



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

MAÍRA GUIMARÃES KERSUL

**EFEITO PREVENTIVO DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO NA DEGENERAÇÃO
TESTICULAR POR CHOQUE TÉRMICO AGUDO EM CAMUNDONGOS**

**ILHÉUS – BAHIA
2021**

MAÍRA GUIMARÃES KERSUL

**EFEITO PREVENTIVO DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO NA DEGENERAÇÃO
TESTICULAR POR CHOQUE TÉRMICO AGUDO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Clínica e
Sanidade Animal

Orientadora: Prof^a Dr^a. Paola P. N.
Snoeck

Co-orientador: Prof Dr. Juneo Freitas
Silva

**ILHÉUS – BAHIA
2021**

K41

Kersul, Maíra Guimarães.

Efeito preventivo do ácido alfa-lipoico na degeneração testicular por choque térmico agudo em camundongos / Maíra Guimarães Kersul. – Ilhéus, BA: UESC, 2021.

xvii, 88f.: il.; anexos.

Orientadora: Paola Pereira das Neves Snoeck.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências.

1. Antioxidante. 2. Histopatologia animal. 3. Temperatura corporal – Regulação. 4. Testículo. I. Título.

CDD 613.286

MAÍRA GUIMARÃES KERSUL

**EFEITO PREVENTIVO DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO NA DEGENERAÇÃO
TESTICULAR POR CHOQUE TÉRMICO AGUDO EM CAMUNDONGOS**

Ilhéus – BA, __/__/2021

Profa. Dra. Paola Pereira das Neves Snoeck – Dsc
UESC/DCAA
(Orientador)

Prof. Dr. Juneo Freitas Silva – Dsc
UESC/DCAA
(Co-orientador)

Profa. Dra. Sandra Cristina Becker Silva – Dsc
UESC/DCAA

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini – Dsc
USP

**ILHÉUS – BAHIA
2021**

“A história está repleta de pessoas que, como resultado do medo, ou por ignorância, ou por cobiça de poder, destruíram conhecimentos de imensurável valor que, em verdade, pertenciam a todos nós. Nós não devemos deixar isso acontecer novamente”

-Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer pela energia que rege a vida, o universo e tudo mais. Que eu nunca me permita esquecer que somos indiferentes diante da infinitude, mas nossas ações são altamente relevantes.

Aos camundongos, que como animais de laboratórios, são imprescindíveis (ainda) para avançarmos cientificamente. Mesmo sem noção de sua própria importância, doam seu único bem: a vida, em troca de respostas para nossas indagações.

Aos meus pais, Célio e Mari por toda confiança, apoio e segurança, por me ensinarem que “quem tem medo de sofrer, não merece o melhor da vida”. E é com essa coragem que eu me permiti fazer meus próprios vôos. Tia Marlúcia e primo Afonsinho pelos ótimos momentos durante as folgas com uma vista para o mar. Meus irmãos Pat, Guinho e Bel por entenderem exatamente o que eu precisava ouvir e por todo incentivo, risadas e puxões de orelha carinhosos.

À Amandinha, minha parceira de todos os momentos, seja na saúde ou na doença, nos momentos de alegria e principalmente na adversidade. Obrigada por estar presente em todas as etapas, por me manter focada e não ter me deixado cair nos momentos mais difíceis, virando noite me ajudando a ler artigos para elaborar os projetos A, B, C, D, E...Z mesmo sem ser da área, e ainda abrindo mão do “soninho sagrado” para ajudar na execução do projeto enquanto podia ficar de férias. A força que você me deu para superar todos os obstáculos desde que nos conhecemos resulta hoje no quanto eu amadureci, enfrentei meus demônios e melhorei como pessoa, profissional e pesquisadora. A confiança que você depositou em mim fez total diferença e eu espero retribuir quando chegar a sua vez.

Aos meus bichinhos Mafalda, Anakhin, Quiterinha, Romeu, Severino (*in memorian*) e os peixes que ouviram muitos desabafos e retribuíram com carinho nas suas lambidinhas, ronrons, mordidinhas, bicadas e outras formas de demonstração de afeto. Foram muito importantes nos momentos de solidão e suavização de estresse.

Ao tio Henrique, padrinho de consideração, e Camile, amiga de adolescência - ambos *in memorian* - que precisaram partir e me deixaram a lição

de contemplar cada minuto de vida e buscar realizar apenas ações construtivas para minha mente e corpo.

Ao Paulo César pela boa vontade de emprestar o carro no momento mais difícil que envolviam os deslocamentos para UESC.

Aos vigilantes Raimundo, Rondinele, Edgar (e todos que eu não gravei o nome), seu Zé do biotério, Alex e Roberto (e Nina) dos carneiros, sempre solícitos, educados, que além de toda contribuição nos bastidores desse trabalho, foram responsáveis por boas risadas e conversas dos temas mais aleatórios possíveis.

Aos funcionários do HV Ivo, Helen, Fabiana, Givaldo, Márcia, Gabi e tia Antônia por manterem a pesquisa viva durante a pandemia, seja pela ajuda técnica, pela maratona biotério-HV de bicicleta, pelo cafezinho, pelo empréstimo emergencial de material e limpeza dos ambientes e materiais, e claro, pela companhia.

Aos guerreiros acadêmicos que foram peça fundamental na concretização do projeto: Will e Lari, formamos um ótimo time acadêmico e para vida. Tudo que vivemos nessa UESC, crescemos, sendo coach de dieta e fitness, cantando no laboratório para aliviar as tensões, com certeza esse caminho foi mais divertido com a companhia de vocês; João, Paula e Karina por dividirmos e revezarmos os surtos com bons puxões de orelha e gritos de “Eu acredito em você, então levanta e vai!”; Luciano, Jeane, Biunkinha (pensa que esqueci a nossa pizza?) por toda correria, paciência, companheirismo e ensinamentos de patologia e histologia; Eliege, Adriana, Luciana por tantas dicas e lições ensinadas, além de toda ajuda durante essa caminhada.

