminuição deste parâmetro em comparação ao CT. Este resultado demonstra que o estresse calórico afetou gravemente a linhagem germinativa na fase da espermiogênese (D12-D30). A diminuição da concentração espermática causa redução drástica da fertilidade nos equinos [74,75].

O calor promove a desnaturação do DNA, danifica pontes citoplasmáticas e modifica secreções espermáticas, resultando em morte celular e rarefação de determinadas populações germinativa, reduzindo o número de espermatozoides produzidos [31-35,76-78]. Corroborando com nossos resultados, Love e Kenney [79], ao observarem maiores índices de desnaturação do DNA entre os dias 10-24 e entre os dias 38-46 após aquecimento escrotal, concluíram que os estágios celulares mais afetados pelo insulto térmico escrotal correspondem às espermatídes e espermatócitos primários.

Freidman et al. [7] e Blanchard et al. [66] também observaram redução da concentração espermática após insulto térmico em equinos, entretanto os valores decresceram mais cedo e só se recuperaram de forma mais tardia, comparado ao nosso estudo. Isto pode ter ocorrido devido ao maior período de estresse térmico escrotal realizado por esses autores (24, 36 e 48 horas), que provavelmente levou a um dano mais extensivo do parênquima testicular.

No estudo em questão, o aparecimento de defeitos espermáticos, observados após o aumento da temperatura testicular, não ocorreu de maneira uniforme ao longo da avaliação. Isto parece refletir as diferentes sensibilidades dos diversos estágios de desenvolvimento das células germinativas no momento do insulto térmico (D-1 e D0).

Os defeitos espermáticos ocorridos entre D12 e D30 pós insulto, correspondem aos danos causados às espermatídes, no decorrer da espermiogênese. Neste período os

defeitos de cabeça e peça intermediária se elevaram no sêmen dos grupos DG e PTX. O insulto térmico pode ter causado anomalias na condensação nuclear e na formação flagelar que ocorrem nesta fase durante a transformação de espermátides em espermatozoides, justificando o aumento destes defeitos [80]. Em concordância com estes resultados Vogler et al. [65] e Fernandes et al. [81] observaram que alterações na forma da cabeça foram os defeitos mais prevalentes nesta fase da espermatogênese, e os atribuíram a falhas na espermiogênese média e tardia provocadas pelo calor. Estes defeitos estão intimamente associados à redução da fertilidade, temporária ou permanente, e à baixa taxa de clivagem embrionária [69].

O tratamento com a pentoxifilina preveniu o aparecimento de formas teratológicas e de células germinativas no sêmen durante o período de 12 a 30 dias após insulto térmico. Formas imaturas (redondas) e de células gigantes multinucleadas no ejaculado podem estar relacionadas à descamação de células do epitélio germinativo para a luz do túbulo seminífero. Estes achados indicam que ocorreram distúrbios na espermatogênese, e são sinais clássicos do processo degenerativo testicular [82-84]. Corroborando com nosso estudo, Yao et al. [28] observaram menor esfoliação de células redondas do epitélio para a luz do túbulo seminífero em cortes histológicos de ratos, submetidos a hipóxia intermitente, tratados com pentoxifilina. O aumento de formas aberrantes também é um sinal de que o estresse térmico causou problemas durante as divisões celulares ou na transformação de espermátides em espermatozoides e, quando elevadas, afetam severamente a fertilidade do sêmen [85].

Ainda durante esta fase o D12-D30, observamos que os defeitos de cabeça, cauda e peça intermediária permaneceram elevados nos grupo submetidos ao estresse térmico, no entanto, em determinados momentos deste período o grupo PTX se igualou grupo CT e, até mesmo, apresentou menor porcentagem desses defeitos em relação ao DG. Além disso, neste período os defeitos totais e maiores, foram superiores no grupo que não recebeu tratamento em relação ao grupo PTX, que permaneceu com valores intermediários aos demais grupos. Este resultado demonstra novamente que a pentoxifilina teve um efeito benéfico sobre as espermátides, amenizando os danos causados pelo calor.

A medida que o aparecimento de defeitos espermáticos após insulto térmico estão associados aos danos ao DNA, incremento de ROS e de agentes tóxicos no testículo [8], o mecanismo pelo qual a pentoxifilina minimiza as alterações morfológicas durante a espermatogênese pode ser explicado por suas propriedades, particularmente, o efeito anti-

oxidante. Estudos anteriores demonstraram que este fármaco minimiza a produção de ROS, e conseqüentemente, de danos ao DNA [28,86]. Oliva et al. [40] reforçam esta hipótese ao demonstrarem que a pentoxifilina, associada ao zinco em ácido fólico, reduziu a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais no sêmen de homens com varicocele.

No presente estudo a pentoxifilina também promoveu benefícios às espermátides quanto ao estresse oxidativo, uma vez que a peroxidação lipídica não sofreu incremento no grupo PTX, mas se elevou no grupo que não recebeu tratamento (DG) no D24. Esse efeito protetor possivelmente ocorreu devido ao mecanismo de ação da pentoxifilina em neutralizar formas de peróxidos do meio e inibir a ativação da via das ciclooxigenases, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio [86]. Yao et al. [28] também verificaram este efeito ao observarem aumento da atividade antioxidante sanguínea e testicular em ratos sob hipóxia, tratados com pentoxifilina.

Em consonância com o resultado anterior, o efeito benéfico da pentoxifilina também foi demonstrado sobre a integridade da membrana plasmática. Efeito pode ser notado a partir do D24, quando a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides do grupo PTX se igualou ao CT, o que não foi observado no grupo DG. Este resultado pode ser novamente atribuído a ação antioxidante da pentoxifilina, uma vez que o aumento de EROs ocasiona lise de membranas, dentre outros danos celulares [8].

Em determinados momentos deste período, correspondente aos danos espermáticos com origem na espermiogênese, o grupo DG apresentou motilidade total inferior ao PTX, demonstrando novamente que a pentoxifilina causou benefícios à cinética espermática após insulto térmico. Neste caso, a melhoria da mobilidade espermática pode ser relacionada aos menores defeitos de cauda e peça intermediária encontrados em período equivalente, associada as alterações bioquímicas que fazem deste fármaco um estimulante da motilidade, como já comentado anteriormente.

As características espermáticas ocorridas do D30-D48 e daí até o fim da avaliação, são resultados de eventos celulares que aconteceram na fase de meiose e mitose (espermatocitogênese), correspondente as fases de espermátócitos e espermatogônias, respectivamente.

Em nosso estudo o período compreendido entre D30 e D60 foi quando ocorreu maiores defeitos espermáticos, sobretudo de defeitos graves de cabeça, que comprometem substancialmente a fertilidade do garanhão. Esses resultados demonstram

que os danos mais expressivos causados pelo calor ocorreram durante as fases de meiose e espermatocitogênese, como já mencionado por diversos autores [87-90]. Esta maior sensibilidade é atribuída a alta complexidade de fenômenos celulares que acontecem durante a divisão celular - que demandam perfeito estado da célula - como a condensação nuclear, formação de centríolos e recombinação gênica, que se alterados, ocasionam defeitos graves no espermatozoide gerado [90].

No entanto, o tratamento por 30 dias com a pentoxifilina pós-insulto mostrou-se benéfico aos espermatócitos e espermatogônias. Este resultado é evidenciado ao observarmos que o grupo tratado com pentoxifilina começou a apresentar diferenças significativas de diversos parâmetros seminais em alguns momentos entre D30-D60, em comparação ao grupo DG, como menores índices de defeitos de cabeça, formas teratológicas, células germinativas, defeitos maiores e defeitos totais. Esse resultado demonstra que a pentoxifilina conferiu proteção aos espermatócitos e espermatogônias durante o aquecimento testicular, minimizando danos sofridos durante as divisões celulares nesse período. Corroborando com estes resultados, Oliva et al. [40] observaram redução de defeitos espermáticos em homens com varicocele a partir de 4 semanas após o início do tratamento com o fármaco.

O efeito protetor da pentoxifilina aos espermatócitos é reforçado ao notarmos que o índice de peroxidação lipídica do grupo PTX diferiu do DG, 24 dias após o insulto térmico escrotal. Apesar de os valores desse parâmetro se igualarem do D36-D60, em ambos os grupos submetidos ao aquecimento escrotal, o grupo tratado com o fármaco permaneceu com valores semelhantes ao do CT. A minimização da peroxidação lipídica no grupo PTX indica que o estresse oxidativo foi reduzido neste grupo, reduzindo também os defeitos espermáticos neste período, como discutido anteriormente.

Após o término do tratamento com a pentoxifilina no D30, alguns parâmetros seminais voltaram a sofrer incremento no grupo PTX, como os defeitos de peça intermediária, de cauda e formas teratológicas, sugerindo que o tratamento prolongado com o fármaco possa ser benéfico em minimizar o aparecimento desses defeitos. Esse efeito foi demonstrado em homens com varicocele, tratados com pentoxifilina durante 12 semanas. Após quatro semanas do início do tratamento ocorreu um aumento dos espermatozoides normais no sêmen e este resultado perdurou até quatro semanas após o término da administração oral do fármaco [40].

Ainda entre o D30 e D60, a cinética espermática em ambos nos grupos DG e PTX apresentou recuperação gradativa até se igualar ao CT antes mesmo do D60, no entanto,

essa recuperação ocorreu de forma mais precoce no grupo tratado com a pentoxifilina. As diferenças dos grupos DG e PTX em comparação ao CT podem ter ocorrido devido à abundância de células redondas, imóveis, presentes no ejaculado que nesse período foi superior no grupo DG em relação aos demais grupos. Estas células são contadas como imóveis na avaliação computadorizada realizada. Os fatores que influenciaram a motilidade espermática anteriormente, nesta fase não tiveram qualquer papel nesse parâmetro, já que os defeitos de cauda e de peça intermediária não diferiram entre os grupos nesse período, além do tratamento com pentoxifilina ter sido finalizado no D30, não apresentando mais influência sobre a motilidade do PTX.

A recuperação da motilidade progressiva, de espermatozoides rápidos bem como da integridade de membrana plasmática do D48 ao D60 demonstra que o tempo e temperatura utilizados na indução de estresse calórico escrotal no presente estudo, permitiu a recuperação desses parâmetros espermáticos dentro do período equivalente a uma onda espermática, demonstrando que as células-tronco germinativas possuem certa resistência ao insulto térmico. Esta característica confere ao epitélio seminífero a capacidade de se recuperar durante as próximas ondas espermáticas, como já mencionado por diversos autores [5,10].

Apesar disso, a maioria dos defeitos espermáticos não se recuperou dentro do mesmo período em nosso estudo. De forma similar em touros [63,64], os defeitos espermáticos surgiram na primeira semana e persistiram até os 60 dias após o estresse térmico. Já estudos realizados em equinos [7,66] observaram que este parâmetro retornou a normalidade até os 50 dias após o insulto térmico. Essas diferenças podem estar ligadas à resistência ao estresse térmico escrotal entre as espécies, à resposta individual intra-espécie e ao método de estresse térmico escrotal utilizado.

O estresse térmico escrotal não alterou a produção de volume seminal livre de gel e o tratamento com a pentoxifilina tampouco teve efeito sobre esse parâmetro, uma vez que os três grupos avaliados não diferiram ao longo da avaliação. Este resultado corrobora com Freidman et al. [7] que também não observaram modificações no volume seminal livre de gel após insulto térmico escrotal em equinos. No entanto, em desacordo com nossos resultados, Oliva et al. [40] e Schill [38] ao estudarem o efeito do tratamento oral com pentoxifilina, durante três meses em homens inférteis, observaram aumento do volume seminal ao término do tratamento. Esse resultado sugere que o uso prolongado da pentoxifilina talvez possa levar a um incremento deste parâmetro.

O volume seminal é diretamente influenciado pelas concentrações circulantes de testosterona, já que esse hormônio é responsável em estimular as glândulas sexuais acessórias a produzirem plasma seminal [91]. Porém, as concentrações deste hormônio esteroide geralmente não são alteradas após insulto térmico testicular, uma vez que as células somáticas, como as de Leydig, são mais resistentes ao estresse por calor, sendo afetadas apenas em casos severos de degeneração testicular [92,93].

## **Conclusões**

Os achados do presente estudo demonstraram que o estresse térmico escrotal promoveu a redução da concentração, integridade de membrana plasmática e cinética dos espermatozoides. Além disso, levou a um incremento do índice de peroxidação lipídica, ativação de vias de apoptose e de defeitos espermáticos.

Em nosso estudo, o aparecimento cronológico de defeitos espermáticos no sêmen, após insulação escrotal, se deu da seguinte forma: defeitos de cauda (D1-D60), presença de gotas citoplasmáticas (D1-D36), defeitos de cabeça (D18-D60), defeitos de peça intermediária (D18-D60), presença de células germinativas (D18-D60) e presença de formas teratológicas (D24-D60). Essas diferenças refletem as alterações causadas pelo calor nos diferentes estágios de desenvolvimento das células germinativas no momento do insulto térmico. Além disso, nos permite inferir que todas as linhagens espermáticas foram afetadas pelo calor, incluindo os espermatozoides contidos no epidídimo no momento do insulto.

O tratamento com 17 mg/kg durante 30 dias apresentou efeito benéfico na motilidade total e na porcentagem de espermatozoides rápidos em determinados momentos do período de avaliação em relação ao grupo insulado que não recebeu tratamento. A pentoxifilina minimizou a peroxidação lipídica preveniu a ativação de mecanismos de apoptose. Além disso, o grupo PTX alcançou valores similares ao grupo CT de forma mais precoce do que o grupo sem tratamento, quanto a cinética espermática e integridade de membrana plasmática.

Apesar de não prevenir o aparecimento de defeitos espermáticos no sêmen, alguns desses parâmetros foram menores no grupo que recebeu o tratamento com o fármaco. No entanto, após a suspensão do tratamento no D30, observou-se incremento de defeitos espermáticos na peça intermediária e formas teratológicas no grupo PTX, sugerindo que a manutenção do tratamento por período prolongado poderia ser benéfica em manter uma qualidade superior do sêmen.

