

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 01/03/2018.

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;
- cm³: 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;
- mm³: 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 α : fator de necrose tumoral F α ;

UNESP: Universidade Estadual Paulista;

VAP: velocidade média de trajeto;

VCL: velocidade curvilínea;

VSL: velocidade linear progressiva;

v/v: volume por volume;

μ L: microlitro;

μ 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

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
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
3. OBJETIVOS	68
3.1. Objetivos gerais	68
3.2. Objetivos específicos	68
4. REFERÊNCIAS	70
5. CAPÍTULO 1	81
6. CAPÍTULO 2	110
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	138

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.

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- α 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 β , IL6, and Tumor Necrosis Factor – α 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.

“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;