Aos meus amigos que são verdadeiros irmãos pela compreensão da minha ausência nos rolês, pela paciência para me aturar, pelo perdão de ter que vender ingresso da festa na véspera e de não poder ir para os ensaios da banda ou mesas de RPG. E claro, pelo perdão de não poder estar presente sempre para ajudar nas horas difíceis: Marquinho, Brunito, Yas, Rhian, Laura, Mírian, Brenda, Bruno, Fred, Tarcio e Tarciso, Diego Alejandro, Martín, Jullie e Emily, NAPAS, GEAS, Suz, galera do Muriqui House, Toru, Elson, galera do pedal, Camila, Luba, Tambi e tantos outros. Obrigada mesmo por todos momentos de leveza nessa caminhada.

Agradeço a minha orientadora Dra. Paola Snoeck pela parceria nessa luta que foi conseguir elaborar um projeto, após tentativas de A a Z (literalmente), exigir sempre o melhor de mim, me ajudando a reafirmar que eu sempre posso ir além. Toda correria sufocante que foi todo esse processo unindo GERA e NuRE - com a participação especial do professor Dr. Juneo - para enfrentarmos com resiliência todas “aventuras” que esse mestrado pôde proporcionar e que ficarão marcadas como aprendizado necessário.

Aos professores Flávia, Danilo, Munhoz, Sandra, Mário, Fabiana, Gesil, Renata e Manoel por todos os ensinamentos que não se restringiram ao meio acadêmico. Todo incentivo, palavras, conversas, broncas, debates foram essenciais para construir a pessoa que sou hoje, com certeza melhor que ontem e que deseja ir mais além.

À FAPESB, instituição que, mesmo com todas as dificuldades de incentivo à educação, pesquisa e ciência no país, manteve-se no cumprimento de suas atividades, consciente de que é importante permanecer financiando o futuro da nossa nação. Parabéns pela resistência e que prossiga assim!

À Alexandra Elbakyan (criadora sci-hub) e desenvolvedores do Mendeley que tornam a ciência acessível, mais fácil e prazerosa de trabalhar. Conhecimento é um direito da humanidade e deve ser compartilhado da forma mais ampla possível.

EFEITO PREVENTIVO DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO NA DEGENERAÇÃO TESTICULAR POR CHOQUE TÉRMICO AGUDO EM CAMUNDONGOS

RESUMO

A função espermatogênica está diretamente ligada a termorregulação testicular, visto que o aumento de temperatura intratesticular pode ocasionar a degeneração testicular impactando negativamente na fertilidade e produção de testosterona. A partir do momento em que ocorre a apoptose nas células de Leydig e maior liberação de ROS, compondo um quadro associado de estresse oxidativo, o organismo deveria combater esses efeitos degenerativos com seus próprios antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. No entanto, a depender da intensidade e continuidade da agressão, esses nem sempre conseguem cumprir sua tarefa antioxidativa. É dessa forma que a busca por suplementação com o ácido alfa-lipoico (ALA) pode conquistar espaço e bons resultados por sua capacidade antioxidante de tratar, atenuar e até prevenir diversas alterações no organismo. Seus efeitos na reprodução animal já foram descritos para melhoria da motilidade, qualidade, concentração espermática em casos de varicocele, isquemia/reperfusão, criopreservação e aumento na taxa de prenhez. Portanto, objetivamos avaliar a capacidade preventiva do ALA na degeneração testicular induzida por choque térmico em camundongos maduros sexualmente. Para isso, 36 camundongos foram divididos nos seguintes grupos: Controle Negativo (CN; n = 6); Controle Positivo (CP; n = 10) que foram suplementados com placebo; ALA 200mg (A2P; n = 10) que foram suplementados com 200mg/Kg/dia; ALA 400mg (A4P; n = 10) que foram suplementados com 400mg/Kg/dia. Excetuando o CN, os demais grupos foram suplementados durante 30 dias, foram submetidos ao esgotamento das reservas epididimárias ao serem colocados junto com fêmeas para copularem por, no mínimo, 8 dias e, então, foram levados ao choque térmico testicular para induzir a degeneração testicular, sendo eutanasiados 48h depois. Foram analisadas a biometria testicular (LET), a cinemática pelo Sperm Class Analyser[®], a morfologia, concentração, integridade funcional e estrutural das membranas espermáticas, a condensação da cromatina, e a histomorfometria testicular em lâminas coradas em H&E. Nesse estudo observamos em destaque a capacidade anti-inflamatória do ALA

ao combater edema da bolsa testicular nos animais tratados e a melhor capacidade de preservá o parênquima testicular em sua maior dose, destacando seu potencial preventivo em lesões teciduais severas. Diante da comprovada capacidade preventiva da suplementação de ALA via oral na degeneração testicular causada por choque térmico agudo, é interessante estudar como se comporta esse mecanismo antioxidante como tratamento dos danos teciduais já instalados.

Palavras-chave: Antioxidante. Histomorfometria. Termorregulação. Testículo

PROTECTIVE EFFECT OF ALPHA-LIPOIC ACID ON TESTICULAR DEGENERATION BY ACUTE HEAT STRESS IN MICE

ABSTRACT

The spermatogenic function is directly linked to testicular thermoregulation, since the increase in intratesticular temperature can cause degeneration, negatively impacting fertility and testosterone production. From the moment that apoptosis occurs in Leydig cells and greater release of ROS, composing an associated picture of oxidative stress, the body should combat these degenerative effects with its own enzymatic and non-enzymatic antioxidants. However, depending on the intensity and continuity of the aggression, they are not always able to fulfill their antioxidative task. Alpha-lipoic acid (ALA) has been reaching space and good results as an antioxidant supplement capable of treating, attenuating and even preventing various changes in the organism. Its effects on animal reproduction have already been described to improve motility, viability, sperm concentration in cases of varicocele, ischemia / reperfusion, cryopreservation and increased pregnancy rate. Therefore, the objective was to evaluate the preventive capacity of ALA in testicular degeneration induced by thermal shock in sexually mature mice. For this, 36 mice were placed into the following groups: Negative Control (CN; n = 6) as a local parameter of the vivarium; Positive Control (CP; n = 10) supplemented with placebo; 200mg ALA (A2P; n = 10) supplemented with 200mg / kg / day; ALA 400mg (A4P; n = 10) supplemented with twice the previous dose. Except for the CN, the other groups were supplemented for 30 days, underwent depletion of epididymal reserves when they were placed together with females to copulate for at least 8 days, and then they were taken to testicular thermal shock to induce testicular degeneration, being euthanized 48h later. Individuals underwent testicular biometry (LET), underwent macroscopic post mortem evaluation, collection of gonads and accessory sexual glands for general evaluation of ALA effects on individuals, kinematics evaluation by Sperm Class Analyzer® and other parameters that evaluate morphology, concentration, functional and structural integrity of sperm membranes, chromatin condensation behavior, and histological analysis and histomorphometry in slides stained in H&E. In this study, the anti-inflammatory capacity of ALA was observed by detecting edema in the scrotum of

CP, only. As for the histological structure, the A4P group dose generally showed a better ability to preserve it, accentuating its preventive potential in severe tissue lesions in the testicular parenchyma. On the other hand, the groups that received ALA had an average mortality rate of 35%, while the other results did not demonstrate relevance. In view of the potential preventive capacity of ALA in the degeneration event caused by acute thermal shock, it is necessary to investigate its ability to reverse tissue damage.