## Agradecimentos

A FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa e Ensino do Estado de São Paulo) é reconhecida por apoiar financeiramente o desenvolvimento deste estudo (Processo Fapesp nº 2014/00535-4).

## Referências

- [1] Roser, J.F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science*, v. 107, p.179-196, 2008.
- [2] Lagerlof, N. Infertility in male domestic animals. *Veterinary Medicine*, v. 33, p. 550-61, 1938.
- [3] Amann, R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal of Andrology*, v. 2, p. 37-58, 1981.
- [4] Setchell, B.P. The Parkes lecture Heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 114, p. 179-94, 1998.
- [5] Johnson, L.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D.; Scrutchfield, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*, v. 48, p. 1199-216, 1997.
- [6] Wang, C.; McDonald, V.; Leung, A.; Superlano, L.; Berman, N.; Hull, L.; Swerdloff, R.S. Effect of increased scrotal temperature on sperm production in normal men. *Fertility and Sterility*, v. 68, p. 334-39, 1997.
- [7] Freidman, R.; Scott, M.; Heath, S.E.; Hughes, J.P.; Daels, P.F.; Trinh, T.Q. The effects of increase testicular temperature on spermatogenesis in the stallion. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl.)*, v. 4, p. 127-34, 1991.
- [8] Marmar, J.L. Varicocele and male infertility. Part II. The pathophysiology of varicocele in the light of current molecular and genetic information. *Human Reproduction Update*. v.7, p. 46-72, 2001.
- [9] Thompson, J.A.; Love, C.C.; Stich, K.L.; Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D. A Bayesian approach to prediction of stallion daily sperm output. *Theriogenology*, v. 62, p. 1607–17, 2004.
- [10] Turner, R.M. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 6, p. 278-284, 2007.
- [11] Pickett, B. W., Voss, J. L., Bowen, R. A., Squires, E. L., & McKinnon, A. O. (1988). Seminal characteristics and total scrotal width (TSW) of normal and abnormal stallions. In *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*.
- [12] Shaha,C.; Tripathi, R.; Mishra, D.P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, v. 27; n. 365, p. 1501–1515, 2010.
- [13] Takahashi, M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2012.
- [14] Free, M. J., Schluntz, G. A., & Jaffe, R. A. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biology of Reproduction*, v. 14, n. 4, 481-8, 1976.
- [15] Peltola, V.; Huhtaniemi, I.; Ahotupa, M. Abdominal position of the rat testis is



associated with high level of lipid peroxidation. *Biology of Reproduction*, v.53, p.1146-50, 1995.

[16] Pérez-Crespo, M.; Pintado, B.; Gutiérrez-Adán, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, n. 1, 40-7, 2008.

[17] Paul, C.; Teng, S.; Saunders, P.T. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biology of Reproduction*, v. 80, p. 913-19, 2009.

[18] Reyes, J.G.; Farias, J.G.; Henríquez-Olavarrieta, S.; Madrid, E.; Parraga, M.; Zepeda, A.B.; Moreno, R.D. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p.1-15, 2012.

[19] Mancine, R.E.; Penhos, J.C.; Izquierdo, I.A.; Heinrich, J.J. Effects of acute hypoglycemia on rat testis. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, p. 104, n. 4, 699-702, 1960.

[20] Ewing, L.L.; VanDemark, N.L. Metabolic activity of rabbit testicular tissue after various periods in abdomen. *Journal of Dairy Science*, v. 44, n. 6, p. 1111-88, 1961.

[21] Davis, J. R.; Morris, R. N. Effect of glucose on incorporation of L-lysine-UC 14 into testicular proteins. *American Journal of Physiology Legacy Content*, v. 205, n. 5, p. 833-6, 1963.

[22] VanDemark, N.L.; Ewing, L.L. Factors affecting testicular metabolism and function. *Journal of reproduction and fertility*, v. 6, n. 1, p. 1-8, 1963.

[23] Means, A.R.; Hall, P.F. Protein biosynthesis in the testis: I. Comparison between stimulation by FSH and glucose. *Endocrinology*, v. 82, n. 3, p. 597-602, 1968.

[24] Ahotupa, M.; Huhtaniemi, I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biology of Reproduction*, v. 46, n. 6, p.1114-18, .

[25] Aitken, R.J.; Roman, S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 1, n. 1, p. 15-24, 2008.

[26] Semercioz, A.; Onur, R.; Ogras, S. Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuro Endocrinology Letter*, v. 24, p.86-90, 2003.

[27] Hamilton, T.R.D.S.; Mendes, C.M.; Castro, L.S.D.; Assis, P.M.D.; Siqueira, A.F.P.; Delgado, J.D.C.; Goissis, M.D.; Muino-Blanco, T.; Nichi, M.; Visintin, J.A.; Assumpção, M.O.A. Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-12, 2016.

[28] Yao, C.; Li, G.; Qian, Y.; Cai, M.; Yin, H.; Xiao, L.; Tang, W.; Guo, F.; Shi, B. Protection of pentoxifylline against testis injury induced by intermittent hypobaric hypoxia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-9, 2016.

[29] Banks, S.; King, S.A.; Irvine, D.S.; Saunders, P.T. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*. v. 129, p.505-514, 2005.

[30] Kim, B.; Park, K.; Rhee, K. Heat stress response of male germ cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 70, p. 2623-36, 2013.

- [31] Yin, Y.; Hawkins, K.L.; Dewolf, W.C.; Morgentaler, A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *Journal of Andrology*, v. 18, n. 2, p. 159-165, 1997.
- [32] Yin, Y.; DeWolf, W.C.; Morgentaler, A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 492-6, 1998.
- [33] Rucker, E.B.; Dierisseau, P.; Wagner, K.U.; Garrett, L.; Wynshaw-Boris, A.; Flaws, J. A.; Hennighausen, L. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular Endocrinology*, v. 14, p. 1038-52, 2000.
- [34] Rockett, J.C.; Mapp, F.L.; Garges, J.B.; Luft, J.C.; Mori, C.; Dix, D.J. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 229-39, 2001.
- [35] Lue, Y.H.; Lasley, B.L.; Laughlin, L.S.; Swerdloff, R.S.; Hikim, A.P.S.; Leung, A.; Wang, C. Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Andrology*, v. 23, n. 6, p. 799-805, 2002.
- [36] Vera, Y.; Diaz-Romero, M.; Rodriguez, S.; Lue, Y.; Wang, C.; Swerdloff, R.S. Mitochondria-dependent pathway is involved in heat-induced male germ cell death: lessons from mutant mice. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 1534-40, 2004.
- [37] Vera, Y.; Rodriguez, S.; Castanares, M.; Lue, Y.; Atienza, V.; Wang, C.; Swerdloff, R.S.; Sinha Hikim, A.P. Functional role of caspases in heat-induced testicular germ cell apoptosis. *Biology of Reproduction*, v. 72, p. 516-22, 2005.
- [38] Schill, W.B. Therapy of idiopathic astheno- and oligozoospermia with pentoxifylline. *Fortschr Medicine*. v. 100, p. 696 –700, 1982.
- [39] Moein, M.R.; Khalili, M.A.; Davoudi, A. The effect of oral administration of pentoxifylline on sperm motility of asthenozoospermic ejaculates from men with or without testicular varicocele. *Journal of Reproduction Medicine*, v. 3, p. 25–9, 2005.
- [40] Oliva, A.; Dotta, A.; Multigner, L. Pentoxifylline and antioxidants improve sperm quality in male patients with varicocele. *Fertility and Sterility*, v. 91, Suppl. 4, p.1536–9, 2009.
- [41] Queiroz, G.C.D.; Oliveir, V.V.G.; Gueiros, O.G.; Torres, S.M.; Maia, F.C.L.; Tenorio, B.M.; Silva, J.V.A. Effect of pentoxifylline on the regeneration of rat testicular germ cells after heat shock. *Animal Reproduction*, v. 10, n. 1, p. 45-54, 2013.
- [42] Ward, A.; Clissold, S.P. Pentoxifylline. *Drugs*. v. 34, n.1, p 50-97, 1987.
- [43] Collingridge, D.R.; Rockell, S. Pentoxifylline improves the oxygenation and radiation response of BA1112 rat rhabdomyosarcomas and EMT6 mouse mammary carcinomas. *International Journal of Cancer*, v. 20, n. 90, p. 256-64, 2000.
- [44] Meru, V.A.; Mitra, S.; Thyagarajan, B.; Chugh, A. Intermittent claudication: An overview. *Atherosclerosis*, v. 187, n. 2, p. 221-37, 2006.
- [45] Tesarik, J.; Thebault, A.; Testart, J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Human Reproduction*, v.7, p.1257–63, 1992.
- [46] Rieneck, K.; Diamant, M.; Haahr, P. M.; Schönharting, M.; Bendtzen, K. In vitro immunomodulatory effects of pentoxifylline. *Immunology Letters*, v. 37, n. 2, p. 131-8, 1993.

- [47] Neuner, P.; Kosner, G.; Shauer, E. Pentoxifylline in vivo down regulates the release of IL1 $\beta$ , IL6, and Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$  by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*, v. 83, p. 262–67, 1994.
- [48] Delaninan, S.; Porcher, R.J.; Lefaix, J.L. Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 34, p. 8570-79, 2005.
- [49] Deree, J.; Martins, J.O.; Melbostad, H.; Loomis, W.H.; Coimbra, R. Insights into the regulation of TNF- $\alpha$  production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics*, v. 63, n. 3, p. 321-28, 2008.
- [50] Piryaeei, A.; Najar, A.; Bayat, M. Effects of pentoxifylline administration on histomorphological parameters of streptozotocin-induced diabetic rat testes. *Laboratory Animal Research*, v. 31, n. 3, p. 111-16, 2015.
- [51] Takhtfooladi, M.A.; Moayer, F.; Takhtfooladi, H.A. Beneficial effect of pentoxifylline into the testis of rats in an experimental model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. *International Brazilian Journal of Urology*, v. 41, n. 3, p. 576-83, 2015.
- [52] Nouri, M.; Movassaghi, S. Protective effect of pentoxifylline on male Wistar rat testicular germ cell apoptosis induced by 3, 4-methylenedioxymethamphetamine. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v.19, n. 6, 646-52, 2016.
- [53] Pozor, M.; Muehlhaus, J.; King, A.; Macpherson, M.L.; Troedsson, M.H.; Bailey, C.S. Effect of pentoxifylline treatment on testicular perfusion and semen quality in Miniature horse stallions. *Theriogenology*, v. 76, p. 1027-35, 2011.
- [54] Gradil, C.M.; Ball, B.A. The effects of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.1041-47, 2000.
- [55] Marques, A.; Arruda, R.P.; Celeghini, E.C.C.; Gobesso, A.A.O.; Neves-Neto, J.R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology*, v.58, p.257-60, 2002.
- [56] Goulart, H.M.; Silva, A.E.D.F.; McManus, C.; Papa, F.O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 50°C. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, p.112-22, 2004.
- [57] Yovich, J.L. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Human Reproduction*, v.8, p.1786-91, 1993.
- [58] Calogero, A.E. Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Human Reproduction*, v.13, p. 911-15, 1998.
- [59] Paccamonti, D. L., Buiten, A. V., Parlevliet, J. M., & Colenbrander, B. Reproductive parameters of miniature stallions. *Theriogenology*, v. 51, p. 7, p. 1343-9, 1999.
- [60] Harrison, R. A. P., & Vickers, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, n. 1, p. 343-52, 1990.
- [61] Parrish, J.J.; Susko-Parrish, J.; Winer, M.A.; First, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, v. 38, p. 1171-180, 1988.
- [62] Guasti, P.N.; Freitas-Dell'Aqua, C.P.; Maziero, R.R.D.; Hartwig, F.P.; Monteiro, G.A.; Lisboa, F.P.; Papa, F.O. Validation of flow cytometry for assessment of membrane

lipid peroxidation of equine spermatozoa. IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction, p. 17-20, 2012.

[63] Casady, R.B.; Myers, R.M.; Legates, J.E. The Effect of Exposure to High Ambient Temperature on Spermatogenesis in the Dairy Bull. *Journal of Dairy Science*, v. 36, n. 1, p. 14-23, 1953.

[64] Skinner, J. D., & Louw, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Journal of applied physiology*, v. 21, n. 6, p. 1784-90, 1966.

[65] Vogler, C.J.; Saacke, R.G.; Bame, J.H.; Dejarnette, J.M.; McGilliard, M.L. Effects of Scrotal Insulation on Viability Characteristics of Cryopreserved Bovine Semen. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 11, p. 3827-35, 1991.

[66] Blanchard, T.L.; Jorgensen, J.B.; Varner, D.D.; Forrest, D.W.; Evans, J.W. Clinical observations on changes in concentrations of hormones in plasma of two stallions with thermally-induced testicular degeneration. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.16, n. 5, p. 195-201, 1996.

[67] Barth, A.D. Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility. *Canadian Veterinary Journal*, v. 30, p. 656-62, 1989.

[68] Rao, A.R.; Bane, A.; Gustafsson, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, v. 14, p.1-12, 1980.

[69] Blom, E. Sperm morphology with reference to bull infertility. In: *Proceedings of the First All-India Symposium on Animal Reproduction*, Ludhiana. p. 61-81, 1977.

[70] Amann, R.P.; Seidel, G.E.; Mortimer, R.G. Fertilizing potential in vitro of sêmen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, v. 54, p.1499-515, 2000.

[71] Joseph, A.; Shur, B.D.; Ko, C.M.; Chambon. P.; Hess, R.A. Epididymal hypo-osmolality induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor alpha knockout mouse. *Biology of Reproduction*, v. 82, p. 958-67, 2010.

[72] Hong, C.Y.; Chiang, B.N.; Turner, P. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet*, v. 2, p.1449-51. 1984.

[73] Skandhan, K.P. Review on copper in male reproduction and contraception. *Revue française de gynécologie et d'obstétrique [Review]*, v.87, p.594-8, 1992.

[74] Love, C.C.; Garcia, M.C.; Riera, F.R.; Kenney, R.M. Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, v. 44, p. 99-105, 1991.

[75] Love, C.C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, v. 76, n. 3, p. 547-557, 2011.