Keywords: Antioxidant. Histomorfometry. Testicles / Testis. Thermoregulation;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Linha do tempo das principais etapas do experimento	46
Figura 2 - Método de avaliação das medidas do (A) diâmetro tubular e (B) altura do epitélio	53
Figura 3 – Distribuição das áreas epiteliais entre os tratamentos	59
Figura 4 – Histologia testicular, coloração H&E, aumento de 200x	60
Figura 5 - Distribuição da intensidade de lesões tubulares	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição da arquitetura histológica do parênquima testicular de acordo com as alterações encontradas de acordo com o preconizado por Johnsen (1970) e adaptada por Dias et al. (2019).....	55
Tabela 2 – Avaliação da biometria corporal, peso testicular e peso relativo de órgãos reprodutores com o peso corporal.....	57
Tabela 3 - Avaliação espermática pelo sistema Sperm Class Analyser®, avaliação de concentração por câmara de Neubauer, porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, porcentagem de integridade funcional (HOST) e estrutural (CFDA/PI) das membranas e avaliação da compactação da cromatina ...	58
Tabela 4 - Avaliação da densidade volumétrica de componentes teciduais testiculares	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µL	Microlitro(s)
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
10 ⁶	milhões
4HNE	4-hidroxinonenal
®	Registrado
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ALA	Ácido Alfa-Lipoico
ALH	Amplitude do Deslocamento de Lateral da Cabeça Espermática
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CAD	Caspase-atividade DNase
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DHLA	Ácido Diidrolipoico
DL50	Dose letal capaz de ter efeito em 50% da população
GPx	Glutaciona peroxidase
GSTA	Glutaciona S-Transferase Alfa
Fe ³⁺	Íon de ferro
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
HIF	Fator de Indução de Hipóxia
Hmox1	Heme oxigenase 1
Hsf1	Fator de Choque Térmico 1
HSP	Proteína de Choque Térmico
IP	Iodeto de Propídio
Kg	Quilograma
LET	Largura Escrotal Total
LETv	Variação LET

LH	Hormônio Luteinizante
LIN	Linearidade
MDA	Malonaldeído
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
min	Minutos
mm	Milímetro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NO	Óxido Nítrico
-O ₂ ⁻	Radical superóxido
-OH	Radical Hidroxila
PC	Peso corporal
PO	Peso do órgão
PR	Peso relativo
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
ROS	Espécie reativa de oxigênio
seg	Segundos
SOD	Superóxido dismutase
STAR	Proteína Reguladora Aguda Esteroidogênica
STR	Retilinearidade
VAP	Velocidade Média do Trajeto
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Linear Progressiva
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos.....	21
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	Anatomia e Fisiologia da Termorregulação Testicular dos Mamíferos	22
3.2	Espmatogênese.....	24
3.3	Alterações Testiculares Causadas por Estresse Térmico por Calor	25
3.4	Estresse Oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	32
3.5	Peroxidação Lipídica.....	34
3.6	Mecanismos Antioxidantes	34
3.7	Agentes Antioxidantes na Prevenção da Degeneração Testicular	36
3.8	Degeneração Testicular	37
3.9	Ácido Alfa-Lipoico	42
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1	Modelos Exprimmentais.....	46
4.2	Delineamento Experimental	46
4.3	Ácido Alfa-Lipoico	47
4.4	Choque Térmico	47
4.5	Eutanásia e Coleta de Material Biológico	48
4.16	Testosterona.....	48
4.6	Avaliação Biométrica Corporal e do Índice Gonadossomático dos Camundongos	49
4.7	Coleta e Análises Espermáticas	50
4.8	Cinemática Espermática	50
4.9	Concentração e Morfologia Espermática	51
4.10	Teste Hiposmótico (HOST)	51
4.11	Integridade Estrutural das Membranas	52
4.12	Teste de Avaliação da Cromatina	52
4.13	Análises Histológicas e Histomorfométricas	52

4.14	Morfometria Testicular	53
4.15	Histopatologia	54
4.17	Estatística	55
5	RESULTADO	57
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DAS LÂMINAS COM HEMATOXILINA E EOSINA.....	87
	ANEXO B – ARQUITETURA HISTOLÓGICA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR DE ACORDO COM AS ALTERAÇÕES CLASSIFICADAS POR JOHNSEN (1970).....	88

1 INTRODUÇÃO

A termorregulação testicular é uma característica fisiológica imprescindível para manter as funções testiculares preservadas, principalmente a produção de gametas. Para isso, é necessário que a temperatura testicular seja inferior à corpórea (DURAIRAJANAYAGAM et al., 2014; KASTELIC, 2014) e os hábitos modernos humanos têm ocasionado eventual hipertermia escrotal e termorregulação anormal do testículo. Práticas como sauna e spa, uso de roupas apertadas, computador portátil sobre o colo e até dirigir podem comprometer a fertilidade masculina dos humanos (CHOWDHURY; STEINBERGER, 1970; EISENBERG; IVELL, 2007; LIPSHULTZ, 2011; SHEYNKIN et al., 2011; GAROLLA et al., 2013). Inclusive, as radiações emitidas por telefone móvel têm sido investigadas como meios de comprometer a fertilidade masculina (DESAI et al., 2009). Estima-se que 20% dos casais em todo o mundo possuem alterações de fertilidade, sendo aproximadamente metade relacionado aos homens (AITKEN; ROMAN, 2008).

No entanto, não somente os humanos têm sofrido redução da fertilidade devido a falhas no processo de termorregulação testicular. Essas alterações são também muito descritas nos animais domésticos e relatadas em animais selvagens mantidos em cativeiro, como por exemplo, há relatos de gorilas (*Gorilla gorilla*) azoospermicos por atrofia testicular e adipose no interstício (BOER, 1983), de guepardos (*Acinonyx jubatus*) pertencentes a zoológicos norte americanos com degeneração e atrofia testicular em estágios avançados (MUNSON, 1993), casos de veado-bororó-do-sul (*Mazama nana*) com defeitos espermáticos oriundos de estresse térmico e falhas de termorregulação (ABREU et al., 2009), dentre outros relatos que comprovam a abrangência dessa enfermidade.

Desse modo, qualquer processo que eleve a temperatura escrotal, mesmo ele intrínseco ou extrínseco, tem como resposta a degeneração testicular. A depender da intensidade do insulto, a redução da fertilidade por degeneração varia de discreta à severa, podendo ser unilateral ou bilateral. Isso reflete em um ejaculado com aspecto fino a aquoso, com baixa concentração espermática ou azoospermia e alta porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos (HAFEZ; HAFEZ, 2004; TURNER, 2007; GARCIA, 2017; SILVA, 2017). Essas alterações podem se tornar crônicas, havendo aumento elevado de radicais livres e resultando em esterilidade,

comprometendo a economia e genética de alto valor.

Essa elevação de radicais livres, principalmente no testículo, causa efeitos negativos no metabolismo de energia do espermatozoide, na motilidade, na qualidade espermática e na fragmentação de DNA em mamíferos. Para combater esse efeito oxidativo, existem antioxidantes presentes naturalmente no plasma seminal tanto enzimáticos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), como não enzimáticos: ácido ascórbico e tocoferol (SALEH; AGARWAL, 2002; MAIA; BICUDO, 2009; PISOSCHI; POP, 2015). Quando há falha no controle oxidativo, a suplementação antioxidante na dieta torna-se uma alternativa que vem sendo investigada e aplicada observando-se sua ação direta na defesa das células ou atuando como cofatores essenciais para enzimas antioxidantes (WRIGHT et al., 2014).

O ácido alfa-lipoico já demonstrou efetividade na prevenção de doenças por agir inibindo as ROS e também agindo intracelularmente na forma de ácido diidrolipoico (DHHLA) (PACKER et al., 1995b; ROCHETTE et al., 2013), além de agir como coenzima para os antioxidantes fisiológicos enzimáticos e não enzimáticos. Nos estudos de Moini et al. (2002) e de Liu (2008) foi descoberto que o ALA também age como coenzima capaz de atuar no metabolismo mitocondrial, sendo capaz de atrasar, prevenir e reparar a deterioração mitocondrial. Assim, tanto o ALA como o DHHLA são considerados "antioxidantes universais" porque são hidro e lipossolúveis (PACKER et al., 1995b; MAGALHÃES, 2000; MOINI et al., 2002). Resultados animadores têm sido obtidos com o uso desse antioxidante em tratamentos de doenças cardíacas, envenenamento por metais pesados, danos por radiações, diabetes, doenças neurodegenerativas, AIDS, aterosclerose, neuropatia diabética, varicocele, entre outros (PACKER et al., 1995b; YING et al., 2010; SHAYGANNIA et al., 2018). Como a maioria dos trabalhos usou camundongos devido a facilidade de manuseio para suplementação e os protocolos de indução da degeneração testicular, esse foi nosso modelo experimental de eleição.

Diante do quadro de temperatura média global crescente (STOCKER et al., 2013), os hábitos modernos e a necessidade de manter, recuperar e melhorar a capacidade reprodutiva, o ALA se torna uma alternativa suplementar benéfica que vem sendo comprovada e até então segura para aplicar em humanos, animais domésticos e em animais selvagens de cativeiro susceptíveis a degeneração

testicular. Portanto, é de interesse geral o estudo de seus efeitos em quadros degenerativos no testículo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a suplementação oral com Ácido Alfa-Lipoico na prevenção da degeneração testicular aguda induzida por choque térmico em camundongos maduros sexualmente.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito preventivo do ALA após indução da degeneração testicular aguda na:

- Biometria testicular e características macroscópicas testiculares.
- Qualidade espermática.
- Histomorfometria e histopatologia testicular.
- Concentrações de testosterona circulante.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia e Fisiologia da Termorregulação Testicular dos Mamíferos

O sistema de termorregulação é de extrema importância para a manutenção da espermatogênese nas gônadas masculinas de mamíferos, principalmente nos que possuem bolsa testicular, uma vez que a produção de gametas saudáveis é diretamente dependente da temperatura, que deve permanecer entre 2 a 6° C abaixo da corporal (MOORE; QUICK, 1924; MORGENTALER et al., 1970; WAITES, 1970; SETCHELL, 1978; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2014; KASTELIC, 2014). Portanto, qualquer comprometimento na termorregulação influencia na qualidade espermática, visto que o estresse por calor é capaz de prejudicar tanto os espermatozoides epididimários quanto as células germinativas em diferentes fases no processo de espermatogênese (ZHU et al., 2004).

Evolutivamente, alguns mamíferos que fisiologicamente possuem o testículo na cavidade interna possuem mecanismos alternativos para contornar os efeitos adversos de aumento na temperatura (como as focas e leões marinhos) ou desenvolveram gametas mais resistentes ao calor acima do fisiológico (como elefantes e rinocerontes) (SETCHELL, 1978), enquanto os mamíferos que possuem bolsa testicular encontram-se mais vulneráveis aos insultos (WAITES; VOGLMAYR, 1963). Como forma de defesa, sua termorregulação testicular possui mecanismos sinérgicos categorizados em: a) não-vascular, o qual inclui as respostas fisiológicas como a atividade das glândulas sudoríparas; o deslocamento testicular em relação ao abdômen, contraindo e enrugando a bolsa testicular quando há queda de temperatura ambiente e relaxando e estendendo-a quando há aumento da temperatura ambiente; o comportamento de buscar conforto térmico no ambiente, como a procura por uma sombra; b) vascular, o qual engloba o sistema de contracorrente e vasodilatação periférica (COOPER, 1845; RIZZOTO; KASTELIC, 2020).