[76] Yaeram, J.; Setchell, B.P.; Maddocks, S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, v. 18, p. 647-53, 2006.

[77] Perez-Crespo, M.; Pintado, B.; Gutierrez-Adan, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol. Reprod. Development*, v. 75, 40-7, 2008.

[78] Liu, Y.; Li, X. Molecular basis of cryptorchidism-induced infertility. *Science China Life Sciences*, v. 53, p. 1274-83, 2010.

- [79] Love, C.C.; Kenney, R.M. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 615-20, 1999.
- [80] Chenoweth, P. J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, v. 64, n. 3, p. 457-68, 2005.
- [81] Fernandes, C.E.; Dode, M.A.N.; Pereira, D.; Silva, A.E.D.F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, v. 70, n. 9, p. 1560-8, 2008.
- [82] Watson, E.D.; Clarke, C.J.; Else, R.W.; Dixon, P.M. Testicular degeneration in 3 stallions. *Equine Veterinary Journal*, v. 26, p. 507-10, 1994.
- [83] Blanchard, T.L.; Johnson, L. Increased germ cell degeneration and reduced germ cell:Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. *Theriogenology*, v. 47, p. 665-77, 1997.
- [84] Blanchard, T.L.; Johnson, L.; Varner, D.D.; Rigby, S.; Brinsko, S.; Love, C.C. Low daily sperm output per ml of testis as a diagnostic criteria for testicular degeneration in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 21, p. 11-35, 2001.
- [85] Kopp, C.; Sukura, A.; Tuunainen, E.; Gustavsson, I.; Parvinen, M.; Andersson, M. Multinuclear-multiflagellar sperm defect in a bull – A new sterilizing sperm defect. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p.208-13, 2007.
- [86] Gavella, M.; Lipovac, V.; Marotti, T. Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm. *International journal of andrology*, 14(5), 320-7, 1991.
- [87] Johnson, L. Spermatogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*. Edited by Cupps P. New York: Academic Press, p. 173-219, 1990.
- [88] Lue, Y.H.; Hikim, A.P.; Swerdloff, R.S.; Im, P.; Taing, K.S.; Bui, T.; Leung, A.; Wang, C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intra-testicular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 140, 1709-17, 1999.
- [89] Carlsen, E.; Andersson, A.M.; Petersen, J.H.; Skakkebaek, N.E. History of febrile illness and variation in semen quality. *Human Reproduction*, v. 18, p. 2089-92, 2003.
- [90] Shiraishi, K.; Matsuyama, H.; Takihara, H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Introduction Journal of Urology*, v. 19, p. 538-50, 2012.
- [91] Berndtson, W.E.; Squires, E.L; Thompson Jr, D.L. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. *Theriogenology*, v. 20, p. 449-57, 1983.
- [92] Coryn, M.; De Morr, A.; Bouters, R.; Vandeplassche, M. Clinical, morphological and endocrinological aspects of cryptorchidism in the horse. *Theriogenology*, v. 16, n. 4, p. 489-96, 1981.
- [93] Arighi, M.; Bosu, W.T.K.; Raeside, J.I. Hormonal diagnosis of equine cryptorchidism and histology of the retained testes In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*, v. 31, p.591-602, 1986.

*“Corte sua própria lenha. Assim, ela aquecerá você duas vezes.”*

*Henry Ford*

O artigo a seguir foi redigido de acordo com as normas do periódico científico **Equine Veterinary Journal**:

<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1001/%28ISSN%292042-3306/homepage/ForAuthors.html>

### **Influência do estresse térmico escrotal sobre a morfometria, histologia e expressão gênica testicular em garanhões tratados com pentoxifilina**

#### **Resumo**

O presente estudo propõe avaliar o efeito do tratamento oral com pentoxifilina sobre a morfometria, histologia e expressão gênica testicular de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal. Além disso, objetiva testar a eficiência de novo método de estresse térmico escrotal na espécie equina. Para isso 14 garanhões foram divididos em três grupo: Controle (CT, n=4), Degenerado (DG, n=5) e Degenerado Tratado (PTX, n=5). O aquecimento escrotal foi promovido duas vezes ao dia, durante dois dias, utilizando uma bolsa térmica acoplada a uma fonte de ar aquecido a 50° C. Um dia após o insulto, o tratamento com 17 mg/kg pentoxifilina oral, a cada 12 h, foi iniciado e conduzido por 30 dias. No dia 30 e 60 biópsias testiculares foram realizadas e as amostras destinadas a histopatologia e RT-qPCR. Os genes apoptóticos avaliados foram *Bax*, *Casp8* e *9*, *Fas*, *Hsf1* e *Ptgs2*. As medidas testiculares de comprimento, altura e largura foram mensuradas utilizando paquímetro, e o volume testicular relativo foi calculado, uma vez por semana do D-5 ao D60. O método utilizado foi eficiente em induzir degeneração testicular em garanhões. A pentoxifilina minimizou os danos histológicos no D60 pós-insulto térmico, como uma menor presença de ondulação da lâmina basal — refletindo uma menor atrofia dos túbulos seminíferos — no entanto, o fármaco não foi eficiente em prevenir o aparecimento de lesões, como o edema intersticial, vacuolização de células germinativas, ausência de espermatozoides e aumento da luz dos túbulos seminíferos. Este efeito pode ser atribuído à inibição da apoptose em células germinativas aos 30 e 60 dias pós-insulto térmico e a ativação de mecanismo de proteção celular em resposta ao choque térmico, promovidos pelo fármaco. Mais estudos, quanto a dose e tempo de uso da pentoxifilina, são necessários para se alcançar melhores respostas no tratamento da degeneração testicular em equinos.

Palavras-chave: equinos, degeneração testicular, histologia, parênquima testicular, apoptose.

## Introdução

A degeneração testicular pode ser definida como o processo patológico que provoca deterioração e perda da arquitetura histológica do parênquima testicular, resultando em produção anormal de espermatozoides, com consequente perda da função da gônada masculina [1].

Diversos fatores etiológicos podem resultar em degeneração testicular, devido ao fato do epitélio seminífero ser extremamente sensível a adversidades externas e internas [2,3]. Entretanto, dentre todas as causas conhecidas, situações que conduzem o testículo a perda da homeostase térmica, como eventos de febre, aumento local da temperatura — devido a condições ambientais ou patológicas — como infecções, trauma, hidrocele, dermatite da pele escrotal, neoplasias e torção testicular são mais frequentes [4,5]. Nessas situações, o animal perde a capacidade de manter o escroto dentro dos limites ideais de temperatura, mesmo que os processos de termorregulação permaneçam ocorrendo, acarretando prejuízos à gonada masculina [6,7].

Todos os tecidos são susceptíveis a danos causados pelo calor, no entanto, os testículos são incomuns, pois são danificados pela exposição às temperaturas normalmente encontradas no abdômen [3]. O fato de se localizarem dentro do escroto, fora da cavidade abdominal, em condições fisiológicas, se deve justamente à necessidade de funcionar a uma menor temperatura do que os demais órgãos corporais [8,9].

Algumas técnicas já foram descritas para estudar os efeitos do calor sobre a gônada masculina em diversas espécies, como por aquecimento integral do corpo [10-14]; por aquecimento local dos testículos, mediante insulação escrotal [4,15-17], imersão do escroto em banho-maria [18-20] e criptorquidia [21-23] ou varicocele induzidas [24,25]; ou, ainda, por aquecimento de tecidos ou preparações celulares *in vitro* [26-28].

Trabalhos onde se induziu estresse térmico escrotal em bovinos [29-34]; Ovinos [35-38]; Caprinos [39-41]; Equinos [4,15,42-44]; Ratos [45-48] e Primatas [49-51], demonstraram que poucas horas aquecimento foram suficientes para causar alterações da termorregulação e comprometer a espermatogênese, levando à degeneração testicular.

Inúmeros efeitos do estresse térmico sobre o testículo foram descritos, como as alterações do peso [52-54], da histologia [52,55,56], da endocrinologia [4,42,44], da bioquímica [57-61], da qualidade seminal [32,34,42,43] e de embriões gerados [62-65].

A pentoxifilina tem sido utilizado no tratamento de ratos e homens com alterações testiculares, melhorando a qualidade espermática e fertilidade desses pacientes [66-70]. Além disso, a administração oral de PTX minimizou as alterações histológicas no



testículo de ratos após indução de hipóxia intermitente [69] e hipertermia local [70], resultando em menor desorganização e esfoliação de células do epitélio seminífero e preservação de estágios do ciclo do epitélio seminífero.

Apesar da importância da degeneração testicular para a fertilidade equina, poucos estudos têm se focado em avaliar os efeitos do estresse térmico sobre as características morfo-histológicas do testículo nesta espécie. Ademais, escassos estudos avaliaram os efeitos da pentoxifilina sobre estes parâmetros em garanhões.

Dessa forma, o presente estudo propõe avaliar o efeito do tratamento oral com pentoxifilina sobre a morfometria, histologia e expressão gênica testicular de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal. Adicionalmente, objetiva testar a eficiência de novo método de estresse térmico escrotal na espécie equina.

## **Material e Métodos**

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Campus de Botucatu, São Paulo, sob protocolo CEUA71/2014.

### **Animais e Local da Pesquisa**

Foram selecionados 14 garanhões com idade entre 4-8 anos da raça Minihorse (mediana de 5 anos). A primeira fase deste experimento foi realizada no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal (FMVZ) — UNESP — Botucatu, São Paulo (SP) e a segunda fase foi realizada no Laboratório de Reprodução Gluck Equine Research Center da Universidade de Kentucky.

Os animais foram selecionados por exame andrológico por meio de mensuração (comprimento altura e espessura), consistência e aparência ultrassonográfica normal dos parâmetros testiculares e espermáticos.

Os 14 garanhões foram divididos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle (CT, n = 4), garanhões em maturidade sexual que não foram expostos ao estresse térmico escrotal; Grupo Degenerado (DG, n=5), garanhões em maturidade sexual, submetidos a degeneração testicular por estresse térmico escrotal, e que não receberam tratamento; Grupo Degenerado Tratado (PTX, n=5), garanhões em maturidade sexual, submetidos a degeneração testicular por insulto térmico escrotal, tratados com pentoxifilina.

### **Indução da Degeneração Testicular**

A degeneração testicular foi induzida nos grupos DG e PTX mediante insulação da região escrotal. Para isso, uma bolsa térmica acoplada a uma fonte de ar aquecido a 50° C, foi utilizada (Figura 1).

A bolsa térmica foi ajustada à região inguinal, de forma a abranger e isolar todo o escroto e cordão espermático. Após posicionado o aparato foi mantido suspenso por três faixas unidas na linha média dorsal da garupa (uma passando através dos membros posteriores e períneo, e as outras duas pela região do flanco).

O aquecimento foi realizado nos 10 animais durante uma hora no início da manhã e uma hora no final da tarde durante dois dias consecutivos. A temperatura interna da bolsa variou entre 45-50° C, mensurada por um termômetro digital com sonda (Intercom Comércio de Produtos Químicos, São Paulo, SP/Brasil).

No dia seguinte ao término do aquecimento escrotal (D1), iniciou-se as coletas de dados de todos os três grupos experimentais e o tratamento dos animais do grupo PTX.

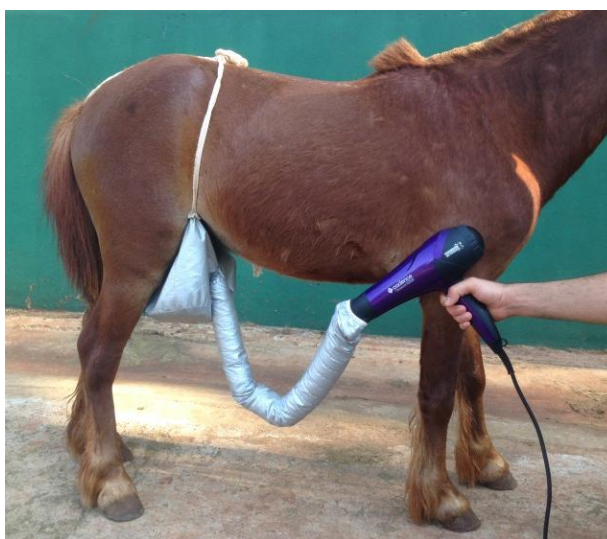


Figura 1. Método utilizado no estudo para induzir estresse térmico escrotal.

### **Tratamento com Pentoxifilina**

O grupo PTX recebeu 17,0 mg / kg de pentoxifilina (Perrigo API Privat Ltd., Maharashtra, Índia) de forma oral duas vezes ao dia durante 30 dias, a partir do primeiro dia após o término do insulto térmico escrotal (D1). A dose e o método de administração foram realizados como descrito por Pozor et al. [71].

### **Morfometria Testicular**

Uma vez por semana a mensuração do comprimento, altura e largura, dos testículos direito e esquerdo, foi realizada no três grupos experimentais utilizando paquímetro testicular, conforme descrito por Love et al. [72]. Com as medidas obtidas foi realizado o calculo individual do volume testicular de cada testículo  $VT = 0,053 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$  posteriormente e o volume testicular total foi obtido somando o volume individual testicular direito e esquerdo [72]. O volume testicular total foi transformado em porcentagem e os resultados expressos na forma de volume testicular total relativo (%).

### **Biópsia Testicular**

No dia 30 após a indução da DT, os animais foram sedados com cloridrato de detomidina na dose de 0,02 mg/Kg IV (Dormiun V<sup>®</sup>, Agener União Saúde Animal, São Paulo, SP/Brasil) e colocados em decúbito lateral direito. Em seguida foi realizada antisepsia da região escrotal utilizando degermante polivinilpirrolidona iodo e álcool 70% e então a biópsia testicular foi realizada utilizando uma pinça Tru-CUT de calibre 16 gauge, como descrito anteriormente [73]. Foram coletadas três amostras teciduais de diferentes locais do mesmo testículo, que foram designadas para a análise de RT-qPCR.

No dia 60 após o aquecimento escrotal, os garanhões foram castrados e, posteriormente, procedeu-se a biópsia das peças. Para a castração os animais foram sedados com cloridrato de xilazina na dose de 1 mg/Kg IV (Rompun<sup>®</sup>, Bayer HealthCare Saúde Animal, Belford Roxo, RJ/Brasil) e cloridrato de cetamina na dose de 2mg/mL IV (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec, Santana de Parnaíba, SP/Brasil). Os animais foram colocados em decúbito lateral direito e a antisepsia da região escrotal foi realizada como descrito anteriormente e em seguida procedeu-se a anestesia local na região do cordão espermático e na pele do escroto utilizando cloridrato de lidocaína 2% (Lidovet<sup>®</sup>, Bravet, Rio de Janeiro, RJ/Brasil). Posteriormente, três fragmentos teciduais de 2 cm<sup>3</sup> foram coletados dos testículos obtidos (um designado para a análise histopatológica e os demais para a análise de RT-qPCR). A escolha do testículo em cada dia da biópsia foi realizada aleatoriamente.

### **Avaliação Histopatológica**

Os fragmentos teciduais obtidos foram fixados em formol salina a 10% durante 24 horas, seguido de desidratação em etanol diluído em série. Em seguida, os tecidos

foram incorporados em parafina e seccionados a 5  $\mu$ m de espessura e posteriormente corados com hematoxilina-eosina (HE).

As avaliações histológicas das lâminas foram realizadas em parceria com o setor de Patologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Todas as análises foram realizadas por dois avaliadores sem o prévio conhecimento do grupo.

Inicialmente, uma avaliação histológica descritiva das lesões encontradas no parênquima testicular foi realizada (análise qualitativa) em microscopia óptica de luz sob aumento de 40x.

Posteriormente, uma análise semi-quantitativa foi realizada, baseada na classificação das alterações histológicas encontradas por escores, com modificações dos métodos sugeridos anteriormente [74,75]. As alterações histopatológicas encontradas no parênquima testicular foram classificadas de 0-3, conforme a gravidade da lesão (0-ausente, 1-leve, 2-moderada, 3-severa). Quando a lesão apresentou grande disparidade entre os grupos e alta gravidade, o fator de multiplicação 2 foi utilizado, por exemplo para a presença de ondulação na lâmina basal dos túbulos seminíferos e para a perda de células germinativas no epitélio seminífero (ausência de alguma linhagem celular).

Os parâmetros avaliados classificados em escores consistiram em: perda de células germinativas no epitélio seminífero, ausência de espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos, edema intersticial, presença de vacúolos nas células germinativas, aumento da luz dos túbulos seminíferos, dilatação de vasos linfáticos, fibrose, infiltrado inflamatório, ondulação da lâmina basal dos túbulos seminíferos, presenças de células germinativas multinucleadas na luz dos túbulos seminíferos, diminuição da espermição (escassos espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos), presença de necrose e hemorragia.

Por último, uma análise quantitativa foi realizada, mediante avaliação de medidas histológicas dos túbulos seminíferos (Figura 2). Em cada lâmina as medidas de raio, diâmetro e área de 10 diferentes túbulos seminíferos selecionados aleatoriamente (essencialmente cortes transversais tubulares predominantemente circulares) foram realizadas. Para isso, um sistema computadorizado de análise de imagem (Motic Image Plus, Motic Instruments, Richmond, Canadá) foi utilizado.

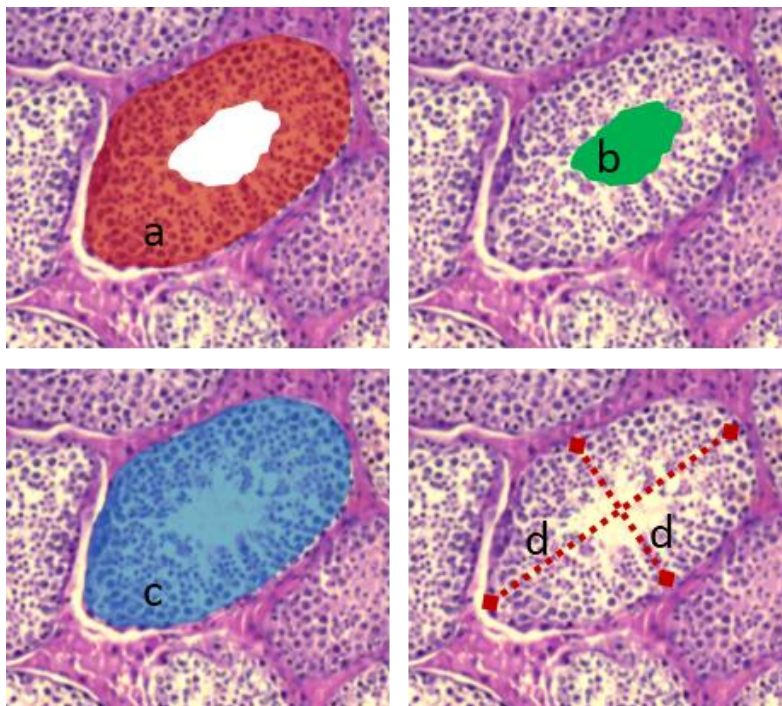


Figura 2. Ilustração das mensurações realizadas nos túbulos seminíferos; a) área do epitélio seminífero (destaque em vermelho) b) área da luz do túbulo seminífero (destaque em verde); c) área total do túbulo seminífero (destaque em azul); d) medidas utilizadas para calcular o diâmetro do túbulo seminífero.

### **Avaliação Quantitativa em Tempo Real da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-qPCR)**

Imediatamente após as coletas, as amostras de biópsias foram mantidas congeladas a  $-180^{\circ}\text{C}$  em RNAlater até o momento da extração do RNA. O RNA celular total foi extraído de amostras de tecido usando o kit Qiagen Rneasy (Qiagen <sup>TM</sup>, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

O RNA (1  $\mu\text{L}$ ) foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop ND1000®) e foram utilizadas amostras com uma razão 260/280 de 1,90 ou superior para a avaliação da qualidade usando um sistema Bioanalyzer. Somente amostras com integridade  $> 8,5$  foram usadas para os próximos passos. A transcrição em cDNA foi realizada utilizando um Reagente de Transcrição Reversa TaqMan (MultiScribe RT - Invitrogen <sup>TM</sup>, Massachusetts, EUA).

Os genes alvos avaliados estão descritos na Tabela 1. Os genes de referência, GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e 18S (18S RNA ribossomal), foram selecionados com base em primers previamente validados para cavalos [76].

A eficiência do PCR foi calculada pelo software LinRegPCR versão 2013.0 (Heart

Failure Research Center, Amsterdam, Netherlands) e variou de 93,8% a 99,3%. Os resultados foram expressos como  $\Delta$ CT.

Tabela 1. Genes alvos investigados na análise de RT-qPCR.

Símbolo	Nome do Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Referência
		5'-3'	3'-5'	
<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	GAGGTGTATCCGCCACAGT	AGCAAACCGCAGGTGCTC	Kohne et al. [77]
<i>Casp8</i>	Caspase 8	CCGATAGGTATAAAATGCA CCAGG	GGAGAATGCAGTCGTTG CCT	*
<i>Casp9</i>	Caspase 9	CACCTTCCCAGGCTTTGTCT	GGGCCCTGAGCAGGAGG	*
<i>Bax</i>	BCL2 associated X, apoptosis regulator	CATGAGCCACCTCAGTTCC C	CGATCCTGGATGAAACC CTGAA	*
<i>Fas</i>	Fas cell surface death receptor	TTACGTGCAAACATGGGAT CA	TCCGGATCCTTCTCTGCA TT	Claes et al. [78]
<i>Hsf1</i>	Heat Shock Transcription Factor 1	CTGGACAATTTGGCTCGCA C	TGGACTCGGCCATGTAG AGA	*

\* Primers desenhados e validados em testes piloto deste estudo.

### Análise Estatística

Os dados gerados foram avaliados pelo software JMP 12.0 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Estatísticas descritivas foram produzidas (medidas de tendência central e dispersão) para caracterizar a amostra do estudo. Os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade usando o teste de adequação de ajuste qui-quadrado (goodness of fit), correlacionando os dados da amostra com um gráfico de probabilidade normal (qq-plot), e aplicando o teste de Barlett / Levene, respectivamente.

Quando os dados não apresentaram distribuição normal, eles foram transformados em escala logarítmica, e novamente foram avaliados quanto a distribuição e a dispersão dos resíduos.

Dados contínuos foram analisados usando um modelo misto considerando grupos e dias como efeitos fixos e ganhão como efeito aleatório. O teste de Tukey foi utilizado para análise post hoc. Para as amostras que não apresentaram distribuição normal, mesmo após log-transformação (ex. escores das lesões histológicas), o teste não paramétrico de Wilcoxon/Kruskal-Wallis foi aplicado.

Os dados foram apresentados como médias não transformadas  $\pm$  erro padrão da média (SEM), a menos que indicado de outra forma. Diferenças significativas foram

consideradas quando  $p < 0,05$ .

## Resultados

O volume testicular total relativo (%) decresceu a partir do D3 nos grupos DG e PTX, e permaneceu inferior até o D60, em ambos os grupos insulados em comparação ao CT ( $p < 0,05$ ). No entanto, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre o DG e PTX ao longo da avaliação (Figura 3).

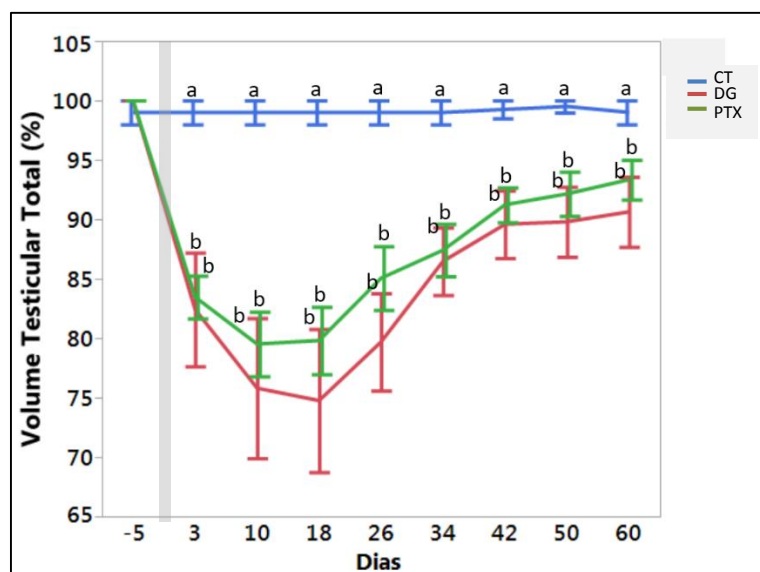


Figura 3. Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) do volume testicular total relativo nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde), avaliados 5 dias antes até 60 dias após (D-5 a D60) o término do insulto térmico escrotal. A faixa cinza indica o momento do aquecimento escrotal (D-1 e D0) e diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes em relação ao dia de avaliação.

As medidas de área do epitélio seminífero (Figura 4A) e de área total (Figura 4B) e diâmetro (Figura 4C) dos túbulos seminíferos, diminuíram ( $p < 0,05$ ) no grupo DG em comparação ao grupo CT, no dia 60 após o aquecimento escrotal. O grupo PTX, entretanto, não diferiu em relação aos demais grupos ( $p > 0,05$ ).

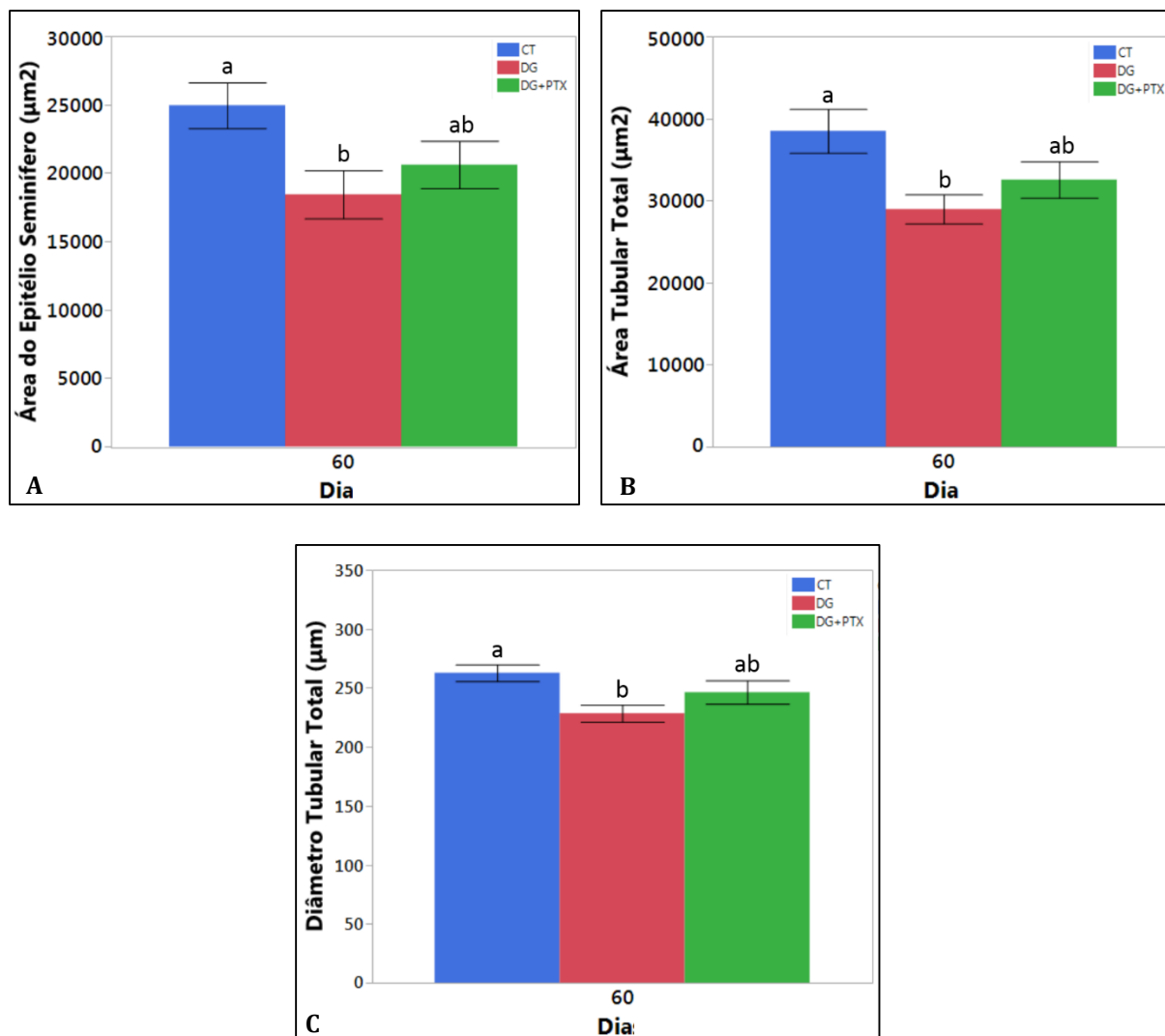


Figura 4. Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) da área do epitélio seminífero (A), área tubular total (B) e diâmetro tubular total (C) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde), avaliados 60 dias após o término insulto térmico escrotal (D60). Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos foram destacadas por letras diferentes.