3.1.1 Termorregulação não-vascular

Os mecanismos que compõem a termorregulação não-vascular são: a pele fina com o mínimo de gordura subcutânea, glândulas sudoríparas densas, escassa

distribuição de pelos, músculo estriado cremáster, músculo liso da túnica dartos (WAITES; VOGLMAYR, 1963; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

A camada de gordura subcutânea cumpre sua função com efeito isolante, reduzindo a perda de calor por condução para o ambiente. Nesse caso, quanto menor a camada, mais fácil a perda de calor testicular (HOLSTEIN et al., 1974; NANAYAKKARA, 2011). Já as glândulas sudoríparas promovem o resfriamento por evaporação ao liberarem o suor, mediado pelo estímulo dos nervos simpáticos adrenérgicos (WAITES; VOGLMAYR, 1963). O músculo cremáster envolve os codões espermáticos e, em sincronia com a túnica dartos que envolve os testículos, maximizam a perda de calor ao relaxar e resultar no afastamento dos testículos do abdômen e aumento da superfície para dissipação do calor. Quando há necessidade de evitar perda de calor, o músculo cremáster que é anexado ao músculo oblíquo abdominal interno, faz a contração e aproxima os testículos do abdômen (VOGLMAYR, 1963; SENGER, 2003; WAITES et al., 2015; RIZZOTO; KASTELIC, 2020).

O comportamento e aumento da taxa respiratória também são capazes de auxiliar no resfriamento testicular (KASTELIC, 2014).

3.1.2 Termorregulação vascular

A termorregulação vascular é regulada passivamente por um sistema de contracorrente que permite que a temperatura testicular mais baixa seja mantida sem a perda indevida de energia através da parede do escroto (WAITES; MOULE, 1961; GLAD SØRESEN et al., 1991). Esse sistema é composto por artérias e veias testiculares que formam o plexo pampiniforme e funciona da seguinte forma: o sangue advindo da aorta abdominal na temperatura corporal típica da espécie é transportado na artéria testicular e desce justaposta as veias do plexo pampiniforme que transportam o sangue trazido do testículo. Essa troca de calor entre artéria e veias circundantes por meio desse arranjo funciona como sistema de contracorrente para ajudar a manter a temperatura testicular mais baixa do que a temperatura corporal. Dessa forma, o sangue arterial que chega aos testículos é mais frio se comparado ao sangue arterial que chega aos demais órgãos do corpo (GLAD SØRESEN et al., 1991; SETCHELL, 1998). Ou seja, o sangue arterial passa pelo

plexo pampiniforme e perde o calor para o sangue venoso mais frio do plexo e é gradualmente resfriado a medida que se direciona ao testículo (NANAYAKKARA, 2011). Quando ocorre alguma alteração que faz com que o plexo pampiniforme se dilate, como ocorre no caso de varicocele, a estase sanguínea e refluxo do sangue “quente” de volta para as veias espermáticas internas compromete esse mecanismo e aumenta a temperatura testicular (SETCHELL, 1998).

Além disso, a espermatogênese é sensível às variações que possam ocorrer quanto ao suprimento de oxigênio e sangue e, por isso, há uma estratégia de adaptação do fluxo sanguíneo testicular que faz com que essa região se mantenha independente da variação que ocorra nos demais leitos vasculares do corpo (SETCHELL, 2006; SILVA, 2017).

3.2 Espermatogênese

Há dois compartimentos nos testículos de mamíferos caracterizados como compartimento intersticial e tubular. No primeiro estão localizados os vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, células de Leydig e macrófagos enquanto que a espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos, como descrito em camundongos por NAKATA (2019). Esse compartimento é revestido pelo epitélio seminífero e composto principalmente por células de Sertoli e germinativas. Os eventos caracterizados como espermatogênese se subdividem em fase proliferativa (ou espermatocitogênese), fase meiótica e fase de diferenciação (ou espermiogênese), tendo início no compartimento basal e indo em direção ao compartimento adluminal desses túbulos (SKINNER, 2018).

No início da fase proliferativa, a espermatogônia do tipo A assume diferentes características, podendo ser isolada, pareada ou alinhada. Quando a espermatogônia isolada se divide, produz pareadas que podem completar a citocinese a fim de produzir duas novas espermatogônias de auto-renovação ou estar conectadas por uma ponte intracitoplasmática e produzir uma corrente de quatro espermatogônias alinhadas na próxima divisão (FAYOMI et al., 2018). Elas são encontradas no compartimento basal e sofrem divisões mitóticas espécie dependente, criando mais células diplóides pareadas até passar por processos de diferenciação e tornarem-se espermatogônia do tipo A1-A4, intermediária e tipo B,

no caso dos camundongos (NAKATA, 2019). As células tipo B se dividem por mitose para formar os espermatócitos primários em pré-leptóteno (HESS; FRANÇA, 2008).

A Meiose I, com objetivo reducional, torna o espermatócito primário, antes diplóide, em espermatócito secundário, agora haplóide. Essa etapa possui subfases como descrito a seguir: Prófase I: Leptóteno, Zigóteno, Paquíteno (fase que ocorre o crossing-over), Diplóteno e Diacinese; Metáfase I, Anáfase I e Telófase I. Ao final da primeira meiose são formados os espermatócitos secundários que sofrerão a segunda divisão meiótica equacional para tornarem-se espermátides arredondadas (HESS; FRANÇA, 2008).

Durante o processo de diferenciação, também conhecido como espermiogênese, as espermátides sofrem o processo de compactação de DNA que consiste na substituição de histonas pelas protaminas, estabilizando e protegendo o núcleo do espermatozoide e adquirem a cauda antes de serem espermiados, ou seja, liberadas no lúmen do túbulo seminífero (FAYOMI et al., 2018). Nos camundongos, modelo experimental muito estudado, todo esse processo leva em torno de 35 dias, contabilizados em quatro ciclos do epitélio com 12 estágios.