A classificação em escores das alterações histopatológicas presentes no parênquima testicular dos grupos CT, DG e PTX estão expostas na Tabela 2. A presença de túbulos seminíferos com lamina basais onduladas foi superior no grupo DG em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

A perda de células germinativas no epitélio seminífero e a diminuição da espermição foram maiores ( $p < 0,05$ ) no grupo DG em relação ao grupo CT. O grupo PTX não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os outros grupos em relação a essas características. Este mesmo resultado foi observado para o escore total.



A ausência de espermatozoides no lúmen tubular, a presença de edema intersticial, a presença de vacúolos celulares e o aumento da luz dos túbulos seminíferos foram superiores ( $p < 0,05$ ) nos grupos insulados (DG e PTX) em comparação ao grupo CT.

Os parâmetros que não apresentaram diferenças de escores entre os grupos ( $p > 0,05$ ) foram removidos da tabela, como a dilatação de vasos linfáticos e presenças de células germinativas multinucleadas, fibrose, infiltrado inflamatório, necrose e hemorragia.

Tabela 2. Classificação em escores das lesões histológicas presentes no parênquima testicular dos grupos CT, DG e PTX, avaliadas em microscopia de luz em aumento de 100x. Os parâmetros avaliados foram a perda de células germinativas, redução da espermiacção, ausência de espermatozoide na luz do túbulo seminífero, presença de edema intersticial, presença de vacuolização em células germinativas, aumento do tamanho do lúmen tubular, presença de lâmina basal ondulada e escore total. Os valores estão representados na forma de medianas (intervalo interquartil).

Grupo	Dia	Perda céls. germinativas	Redução da espermiacção	Ausência de esp. na luz	Edema	Vacuolização	Aumento do lúmen	Ondulação da LB	Escore total **
CT	60	2 <sup>a</sup> (2-2)	1 <sup>a</sup> (1-2)	1 <sup>a</sup> (0-1)	0 <sup>a</sup> (0-0)	0 <sup>a</sup> (0-0)	0 <sup>a</sup> (0-0)	0 <sup>a</sup> (0-0)	11 <sup>a</sup> (3-14)
DG	60	4 <sup>b</sup> (4-6)	3 <sup>b</sup> (2-3)	3 <sup>b</sup> (2-3)	1 <sup>b</sup> (0-3)	2 <sup>b</sup> (1-3)	2 <sup>b</sup> (1-3)	4 <sup>c</sup> (2-6)	37 <sup>b</sup> (15-49)
PTX	60	4 <sup>ab</sup> (2-6)	2 <sup>ab</sup> (1-3)	2 <sup>b</sup> (1-3)	1 <sup>b</sup> (1-2)	2 <sup>b</sup> (0-3)	2 <sup>b</sup> (1-3)	2 <sup>b</sup> (0-2)	26 <sup>ab</sup> (17-40)

\* Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

\*\* Para o cálculo do escore total os parâmetros que não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos também foram utilizados, como a dilatação de vasos linfáticos e presenças de células germinativas multinucleadas, fibrose, infiltrado inflamatório, necrose e hemorragia.

Na avaliação histopatológica qualitativa do grupo CT, observou-se em todos os animais, preservação e uniformidade dos túbulos seminíferos, que continham todas as linhagens germinativas. Em algumas áreas ocorreu discreta diminuição da espermiogênese multifocal, com raras espermátides binucleadas e presença de figuras de mitose. Em dois animais, observou-se também discreta diminuição da espermatogênese multifocal, acompanhada de diminuição da espermiogênese. A Figura 5A pertence a um dos animais do grupo CT.

No grupo PTX foi observada, de maneira multifocal, moderada desorganização dos túbulos seminíferos, diminuição moderada a acentuada de espermatídes e diminuição discreta de espermatócitos, caracterizada pela diminuição da espessura do epitélio seminífero, acompanhada de redução da espermiacão, azoospermia e edema intratubular moderados. Em raros túbulos observou discreta quantidade de núcleos picnóticos isolados (necrose individualizada) e discreta regeneração testicular (figuras de mitose). Dois animais desse grupo apresentaram lesões díspares dos demais. Em um deles foi observado edema intersticial moderado multifocal (cerca de 40% do tecido) e discreto infiltrado linfoplasmocitário multifocal. No outro, observou-se fibrose moderada multifocal (cerca de 30% do tecido). Estas alterações histológicas caracterizam uma degeneração moderada multifocal a coalescente. A Figura 5B consiste em uma secção histológica de um testículo do grupo PTX.

No exame histopatológico do grupo DG foi observado acentuada desorganização dos túbulos seminíferos. Além disso, intratubularmente, observou-se adelgaçamento do epitélio seminífero, ondulação da membrana basal, acentuada ausência de espermatídes e moderada ausência de espermatócitos, edema moderado, vacuolização moderada das espermatogônias, regeneração testicular discreta a acentuada (5 a 76 figuras de mitose hiper cromáticas/campo de grande aumento – CGA), moderada quantidade de espermatócitos bi e trinucleados, moderada quantidade de células em picnose e cariorrexe multifocal (individualizadas), caracterizando necrose celular. No lúmen observou-se presença de múltiplas espermatídes e células de Sertoli livres na luz dos túbulos seminíferos e acentuada azoospermia. No interstício foi observado proliferação acentuada dos vasos linfáticos multifocal e moderada fibrose testicular e discreta congestão de vasos sanguíneos. Dois animais apresentaram também fibrose testicular extensa grave, moderado infiltrado linfocitário perivascular, congestão multifocal moderada e hemorragia discreta, acompanhada de hemossiderose moderada. Estas alterações histológicas caracterizam uma degeneração grave multifocal a coalescente. As Figuras 5C e 5D representam secções histológicas do testículo de animais do grupo DG.

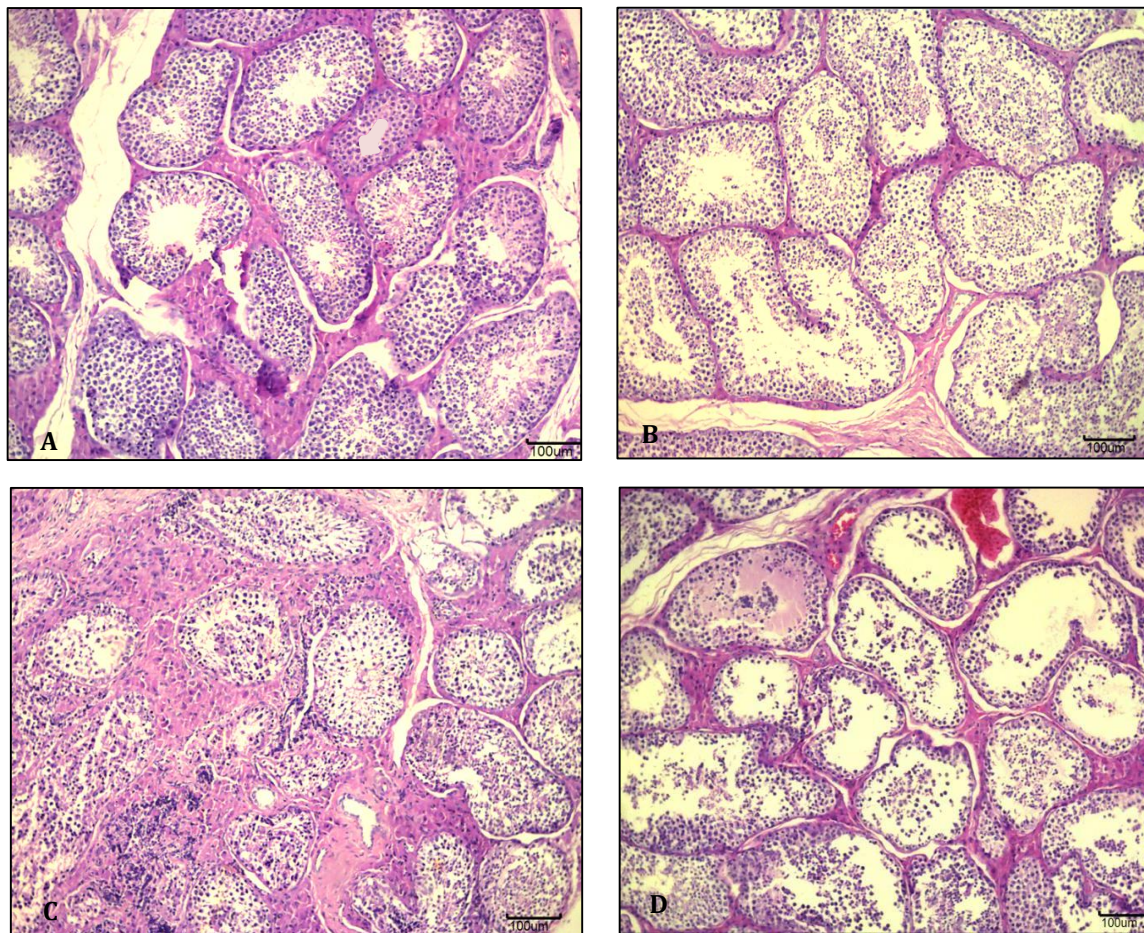


Figura 5. Secções histológicas coradas em HE (Hematoxilina Eosina) analisadas por microscopia óptica de luz, do grupo controle - CT (A), grupo degenerado tratado com pentoxifilina - PTX (B) e grupo degenerado - DG (C e D).

A expressão gênica do marcador apoptótico *Bax* foi maior no grupo DG do que nos grupos CT ( $p < 0,01$ ) e no grupo PTX ( $p < 0,05$ ) no dia 30 (Figura 6A) após o insulto térmico escrotal, mas não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os grupos no dia 60 (Figura 6B).

As caspases 8 (CS8) e 9 (CS9) apresentaram maior expressão gênica no grupo DG em comparação ao grupo CT ( $p < 0,05$ ) no D30 (Figuras 6C e E). O grupo PTX não diferiu em relação aos outros grupos ( $p > 0,05$ ) quanto à expressão desses genes. Diferenças não foram encontradas no D60 entre os três grupos (Figuras 6 D e F), quanto a expressão gênica das caspases 8 e 9 ( $p > 0,05$ ).

A expressão gênica do *Fas* não diferiu entre os grupos no D30 e D60 ( $p > 0,05$ ).

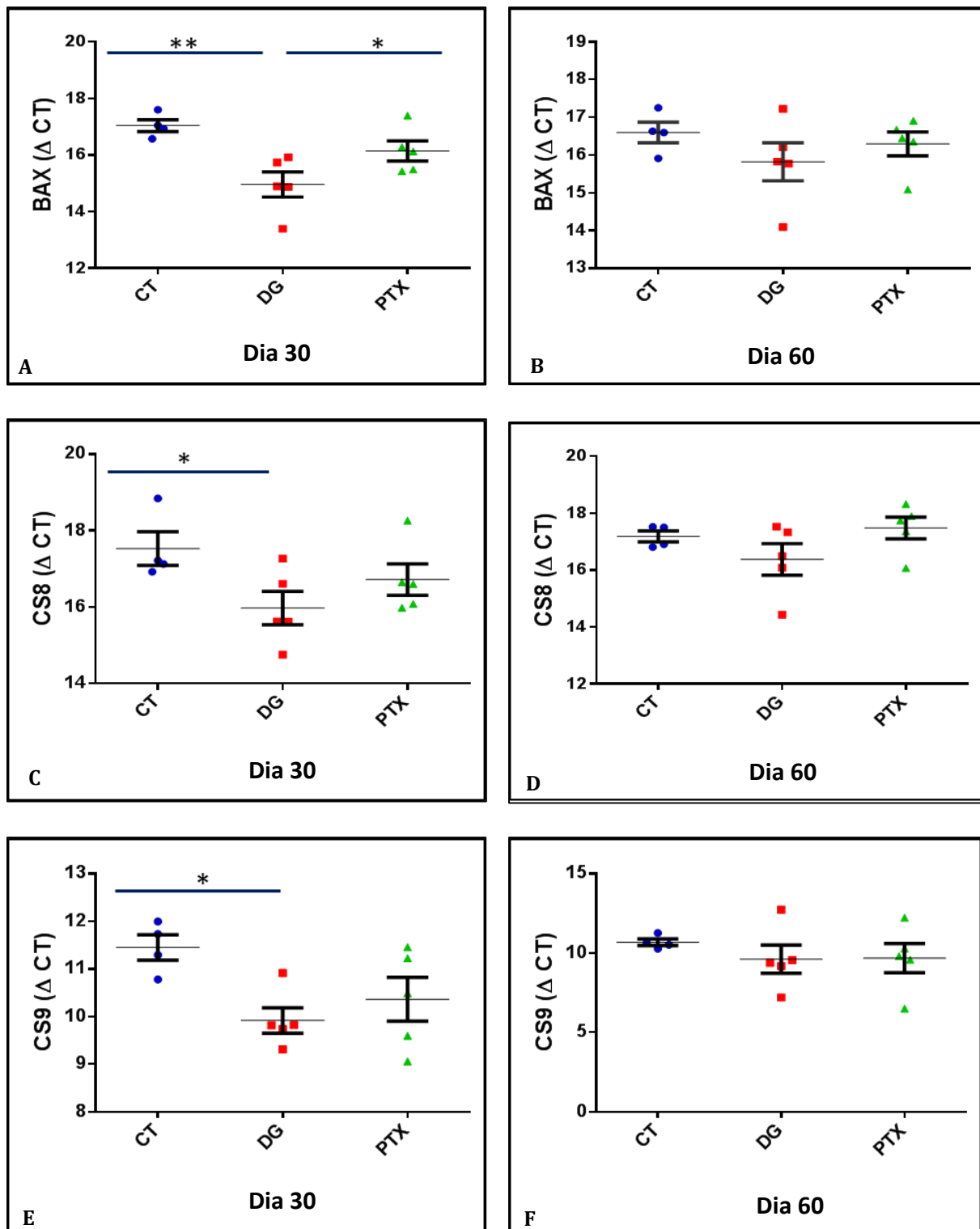


Figura 6. Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) da expressão gênica dos marcadores apoptóticos *Bax* no D30 (A) e D60 (B); Caspase 8 (CS8) no D30 (C) e D60 (D); e Caspase 9 (CS9) no D30 (E) e D60 (F) nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde). \* Indica diferença estatística com  $p < 0,05$  e \*\* com  $p < 0,01$ .