Apesar da maior parte desse processo ocorrer no compartimento adluminal, há influência direta das células de Leydig localizadas no interstício e que produzem a testosterona, hormônio com papel crucial na manutenção da espermatogênese. Por sua complexidade, uma série de defeitos podem ocorrer naturalmente durante qualquer momento da espermatogênese. O processo também pode ser interrompido completamente ou parcialmente com a ocorrência de estresse oxidativo, falha na termorregulação escrotal, desequilíbrio hormonal ou nutricional, efeitos adversos de drogas ou até mesmo radiação (FRANCA, 2009; HAMILTON, 2014; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015; HESS; SKINNER, 2018).

3.3 Alterações Testiculares Causadas por Estresse Térmico por Calor

3.3.1 Fatores que causam estresse térmico

Sabemos que qualquer fator que interfira nos mecanismos termorregulatórios, vasculares ou não, ou condições externas que não permitam que o indivíduo

mantenha a temperatura escrotal fisiológica e característica para a espécie, compromete a temperatura testicular (AMANN, 2011; SILVA, 2017).

Diversos fatores comportamentais causam estresse térmico e podem comprometer a temperatura testicular nos mamíferos (DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015). Nos humanos, ficar sentado por muito tempo associado ao sedentarismo, muito tempo de trabalho em atividades passivas, sentar em lugares aquecidos (BUJAN et al., 2000; HJOLLUND et al., 2002; SONG; SEO, 2006; JUNG et al., 2008), usar roupas que impedem boa ventilação (ZORGNIOTTI et al., 1982; MIEUSSET et al., 2006), banho quente e sauna (SHEFI et al., 2007), uso de laptop sobre a região inguinal por longas horas (SHEYNKIN et al., 2005) já foram descritos como fatores comportamentais com potencial de acarretar estresse térmico testicular, impactando negativamente na qualidade espermática. Outro fator que compromete os mecanismos de termorregulação testicular é a obesidade (IVELL, 2007).

O aumento da temperatura ambiental (JØRGENSEN et al., 2001) e contato com substâncias radioativas são fatores externos que podem gerar o estresse térmico, aumento da temperatura testicular e conseqüentemente problemas de fertilidade (KUMAR et al., 2003).

Dentre os fatores clínicos ou internos é possível citar o criptorquidismo (BEDFORD, 1991; TOPPARI et al., 2014), a varicocele (SETCHELL, 1998; SHIRAIISHI et al., 2012) e os episódios febris (BLANCHARD et al., 1996; CARLSEN et al., 2003; BALL, 2008) como alterações que comprometem os mecanismos de termorregulação testicular, responsáveis pelo aumento da temperatura intratesticular de modo a comprometer a espermatogênese.

A severidade do dano aos espermatozoides depende da intensidade, frequência e duração da exposição ao calor (COLLINS; LACY, 1969; PAUL et al., 2009).

3.3.2 Efeitos do estresse térmico no testículo, espermatozoides e células germinativas

Os efeitos do pós-estresse térmico no testículo são dependentes da extensão e duração, sendo que um aumento breve e leve é capaz de causar apenas uma

redução temporária na qualidade espermática. O aquecimento mais prolongado pode causar infertilidade, e numa situação mais grave e crônica é capaz de cessar a espermatogênese permanentemente (DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

Após o insulto, o testículo sofre alteração no peso, na arquitetura histológica, na atividade bioquímica e endócrina, ocorrendo a redução da viabilidade espermática quanto a concentração, motilidade e qualidade. Além disso, há aumento de anormalidades espermáticas e apoptose de espermatozoides, comprometendo a capacidade de fertilização e a qualidade dos embriões gerados (HOOD; PARKER, 2004; SCHUPPE, 2007; EBEID, 2012; JUNG et al., 2008; MCDANIEL et al., 2004; WECHALEKAR et al., 2010; SILVA, 2017).

Na histologia observa-se vacuolização de células germinativas, aumento do tecido conjuntivo intersticial, diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, discreta hiperplasia das células intersticiais de Leydig, que indica redução da fluidez e ruptura de membranas lipídicas, tumefação celular e núcleos picnóticos (TURNER; LYSIAK, 2008; YAO et al., 2016; SILVA, 2017). Entre as células germinativas, as mais vulneráveis ao calor são os espermatócitos, nos estágios de paquíteno e diplóteno, e as espermátides arredondadas em estágios iniciais (KANDEEL; SWERDLOFF, 1988; LUE et al., 1999; MUNKELWITZ; GILBERT, 1998; CARLSEN et al., 2003; HARI PRIYA; REDDY, 2012). As células da linhagem espermatogênica mais termo tolerantes são as espermatogônias, o que pode garantir a produção gamética enquanto ocorre a recuperação do epitélio seminífero no tempo do ciclo espermatogênico (TURNER, 2007). As células de Sertoli e Leydig são resistentes, sendo esta última menos afetada nos casos severos de degeneração testicular. Por esse motivo, não é comum observar alteração na concentração de hormônios após o estresse térmico (SETCHELL, 2006; YAERAM et al., 2006). Silva (2017) em experimento com garanhões observou que a concentração sérica de testosterona dos animais que foram submetidos ao estresse térmico não diferiu do grupo controle.

Fisiologicamente é observada a incapacidade de manutenção do gradiente iônico celular (TURNER; LYSIAK, 2008; YAO et al., 2016). Em ratos foi observado redução no fluido da rete testes, mas sem alterar a concentração da maioria dos componentes do fluido, como inositol, glicina ou potássio (SETCHELL; WAITES, 1972). Bioquimicamente foi observada alteração na taxa de incorporação de aminoácidos e modificação na concentração enzimática (DANNO et al., 2000;

KANTER; AKTAS, 2009).

Esses efeitos deletérios tem relação com o excesso de ROS, intensificado pela peroxidação lipídica e sistema de defesa antioxidante desintegrado (CASAO et al., 2010). Esses mecanismos deixam as células germinativas sujeitas a apoptose e autofagia (YIN et al., 1997; LUE et al., 1999; ZHANG et al., 2012), danos ao DNA devido a alteração durante o emparelhamento dos dois cromossomas e quebras de fita (YIN et al., 1997), e mais geração de ROS (AHOTUPA; HUHTANIEMI, 1992; PELTOLA et al., 1995; IKEDA et al., 1999)

Devido a esses efeitos deletérios, a supressão da espermatogênese pôde ser observada em estudos com ratos (GUO et al., 2007), camundongos, macacos (ZHANG et al., 2006), carneiros (ALVES et al., 2016), equinos (SILVA, 2017) e humanos (RAO et al., 2015).

3.3.3 Efeitos do estresse térmico no epidídimo

O epidídimo é um órgão que possui três seguimentos denominados cabeça, corpo e cauda e é responsável pela maturação espermática, com cada segmento possuindo funções específicas sobre o espermatozoide, incluindo a compactação da cromatina que é realizada pelo aumento das pontes de dissulfeto e pontes de zinco entre as já instaladas protaminas. A cabeça é responsável pela absorção de líquidos advindos do túbulo seminífero e essa porção, junto ao segmento denominado corpo do epidídimo, possuem função de fornecer capacidade de motilidade progressiva ao espermatozoide, identificação e fertilização do ovócito. O último segmento, a cauda, é responsável por armazenar os espermatozoides e eliminar as células patológicas (SERRE; ROBAIRE, 1998; CORNWALL, 2018).

Se expostos ao estresse térmico, há alta possibilidade de comprometer a funcionalidade desses segmentos epididimários, fazendo com que os espermatozoides sejam afetados resultando na queda da capacidade de se ligar a zona pelúcida e menor capacidade de penetração no oócito (YAERAM et al., 2006). Esse aumento da temperatura compromete a integridade do DNA porque altera os níveis de oxigênio, água e transporte iônico, síntese e secreção proteica e modifica a estrutura celular do epitélio epididimário, como também induz quebras de fita de DNA e isso claramente reflete na fertilidade e prolificidade (BANKS et al., 2005;

PÉREZ-CRESPO et al., 2006).

O efeito do estresse térmico epididimário é negativo na qualidade do sêmen e para o desenvolvimento embrionário (JANNES et al., 1998; PAUL et al., 2008), já que acarreta danos ao DNA, deixa as células mais susceptíveis à apoptose, resulta em espermatozoides com baixa capacidade fertilizante in vivo e in vitro e pode acarretar o desenvolvimento embrionário anormal e morte embrionária (YIN et al., 1997; PÉREZ-CRESPO et al., 2006; YAERAM et al., 2006).

3.3.4 Hipóxia e apoptose

Há uma teoria de que o estresse térmico aumenta o metabolismo testicular, porém não há aumento de fluxo sanguíneo o suficiente para suprir essa necessidade de oxigenação, sugerindo ocorrência de hipóxia (GALIL; SETCHELL, 1988; SETCHELL, 1998).

A hipóxia ocorre quando a tensão por oxigênio fica abaixo do exigido para funcionamento normal celular em um tecido em particular. Isso ocorre em resposta ao fluxo inadequado de sangue dentro do tecido ou capacidade de transporte de oxigênio reduzida (HÖCKEL; VAUPEL, 2001). Isso ocasiona na parada do ciclo celular e leva à apoptose (CARMELIET et al., 1998; IIDA et al., 2002). Esse evento é ativado pelo Fator de Indução de Hipóxia (HIF – Hypoxia-inducible factor) o qual dimeriza proteínas de sua composição sob condições de hipóxia, entre elas a HIF1A (WANG; SEMENZA, 1995). Essa proteína vai se translocar do citoplasma para o núcleo, onde vai se ligar a elementos de resposta específicos em genes alvo envolvidos na vasodilatação, angiogênese e glicólise (SHWEIKI et al., 1992; WENGER, 2002), visando conter a hipóxia (FIRTH et al., 1995; FORSYTHE et al., 1996). Apesar desses mecanismos para conter a hipóxia, ainda ocorre morte de células germinativas (PAUL et al., 2009).

No entanto, ao buscar entender a relação entre o estresse térmico e a hipóxia no comprometimento testicular, Kastelic et al. (2019) fizeram um experimento em que os ratos submetidos ao estresse térmico em ambiente com elevada saturação de oxigênio não foram beneficiados ao tentar conter as lesões degenerativas testiculares e deterioração do sêmen comparado aos ratos em normóxia ou hipóxia. Sendo assim, as lesões testiculares promovidas em condições de aumento de

temperatura ambiental ou local se devem mais à hipertermia do que à hipóxia testicular em si.

Na falha da contenção ao dano, este evolui para apoptose da célula germinativa que é, também, influenciada pela extensão e duração do insulto (KIM; PARK; RHEE, 2013). A apoptose, mesmo que ocorra fisiologicamente, possui duas vias de ativação: via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). Estas vias 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; MARTINOU, 2000; HENGARTNER, 2000). 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 caspase 3, 6 e 7 (GOTTLIEB et al., 2000; HIKIM et al., 2003; KIM; PARK; RHEE, 2013). O mecanismo de apoptose nas 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 (VERA et al., 2004; LIU, 2010). 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; GOTTLIEB et al., 2000).

As células germinativas que sofrem apoptose após o estresse térmico ativam eventos moleculares por causa da fragmentação de DNA, que incluem Proteína X associada a Bcl-2 (Bax) pro-apoptótica e fatores anti-apoptóticos como Células B2 Leucemia/Linfoma (Bcl-2), citocromo C, caspases e outros que são ativados por fatores de aumento de calor (KIM; PARK; RHEE, 2013). A caspase-ativada DNase (CAD) é quem vai mediar a apoptose e vai ser modulada pelo seu inibidor (ICAD), o qual inibe o indutor CAD para degradação de DNA (ENARI et al., 1998). Acredita-se que a caspase 3 faça clivagem do ICAD para inativar seu efeito inibitório no CAD, assim induzindo fragmentação de DNA em um dos estágios finais da apoptose (SAKAHIRA et al., 1998).

3.3.5 Atividade de HSP (Proteína de Choque Térmico)

Para reagir ao choque térmico existem proteínas específicas atuantes denominadas HSP (“Heat Shock Protein”) (WIDLAK et al., 2007) categorizadas em dois tipos: constitutiva e induzível. Sob circunstâncias normais, as HSPs constitutiva são acompanhantes moleculares que garantem que os polipeptídios sejam agregados e transportados corretamente. Eles também contribuem para outros processos celulares, como estabilização das proteínas em suas formas inativas e inibindo a degradação (NEUER et al., 2000).

Por outro lado, como parte de um mecanismo protetor, as células respondem ao estresse por calor mantendo a síntese da maioria das proteínas e desviando todos os recursos disponíveis para produzir HSP induzível (NEUER et al., 2000; PEI et al., 2012) e assim manter a homeostase.