A expressão gênica do marcador de choque térmico *Hsf1* foi superior nos grupos DG e PTX quando comparada ao grupo CT ( $p < 0.05$ ) no dia 30 (Figura 7A), diferindo apenas ( $p < 0,01$ ) entre os grupos DG e PTX no dia 60 (Figura 7B) pós-insulto.

A expressão gênica do marcador inflamatório/oxidativo *Ptgs2* não diferiu ( $p > 0.05$ ) entre os três grupos no dia 30 e 60 após insulto térmico (Figura 7C e D).

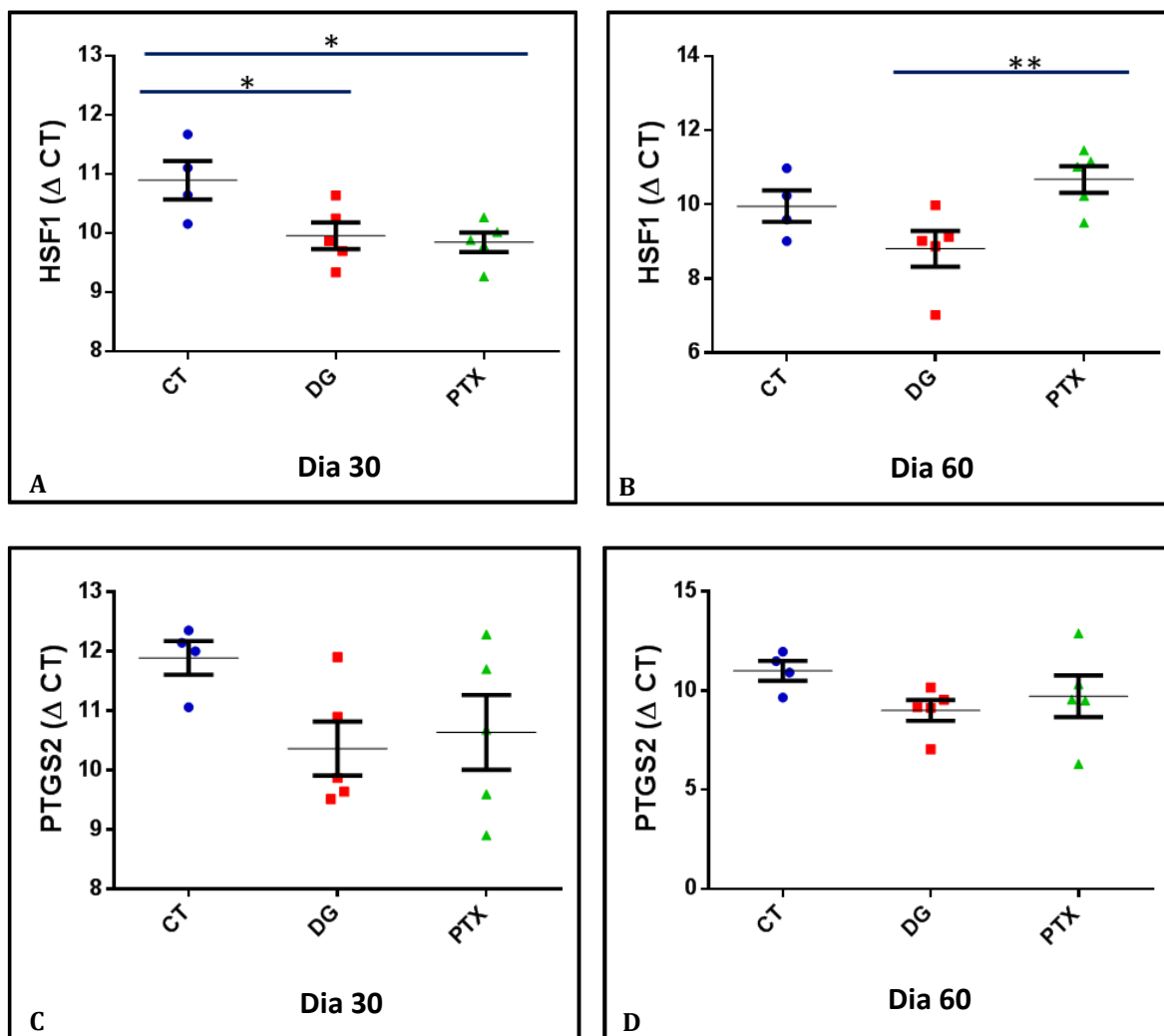


Figura 7. Valores médios  $\pm$  erros padrão (SEM) da expressão gênica do marcador de choque térmico *Hsf1* no D30 (A) e D60 (B) e do do marcador inflamatório/oxidativo *Ptgs2* D30 (C) e D60 (D) após aquecimento escrotal, nos grupos controle (CT, representado em azul), degenerado (DG, representado em vermelho) e degenerado tratado (PTX, representado em verde). \* Indica diferença estatística com  $p < 0,05$  e \*\* com  $p < 0,01$ .

## Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram que o insulto térmico escrotal teve efeitos deletérios no parênquima e funcionamento testicular. Além disso, o tratamento com a pentoxifilina oral promoveu benefícios em minimizar a deterioração de algumas características histológicas e moleculares estudadas.

O método de estresse térmico testicular utilizado foi eficiente em causar degeneração testicular, já que as alterações histológicas observadas nos grupos DG e PTX caracterizam bem o processo degenerativo da gônada masculina. Neste método, a transmissão de calor se deu por convecção do ar aquecido para o escroto. Quando a temperatura do ar em que o animal está submetido excede 40° C, a temperatura escrotal aumenta para valores normalmente encontrados no abdômen [7]. Nessas condições a evaporação do suor da pele escrotal não é eficiente em manter a o escroto mais frio, levando a um aquecimento testicular [3].

Em estudos anteriores, a degeneração testicular foi induzida por insulação térmica em garanhões utilizando um tecido de lã de algodão ao redor do escroto por 24h [42], 36 h [4,44] e 48 h [42,43]. Como resultado, os autores observaram alterações significativas das características seminais e hormonais, no entanto, as características morfo-histológicas não foram acessadas. Em nosso estudo o método de estresse térmico escrotal foi aplicado durante 1 hora no início da manhã e 1 hora no início da tarde durante dois dias consecutivos e também se mostrou eficiente em promover danos testiculares compatíveis com a degeneração testicular. Sendo assim, podemos afirmar que o método de estresse térmico escrotal utilizado em nosso estudo se mostrou uma ferramenta mais prática e rápida na indução de degeneração testicular na espécie equina, comparado aos métodos anteriores.

Assim como estudos realizados em ratos [45-47] induzidos ao estresse térmico escrotal durante 15 a 60 minutos, nossos achados comprovam que poucas horas de aquecimento foram suficientes para causar alterações da termorregulação e comprometer a espermatogênese em equinos.

No D60 ambos os grupos submetidos ao aquecimento escrotal apresentaram, em comum, desorganização de túbulos seminíferos, perda de células germinativas — caracterizada pelo adelgaçamento do epitélio seminífero e aumento da luz do túbulo seminífero — presença de células germinativas com vacúolos citoplasmáticos e picnose nuclear, sinalizando o processo de necrose. Essas alterações são consistentes com os

achados histológicos descritos por outros autores que estudaram o processo degenerativo da gonada masculina [1,55,56,69,79-82]. Esses danos podem ter ocorrido dado ao efeito do calor em incrementar o metabolismo tecidual e demanda por oxigênio e glicose, que sem aumento correspondente do suprimento sanguíneo, resultam em hipóxia [3,83-87], em hipoglicemia [58,59,88-90], em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio [38,69,91-93], em danos moleculares a proteínas e ácidos nucleicos [85,54,94] e em ativação de mecanismos de apoptose [45,47,49,95-98].

A maioria dos estudos afirmam que o parênquima testicular tende a se recuperar completamente em aproximadamente 60 dias após a remoção do insulto testicular, devido a uma maior resistência das espermatogônias-tronco [1,70,99]. No entanto, no presente estudo, os danos no parênquima testicular permaneceram até os 60 dias após a remoção do insulto térmico nos grupos insulados, demonstrando que nesses animais ocorreu danos graves que impediram a recuperação do epitélio seminífero no período equivalente a uma onda espermática. Isso é evidenciado pela presença de vacúolos citoplasmáticos encontrados nas espermatogônias no grupo DG no D60, no entanto, esse achado não foi observado em lâminas do grupo PTX.

Ainda na avaliação histológica, ocorreu perda de células germinativas em ambos os grupos, principalmente de espermatócitos e espermátides. Essas perdas podem ter ocorrido por meio de ativação de mecanismos de apoptose como já demonstrado em ratos [45,85,86,100] e em macacos [49]. Esses estudos observaram que os espermatócitos e espermátides são as linhagens germinativas mais sensíveis ao calor, e foram eliminadas por apoptose, em virtude de danos sofridos no DNA.

Apesar da persistência de danos histológicos, aos 60 dias após o choque térmico, observamos uma regeneração visível da espermatogênese, representada pelas figuras de mitose presentes em alguns animais dos grupos DG e PTX. Esse resultado demonstra que as espermatogônias aumentaram suas atividades de divisão celular como um mecanismo compensatório as perdas de células germinativas. Esse mecanismo também foi observado por Queiroz et al. [70], em ratos submetidos ao estresse térmico escrotal.

Quando a avaliação histológica foi realizada baseada em escores, observamos que a presença de ondulação da lâmina basal ao redor dos túbulos seminíferos foi superior no grupo DG em comparação ao PTX. A ondulação da lâmina basal pode ser atribuída a atrofia dos túbulos seminífero, que ao se retraírem causam o afrouxamento da lâmina basal. A atrofia dos túbulos seminíferos esta relacionada a perda de células germinativas associado a presença de fibrose no interstício, como já demonstrado por Gehlen et al.

[101] em casos severos de degeneração testicular associada a azoospermia em garanhões. Suportando esses resultados, observamos que a área total e o diâmetro dos túbulos seminíferos, bem como a área do epitélio seminífero diminuíram significativamente no grupo DG em comparação ao CT, mas foi semelhante no grupo tratado com a pentoxifilina em relação aos dois grupos.

Embora microscopicamente a diminuição dos túbulos seminíferos tenha ocorrido apenas no grupo DG em comparação ao CT, macroscopicamente o volume testicular total — que consiste em um reflexo do estado dos túbulos seminíferos — apresentou diminuição em ambos os grupos insulados, a partir do D3 até o D60. Isso demonstra que no D60 o grupo PTX pode ter apresentado uma recuperação histológica desse parâmetro que não foi refletida ainda na aparência macroscópica da gonada. Em concordância com os nossos resultados, o declínio do peso e tamanho testicular foi notado em ratos após exposição testicular ao calor [8,54], além disso, o tamanho testicular não voltou ao normal após 60 dias do insulto nesses animais. A pentoxifilina também não preveniu reduções do peso testicular após hipertermia escrotal em ratos [70].

Apesar de terem sido encontradas alterações histológicas em ambos os grupos insulados, o grupo PTX apresentou danos menos graves em comparação ao grupo DG, sendo a degeneração classificada como moderada neste grupo, enquanto o grupo não tratado com o fármaco apresentou degeneração classificada como severa. Esse resultado demonstra o efeito protetor da pentoxifilina às células germinativas contra os efeitos do calor.

Em concordância com esse resultado, Queiroz et al. [70] avaliaram os efeitos da pentoxifilina na regeneração testicular de ratos após estresse térmico testicular e observaram que os animais tratados com 50 mg/kg de pentoxifilina apresentaram lesões histológicas menos graves e alguns estágios do ciclo do epitélio seminífero preservados pós-insulto. Já os animais tratados com 100 mg/kg de pentoxifilina não apresentaram degeneração testicular e todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero estavam presentes aos 60 dias pós-choque térmico. A dose utilizada em nosso estudo foi bem menor do que as doses avaliadas no estudo mencionado, no entanto, foi eficiente em minimizar algumas alterações histológicas, mas não em prevenir o aparecimento das mesmas. Isso reforça a necessidade de mais estudos quanto a dose e tempo de tratamento com a pentoxifilina na degeneração testicular em equinos.

Embora tenham sido demonstrados benefícios no tratamento com a pentoxifilina na histologia testicular pós-insulto térmico, os resultados mais consistentes desse estudo



são evidenciados pela resposta molecular à apoptose e choque térmico após o tratamento com o fármaco.

A hipótese de que ação benéfica da pentoxifilina nas células germinativas ocorre devido à ação anti-apoptótica deste fármaco, como descrito por diversos autores [102-107], é confirmada pela maior expressão gênica do marcador de apoptose *Bax* observada no grupo DG em comparação ao demais grupos no D30, demonstrando que o calor promoveu a ativação da via apoptótica intrínseca nesse grupo e que a pentoxifilina preveniu a ativação desse mecanismo no grupo PTX nesse período. No entanto, no D60 não houve diferenças entre os grupos, demonstrando que nessa fase a resposta apoptótica no grupo DG foi suspensa, indicando uma recuperação testicular nesse momento. Corroborando com esse resultado, diversos autores observaram a ativação de ativação do *Bax* após a indução térmica no testículo de ratos [45,47,96-97] e concluíram que o mecanismo de apoptose em células germinativas masculinas é fortemente dependente da via intrínseca de ativação da *Bax* e inativação da *Bcl*.

Alguns autores [45,47,98] demonstraram que ambas as vias intrínsecas e extrínsecas convergem na cascata de caspases efetoras 3, 6 e 7, que clivam proteínas citoplasmáticas causando modificações celulares responsáveis pela morte das células germinativas. No presente estudo ocorreu maior expressão gênica da caspase 9 no grupo DG em comparação ao CT aos 30 dias após insulto térmico escrotal, demonstrando novamente que a via intrínseca de apoptose foi desencadeada nesse grupo pelo estímulo térmico, e no D60 esse mecanismo é cessado.

Além da via intrínseca de apoptose, os resultados desse estudo demonstram que os danos apoptóticos, em ganhões submetidos ao estresse térmico testicular, também ocorrem pela ativação da via extrínseca de apoptose. Aos 30 dias pós-insulto ocorreu *upregulação* do gene *Casp8* no grupo DG em relação ao CT. No D60 a expressão desse gene foi similar nos três grupos, evidenciando que aos 60 dias pós-insulto há uma resolução natural da resposta a apoptose no parênquima testicular. Liu et al. [108] e Vera et al., [97] também observaram ativação da caspase 8 após insulto térmico escrotal em ratos.

No presente estudo, a resposta ao choque térmico também foi verificada em ambos os grupos submetidos ao choque térmico escrotal no D30, quando o fator transcricional de choque térmico 1 (*Hsf1*) foi *upregulado* nesses grupos em comparação ao CT. No entanto, no D60 a expressão desse gene foi superior no DG em comparação ao PTX.

A ativação do gene *Hsf1* no grupo PTX aos 30 dias pós-insulto parece estar relacionada a mecanismos defensivos celulares, já que em resposta ao calor, o Hsf1 ativa proteínas de choque térmico (HSPs) que se ligam a outras proteínas celulares impedindo danos por desnaturação e incorreto dobramento [47,104]. Essa hipótese é sustentada pelo fato do grupo tratado com a pentoxifilina não ter apresentado *upregulação* de genes envolvidos em vias de apoptose durante esse período, já que em situações onde o calor promove lesões celulares extensas e irreversíveis, o *Hsf1* paradoxalmente deixa de ativar mecanismos protetores e ativa vias de apoptose, de forma intrínseca pela ativação de *Bax*, e extrínseca pela ativação do gene *p53* [45,47,98].

Em contraste a esse resultado, a *upregulação* do gene *Hsf1* no grupo DG aos 30 dias pós-insulto, parece estar relacionado a ativação de mecanismos de apoptose, uma vez que também foi verificado nesse período a ativação de genes envolvidos em vias de apoptose extrínsecas (*Casp8*) e intrínsecas (*Bax* e *Casp9*), sustentando essa hipótese. Embora no D60, o DG não tenha apresentado elevação da expressão gênica de fatores apoptóticos, o *Hsf1* permaneceu elevado nesse grupo em comparação ao grupo tratado com a pentoxifilina. Esse resultado demonstra que a pentoxifilina promoveu uma recuperação tecidual mais precoce no grupo tratado em relação ao DG. Em concordância com nosso estudo Queiroz et al. [70] observou que a pentoxifilina inibiu a apoptose de células germinativas de ratos aos 30 e 60 dias pós-choque térmico.

## **Conclusões**

O método de estresse térmico testicular desenvolvido no presente estudo foi eficiente em promover danos testiculares compatíveis com degeneração testicular, e se mostrou uma ferramenta prática e eficiente para o estudo desta enfermidade na espécie equina, em comparação a métodos anteriores.

A pentoxifilina minimizou os danos histológicos observados aos 60 dias após o insulto térmico, como uma menor presença de ondulação da lâmina basal — refletindo uma menor atrofia dos túbulos seminíferos — no entanto, o fármaco não foi eficiente em prevenir o aparecimento de lesões. Além disso, neste grupo as lesões histológicas foram menos graves, sendo a degeneração classificada como moderada, enquanto o grupo DG as lesões foram mais graves e extensas, sendo o processo classificado como severo.

A pentoxifilina inibiu a apoptose de células germinativas aos 30 e 60 dias pós-insulto térmico e ativou o mecanismo de proteção celular em resposta ao choque térmico.

Mais estudos quanto a dose e tempo de utilização da pentoxifilina são necessários para se alcançar melhor resposta no tratamento da degeneração testicular em equinos com este fármaco.

### **Agradecimentos**

A FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa e Ensino do Estado de São Paulo) é reconhecida por apoiar financeiramente o desenvolvimento deste estudo (Processos Fapesp nº 2014/00535-4 e nº 2016/03442-2).

### **Referências**

- [1] Turner, R. M. O. (2007). Pathogenesis, diagnosis, and management of testicular degeneration in stallions. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), 278-284.
- [2] Amann, R. P. (1981). A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal of Andrology*, 2(1), 37-58.
- [3] Setchell, B. P. (1998). The parkes lecture heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114(2), 179-194.
- [4] Blanchard, T. L., Jorgensen, J. B., Varner, D. D., Forrest, D. W., & Evans, J. W. (1996). Clinical observations on changes in concentrations of hormones in plasma of two stallions with thermally-induced testicular degeneration. *Journal of Equine Veterinary Science*, 16(5), 195-201.
- [5] Ball, B. A. (2008). Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: a review. *Journal of equine veterinary science*, 28(11), 650-665.
- [6] Waites, G. M. H., & Moule, G. R. (1961). Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. *Journal of reproduction and fertility*, 2(3), 213-224.
- [7] Amann, R. P. (1981). A review of anatomy and physiology of the stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1(3), 83-105.
- [8] Setchell, B. P., & Waites, G. M. H. (1972). The effects of local heating of the testis on the flow and composition of rete testis fluid in the rat, with some observations on the effects of age and unilateral castration. *Journal of reproduction and fertility*, 30(2), 225-233.
- [9] Waites, G. M. H., & Setchell, B. P. (1964). Effect of local heating on blood flow and metabolism in the testis of the conscious ram. *Journal of reproduction and fertility*, 8(3), 339-349.
- [10] Ray, D. E., Roubicek, C. B., & Hamidi, M. (1968). Organ and gland weights of rats chronically exposed to 22 degree and 35 degree C. *Growth*, 32(1), 1.
- [11] Magal, E., Kaplanski, J., Sod-Moriah, U. A., Hirschmann, N., & Nir, I. (1981). Role of the pineal gland in male rats chronically exposed to increased temperature. *Journal of neural transmission*, 50(2), 267-273.
- [12] Van Zelst, S. J., Zupp, J. L., Hayman, D. L., & Setchell, B. P. (1995). XY chromosome dissociation in mice and rats exposed to increased testicular or environmental temperatures. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(5), 1117-1121.

- [13] Mawyer, J. D., Cavinder, C. A., Vogelsang, M. M., Sigler, D. H., Love, C. C., Brinsko, S. P., & Gordon, R. K. (2012). Thermoregulation of the testicle in response to exercise and subsequent effects on semen characteristics of stallions. *Journal of animal science*, *90*(8), 2532-2539.
- [14] Ramires-Neto, C., Monteiro, G. A., Delfiol, D. J. Z., Farras, M. C., Dell'aqua, J. A., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2013). The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. *Livestock Science*, *157*(1), 358-363.
- [15] Freidman, R., Scott, M., Heath, S. E., Hughes, J. P., Daels, P. F., & Tran, T. Q. (1990). The effects of increase testicular temperature on spermatogenesis in the stallion. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, *44*, 127-134.
- [16] Lo Walters, A. H., Saacke, R. G., Pearson, R. E., & Gwazdauskas, F. C. (2006). Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. *Theriogenology*, *65*(6), 1016-1028.
- [17] Kastelic, J. P., Cook, R. B., & Coulter, G. H. (1996). Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. *Journal of reproduction and fertility*, *108*(1), 81-85.
- [18] Galil, K. A. A., & Setchell, B. P. (1988). Effects of local heating of the testis on testicular blood flow and testosterone secretion in the rat. *International journal of andrology*, *11*(1), 73-85.
- [19] Setchell, B. P., Ekpe, G., Zupp, J. L., & Surani, M. A. H. (1998). Transient retardation in embryo growth in normal female mice made pregnant by males whose testes had been heated. *Human Reproduction*, *13*(2), 342-347.
- [20] Mieusset, R., Casares, P. Q., Partida, L. S., Sowerbutts, S. F., Zupp, J. L., & Setchell, B. P. (1992). Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *Journal of reproduction and fertility*, *94*(2), 337-343.
- [21] Setchell BP and Thorburn GD (1970) The effect of artificial cryptorchidism on the testis and its blood flow in an Australian marsupial *Macropus eugenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 38, p. 705-708.
- [22] Barenton, B., Blanc, M. R., Caraty, A., Hochereau-de Reviers, M. T., Perreau, C., & Saumande, J. (1982). Effect of cryptorchidism in the ram: changes in the concentrations of testosterone and estradiol and receptors for LH and FSH in the testis, and its histology. *Molecular and cellular endocrinology*, *28*(1), 13-25.
- [23] Lunstra, D. D., & Schanbacher, B. D. (1988). Testicular function and Leydig cell ultrastructure in long-term bilaterally cryptorchid rams. *Biology of reproduction*, *38*(1), 211-220.
- [24] Saypol, D. C., Howards, S. S., Turner, T. T., & Miller Jr, E. D. (1981). Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *Journal of Clinical Investigation*, *68*(1), 39.
- [25] Li, H., Dubocq, F., Jiang, Y., Tiguert, R., Gheiler, E. L., & Dhabuwala, C. B. (1999). Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology*, *53*(6), 1258-1262.
- [26] Linzell, J. L., & Setchell, B. P. (1969). Metabolism, sperm and fluid production of the isolated perfused testis of the sheep and goat. *The Journal of physiology*, *201*(1), 129-143.

- [27] Biggiogera, M., Tanguay, R. M., Marin, R., Wu, Y., Martin, T. E., & Fakan, S. (1996). Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. *Experimental cell research*, 229(1), 77-85.
- [28] Clark, A. M., & Griswold, M. D. (1997). Expression of clusterin/sulfated glycoprotein-2 under conditions of heat stress in rat Sertoli cells and a mouse Sertoli cell line. *Journal of andrology*, 18(3), 257-263.)
- [29] Austin, J. W., Murphree, R., & Hupp, E. (1961). Effect of scrotal insulation on semen of Hereford bulls. *Journal of Animal Science*, 20(2), 307.
- [30] Gerona, G. R., & Sikes, J. D. (1970). Effects of elevated scrotum temperature on spermatogenesis and semen characteristics. In *Journal of Dairy Science*, 53(5), p. 659-64.
- [31] Ross, A. D., & Entwistle, K. W. (1979). The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull. *Theriogenology*, 11(2), 111-129.
- [32] Vogler, C. J., Saacke, R. G., Bame, J. H., Dejarnette, J. M., & McGilliard, M. L. (1991). Effects of Scrotal Insulation on Viability Characteristics of Cryopreserved Bovine Semen1. *Journal of Dairy Science*, 74(11), 3827-3835.
- [33] Kastelic, J. P., Cook, R. B., & Coulter, G. H. (1997). Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13(2), 271-282.
- [34] Fernandes, C. E., Dode, M. A. N., Pereira, D., & Silva, A. E. D. F. (2008). Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, 70(9), 1560-1568.
- [35] Kastelic, J. P., Cook, R. B., & Coulter, G. H. (1999). Effects of ambient temperature and scrotal fleece cover on scrotal and testicular temperatures in rams. *Canadian journal of veterinary research*, 63(2), 157;
- [36] Rasooli, A., Jalali, M. T., Nouri, M., Mohammadian, B., & Barati, F. (2010). Effects of chronic heat stress on testicular structures, serum testosterone and cortisol concentrations in developing lambs. *Animal reproduction science*, 117(1), 55-59.;
- [37] Alves, M. B. R., de Andrade, A. F. C., de Arruda, R. P., Batissaco, L., Florez-Rodriguez, S. A., de Oliveira, B. M. M., & 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.
- [38] Hamilton, T. R. D. S., Mendes, C. M., Castro, L. S. D., Assis, P. M. D., Siqueira, A. F. P., Delgado, J. D. C., & Visintin, J. A. (2016). Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- [39] Braden, A. W. H., & Mattner, P. E. (1970). Effects of scrotal heating in the ram on semen characteristics, fecundity, and embryonic mortality. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(3), 509-518.
- [40] Williamson, P. (1974). The fine structure of ejaculated ram spermatozoa following scrotal heating. *Journal of reproduction and fertility*, 40(1), 191-195.
- [41] Byers, S. W., & Glover, T. D. (1984). Effect of scrotal insulation on the pituitary-testicular axis of the ram. *Journal of reproduction and fertility*, 71(1), 23-31.

- [42] Freidman, R., Daels, P. F., Scott, M. A., Roser, J. F., Mohammed, H. O., & Hughes, J. P. (1995). Endocrine profiles of stallions with impaired testicular function due to increased testicular temperature. *Society for the Study of Reproduction*, 1, 641-646;
- [43] Love, C. C., & Kenney, R. M. (1999). Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biology of reproduction*, 60(3), 615-620.
- [44] Blanchard, T., Varner, D., Johnson, L., Roser, J. F., Hill, J., & Miller, C. (2000). Testicular and hormonal changes in stallions with thermally induced testicular degeneration. *Journal of Reproduction and Fertility-Supplement*-, 56, 51-59.
- [45] Yin, Y., Hawkins, K. L., Dewolf, W. C., & Morgentaler, A. (1997). Heat stress causes testicular germ cell mice. *Journal of Andrology*, 18(2), 159-165.
- [46] Lue, Y. H., Sinha Hikim, A. P., Swerdloff, R. S., Im, P., Taing, K. S., Bui, T., ... & Wang, C. (1999). Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 140(4), 1709-1717.
- [47] Rockett, J. C., Mapp, F. L., Garges, J. B., Luft, J. C., Mori, C., & Dix, D. J. (2001). Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of reproduction*, 65(1), 229-239.
- [48] Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., & Tanaka, T. (1999). Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology of reproduction*, 61(2), 393-399.
- [49] Lue, Y. H., Lasley, B. L., Laughlin, L. S., Swerdloff, R. S., Hikim, A. P. S., Leung, A., & Wang, C. (2002). Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Andrology*, 23(6), 799-805.
- [50] Jia, Y., Hikim, A. P. S., Lue, Y. H., Swerdloff, R. S., Vera, Y., Zhang, X. S., & Wang, C. (2007). Signaling pathways for germ cell death in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) induced by mild testicular hyperthermia and exogenous testosterone treatment. *Biology of reproduction*, 77(1), 83-92.
- [51] Zhang, X. S., Lue, Y. H., Guo, S. H., Yuan, J. X., Hu, Z. Y., Han, C. S., & Liu, Y. X. (2005). Expression of HSP105 and HSP60 during germ cell apoptosis in the heat-treated testes of adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Front Biosci*, 10(1), 3110-3121. [52] Arighi et al., 1987;
- [53] Aupperle, H., Gerlach, K., Bartmann, C. P., Beerhenke, S., & Schoon, H. A. (1999). Histopathological findings in the cryptorchid testes of stallions. *Pferdeheilkunde*, 15(6), 515-522;
- [54] Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S., & Saunders, P. T. (2005). Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, 129(4), 505-514.
- [55] Coryn, M., De Morr, A., Bouters, R., & Vandeplassche, M. (1981). Clinical, morphological and endocrinological aspects of cryptorchidism in the horse. *Theriogenology*, 16(4), 489-496.
- [56] Al-Bagdadi, F., Hoyt, P., Karns, P., Martin, G., Memon, M., McClure, R., & Shoemaker, S. (1991). The morphology of abdominal and inguinal cryptorchid testes in stallions: a light and electron microscopic study. *International journal of fertility*, 36(1), 57-64.

- [57] VanDemark, N. L., & Ewing, L. L. (1963). Factors affecting testicular metabolism and function. *Journal of reproduction and fertility*, 6(1), 1-8.
- [58] Ewing, L. L., & VanDemark, N. L. (1961). Metabolic activity of rabbit testicular tissue after various periods in abdomen. *Journal of Dairy Science*, 44(6).
- [59] Maines, M. D., & Ewing, J. F. (1996). Stress response of the rat testis: in situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia. *Biology of reproduction*, 54(5), 1070-1079.
- [60] Davis, J. R., & Morris, R. N. (1963). Effect of glucose on incorporation of L-lysine-UC 14 into testicular proteins. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 205(5), 833-836.
- [61] Baldwin, D. M., & Ewing, L. L. (1967). An enzymatic comparison of glucose metabolism in the rabbit and chicken testis and kidney cortex. *Comparative biochemistry and physiology*, 23(2), 569-582.
- [62] DeJarnette, J. M., Saacke, R. G., Bame, J., & Vogler, C. J. (1992). Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *Journal of animal science*, 70(2), 484-491.
- [63] Thundathil, J., Meyer, R., Palasz, A. T., Barth, A. D., & Mapletoft, R. J. (2000). Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology*, 54(6), 921-934.
- [64] Walters, A. H., Saacke, R. G., Pearson, R. E., & Gwazdauskas, F. C. (2005). The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 64(6), 1404-1421.
- [65] Hendricks, K. E. M., Martins, L., & Hansen, P. J. (2009). Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to post-ejaculatory aging and heat shock: development to the blastocyst stage and sex ratio. *Journal of Reproduction and Development*, 55(1), 69-74.
- [66] Schill, W. B. (1982). Therapy of idiopathic astheno-and oligozoospermia with pentoxifylline. *Fortschritte der Medizin*, 100(15), 696-700.
- [67] Moein, M. R., Khalili, M. A., & Davoudi, A. (2005). The effect of oral administration of Pentoxifylline on sperm motility of asthenozoospermic ejaculates from men with or without testicular varicoceles. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 3(1), 25-29.;
- [68] Oliva, A., Dotta, A., & Multigner, L. (2009). Pentoxifylline and antioxidants improve sperm quality in male patients with varicocele. *Fertility and sterility*, 91(4), 1536-1539.
- [69] Yao, C., Li, G., Qian, Y., Cai, M., Yin, H., Xiao, L., & Shi, B. (2016). Protection of Pentoxifylline against Testis Injury Induced by Intermittent Hypobaric Hypoxia. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- [70] Queiroz, G. C. D., Oliveir, V. V. G., Gueiros, O. G., Torres, S. M., Maia, F. C. L., Tenorio, B. M., & Silva, J. V. A. (2013). Effect of pentoxifylline on the regeneration of rat testicular germ cells after heat shock. *Anim. Reprod*, 10(1), 45-54.
- [71] Pozor, M. A., Muehlhaus, J., King, A., Macpherson, M. L., Troedsson, M. H., & Bailey, C. S. (2011). Effect of pentoxifylline treatment on testicular perfusion and semen quality in Miniature horse stallions. *Theriogenology*, 76(6), 1027-1035.

- [72] Love, C. C., Garcia, M. C., Riera, F. R., & Kenney, R. M. (1991). Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 44, 99-105.
- [73] Faber, N. F., & Roser, J. F. (2000). Testicular biopsy in stallions: diagnostic potential and effects on prospective fertility. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (56), 31-42.
- [74] Favareto, A. P. A., Fernandez, C. D. B., da Silva, D. A. F., Anselmo-Franci, J. A., & Kempinas, W. D. G. (2011). Persistent Impairment of Testicular Histology and Sperm Motility in Adult Rats Treated with Cisplatin at Peri-Puberty. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 109(2), 85-96.
- [75] Siervo, G. E., Vieira, H. R., Ogo, F. M., Fernandez, C. D., Gonçalves, G. D., Mesquita, S. F., & Fernandes, G. S. (2015). Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology*, 330, 1-8.
- [76] Klein, C., Rutllant, J., & Troedsson, M. H. (2011). Expression stability of putative reference genes in equine endometrial, testicular, and conceptus tissues. *BMC research notes*, 4(1), 120.
- [77] Köhne, M., Ille, N., Erber, R., Razavi, M. S. A., Walter, I., & Aurich, C. (2016). Effects of periovulatory gonadotrophin treatment on luteal function and endometrial expression of selected genes in cyclic pony mares. *Theriogenology*, 86(9), 2147-2155.
- [78] Claes, A., Ball, B. A., Almeida, J., Corbin, C. J., & Conley, A. J. (2013). Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology*, 79(9), 1229-1235.
- [79] Williams, W. L., & Cunningham, B. (1940). Histological changes in the rat testis following heat treatment. *The Yale journal of biology and medicine*, 12(3), 309.
- [80] Humphrey, J. D., & Ladds, P. W. (1975). A quantitative histological study of changes in the bovine testis and epididymis associated with age. *Research in veterinary science*, 19(2), 135-141.
- [81] Watson, E. D., Clarke, C. J., Else, R. W., & Dixon, P. M. (1994). Testicular degeneration in 3 stallions. *Equine veterinary journal*, 26(6), 507-510.
- [82] Gehlen, H., Bartmann, C. P., Klug, E., & Schoon, H. A. (2001). Azoospermia due to testicular degeneration in a breeding stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, 21(3), 137-139.
- [83] Free, M. J., Schluntz, G. A., & Jaffe, R. A. (1976). Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biology of Reproduction*, 14(4), 481-488.
- [84] Peltola, V., Huhtaniemi, I., & Ahotupa, M. (1995). Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. *Biology of reproduction*, 53(5), 1146-1150.
- [85] Pérez-Crespo, M., Pintado, B., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular reproduction and development*, 75(1), 40-47.



- [86] Paul, C., Teng, S., & Saunders, P. T. (2009). A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biology of Reproduction*, *80*(5), 913-919.
- [87] Reyes, J. G., Farias, J. G., Henríquez-Olavarrieta, S., Madrid, E., Parraga, M., Zepeda, A. B., & Moreno, R. D. (2012). The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2012*
- [88] Mancine, R. E., Penhos, J. C., Izquierdo, I. A., & Heinrich, J. J. (1960). Effects of acute hypoglycemia on rat testis. *Proceedings of the Society For Experimental Biology and Medicine*, *104*(4), 699-702.
- [89] Davis, J. R., & Morris, R. N. (1963). Effect of glucose on incorporation of L-lysine-<sup>14</sup>C into testicular proteins. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, *205*(5), 833-836.
- [90] Means, A. R., & Hall, P. F. (1968). Protein biosynthesis in the testis: I. Comparison between stimulation by FSH and glucose. *Endocrinology*, *82*(3), 597-602.
- [91] Ahotupa, M., & Huhtaniemi, I. (1992). Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biology of reproduction*, *46*(6), 1114-1118.
- [92] Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *1*(1), 15-24.
- [93] Semercioz, A., Onur, R., Ogras, S., & Orhan, I. (2003). Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuroendocrinology letters*, *24*(1/2), 86-90.
- [94] Kim, B., Park, K., & Rhee, K. (2013). Heat stress response of male germ cells. *Cellular and molecular life sciences*, *70*(15), 2623-2636.
- [95] Shaha, C., Tripathi, R., & Mishra, D. P. (2010). Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *365*(1546), 1501-1515.
- [96] Rucker III, E. B., Dierisseau, P., Wagner, K. U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Flaws, J. A., & Hennighausen, L. (2000). Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular Endocrinology*, *14*(7), 1038-1052.
- [97] Vera, Y., Diaz-Romero, M., Rodriguez, S., Lue, Y., Wang, C., Swerdloff, R. S., & Sinha Hikim, A. P. (2004). Mitochondria-dependent pathway is involved in heat-induced male germ cell death: lessons from mutant mice. *Biology of reproduction*, *70*(5), 1534-1540.
- [98] Vera, Y., Rodriguez, S., Castanares, M., Lue, Y., Atienza, V., Wang, C., & Sinha Hikim, A. P. (2005). Functional role of caspases in heat-induced testicular germ cell apoptosis. *Biology of reproduction*, *72*(3), 516-522.
- [99] Lagerlof, N. (1938). Infertility in male domestic animals. *Vet. Med*, *33*, 550-561.
- [100] Yaeram, J., Setchell, B. P., & Maddocks, S. (2006). Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, *18*(6), 647-653.
- [101] Gehlen, H., Bartmann, C. P., Klug, E., & Schoon, H. A. (2001). Azoospermia due to testicular degeneration in a breeding stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, *21*(3), 137-139.

- [102] Strieter, R. M., Remick, D. G., Ward, P. A., Spengler, R. N., Lynch, J. 3., Larrick, J., & Kunkel, S. L. (1988). Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxofylline. *Biochemical and biophysical research communications*, 155(3), 1230-1236.
- [103] Rieneck, K., Diamant, M., Haahr, P. M., Schönharting, M., & Bendtzen, K. (1993). In vitro immunomodulatory effects of pentoxifylline. *Immunology letters*, 37(2), 131-138.
- [104] Neuner, P., Klosner, G., Schauer, E., Pourmojib, M., Macheiner, W., Grünwald, C., & Schwarz, T. (1994). Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*, 83(2), 262.
- [105] Collingridge, D. R., & Rockwell, S. (2000). Pentoxifylline improves the oxygenation and radiation response of BA1112 rat rhabdomyosarcomas and EMT6 mouse mammary carcinomas. *International journal of cancer*, 90(5), 256-264.
- [107] Deree, J., Martins, J. O., Melbostad, H., Loomis, W. H., & Coimbra, R. (2008). Insights into the regulation of TNF-a production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics*, 63(3), 321-328.
- [108] Liu, Y., & Li, X. (2010). Molecular basis of cryptorchidism-induced infertility. *Science China Life Sciences*, 53(11), 1274-1283.

*“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”*

*João Guimarães Rosa*

## Considerações Finais

- ❖ O modelo de choque térmico escrotal utilizado foi eficiente em causar a degeneração testicular em garanhões;
  
- ❖ O efeito deletério do calor foi verificado no:
  - ✓ Tamanho testicular e histologia
    - Pela diminuição do volume testicular total e de medidas de túbulos seminíferos;
    - Pelo aumento de danos ao parênquima testicular;
  
  - ✓ Produção espermática
    - Pela diminuição dos parâmetros cinéticos e da integridade da membrana plasmática;
    - Pelo aumento de defeitos morfológicos nos espermatozoides;
  
  - ✓ Alterações Moleculares
    - Pelo aumento da peroxidação lipídica, ativação de caspases 3 e 7, expressão gênica de marcadores de apoptose (*Bax*, *Casp9* e *Casp8*) e marcador de choque térmico (*Hsf1*);
  
- ❖ O tratamento com pentoxifilina causou alguns benefícios, verificados no:
  - ✓ Tamanho testicular e histologia
    - Pela menor presença de ondulação da lâmina basal ao redor dos túbulos, indicando que os túbulos seminíferos foram menos afetados no grupo tratado com o fármaco em relação ao grupo DG;
  
  - ✓ Produção espermática
    - Pela melhor motilidade total e de espermatozoides rápidos e menor número de defeitos espermáticos no grupo tratado com o fármaco em comparação com o grupo DG;

✓ Alterações Moleculares

- Pela menor peroxidação lipídica e ativação de caspases 3 e 7 nos espermatozoides do grupo tratado com o fármaco em comparação com o grupo DG;
- Pela menor expressão do marcador de apoptose *Bax* no dia 30 após o insulto térmico escrotal no testículo do grupo tratado com o fármaco em comparação com o grupo DG;
- Pela menor expressão do marcador de choque térmico *Hsf1* no dia 60 após o insulto térmico escrotal no testículo do grupo tratado com o fármaco em comparação com o grupo DG.