Assim como os efeitos causados pelo estresse térmico, a indução dessas proteínas é dependente da intensidade e duração da exposição ao calor. Quanto maior a temperatura e mais longa a exposição, maior a quantidade de HSP produzida para proteger a célula, desenvolvendo papel essencial para que os espermatócitos se desenvolvam em espermatozoides maduros e saudáveis (LÉGARÉ et al., 2004). Para que sua produção seja ativada é necessário que o gene Hsf1 inicie a produção da proteína Hsf1 (Fator de Choque Térmico 1) intracelular para que então haja a ativação das HSPs para impedir que as células se danifiquem

por desnaturação e desdobramento incorreto e, concomitantemente, ativem vias apoptóticas quando há extenso dano para assegurar produção de células germinativas viáveis (NEUER et al., 2000; ROCKETT et al., 2001; IZU et al., 2004; WIDLAK et al., 2007).

Vários outros fatores também auxiliam na proteção contra o estresse térmico, incluindo aumento da expressão de fatores antioxidantes como a Hmox (Heme oxigenase 1), GPx1 (Glutathione Peroxidase 1) e GSTA (Glutathione S-Transferase Alfa) (PAUL et al., 2009) para proteger contra as ROS.

3.3.6 Outros efeitos do estresse térmico

Em ratos, HOU et al. (2015) percebeu que o estresse térmico ambiental afetou tanto as vias do metabolismo energético como o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HOU et al., 2015). Com isso, o desequilíbrio hormonal caracterizado pela desregulação gênica e proteica STAR (Proteína Reguladora Aguda Esteroidogênica – “Steroidogenic Acute Regulatory Protein”), reduzindo a atividade enzimática, alterou criticamente a esteroidogênese, causando queda na produção de testosterona (BOZKAYA et al., 2017).

A autofagia, processo pelo qual as células danificadas são fagocitadas por vesículas, degradadas por lisossomos e os restos de componentes celulares são reciclados para geração de energia e manutenção do ambiente é outro efeito causado pelo estresse térmico (ZHANG et al., 2012).

A degeneração mitocondrial e dilatação do retículo endoplasmático liso também são características encontradas após a exposição ao estresse térmico (KANTER et al., 2013).

3.4 Estresse Oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A alteração na termorregulação testicular acaba por causar um estresse oxidativo pelo aumento da produção de ROS e/ou diminuição das defesas celulares antioxidantes, causando desequilíbrio na homeostasia celular (SIES, 2015).

Os radicais livres ou espécies reativas ao oxigênio (ROS) têm origem no

metabolismo aeróbico ou são decorrentes da hipóxia (associado também ao eixo apoptótico). São altamente reativos devido a presença de um ou mais elétrons desemparelhados, sendo esses: o radical hidroxila (-OH), ânion superóxido ($-O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (BIRBEN et al., 2012; CHANDRASEKARAN et al., 2015; IDELCHIK; MELENDEZ, 2017).

Quando a produção de ROS ultrapassa a capacidade antioxidante celular fisiológica, os efeitos deletérios são consequência desse estresse oxidativo, resultando em oxidação lipídica, proteica, de carboidratos e nucleotídeos, com dano ao DNA espermático e até alterações na motilidade espermática (HAMMADEH et al., 2008; BIRBEN et al., 2012; AGARWAL et al., 2014). Além desses sinais, a presença de leucócitos no sêmen associada à alta porcentagem de espermatozoides morfologicamente anormais são indicativos de alterações por estresse oxidativo (AZIZ et al., 2004).

As ROS não são prejudiciais em sua essência. Em níveis fisiológicos, são importantes para eventos intracelulares que resultam na fertilização do oócito (LEWIS; AITKEN, 2005), capacitação espermática, reação acrossomal e hiperativação (LAMIRANDE et al., 1997). É possível encontrar vias que formam ROS após a ejaculação, pois vai agir na cascata de eventos que envolvem a capacitação e seu alto consumo energético, cujos ATPs são gerados através de fosforilação oxidativa (MARTIN-HIDALGO et al., 2019). A fosforilação é a via mais eficiente de produção energética espermática quando comparada a glicólise e ambas ocorrem na mitocôndria espermática, sendo a fosforilação oxidativa não apenas a maior fonte de energia como também de ROS (DU PLESSIS et al., 2015; KOPPERS et al., 2008).

Apesar de contribuir para fornecimento de ROS, a mitocôndria também é gravemente afetada quando há excesso desses radicais livres, sofrendo colapso potencial de sua membrana interna e aumento da permeabilidade, resultando em ruptura e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (GUPTA, 2003; HAMMADEH et al., 2008).

Diversos fatores podem ser gatilhos para níveis não fisiológicos de ROS, como os hábitos comportamentais (consumo de álcool, cigarro, exposição a tóxicos) ou patologias como obesidade, varicocele, estresse e envelhecimento. Estes fatores vem sendo associados ao aumento de produção de ROS no plasma seminal, que

consequentemente prejudicam a fertilidade masculina dos mamíferos (KUMAR; SINGH, 2018).

3.5 Peroxidação Lipídica

A membrana plasmática espermática é composta por ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), responsáveis por manter a fluidez necessária para a fusão de membranas e permitir a fertilização. Isso torna os espermatozoides susceptíveis a sofrer peroxidação lipídica (ALVAREZ; STOREY, 1995). Esse fenômeno ocorre a partir de um radical livre de oxigênio com duas reações que, em resumo faz com que esse radical se incorpore a esses ácidos graxos da membrana, danificando a estrutura, prejudicando as trocas metabólicas e, em casos mais severos, levando à morte celular (SRIVASTAVA et al., 2014). A primeira reação, conhecida como Haber-Weiss, inicia quando o íon de ferro (Fe^{3+}) junto ao radical superóxido ($-\text{O}_2^-$) passa por uma redução gerando íon ferroso (Fe^{2+}) e O_2 , dando início a segunda reação (reação de Fenton), o qual esse Fe^{2+} vai reagir com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando Fe^{3+} e dois radicais hidroxila (OH^\cdot) (MARTIN-HIDALGO et al., 2019). Essas reações em cascata que geram produtos secundários como Malonaldeído (MDA), propranolol, hexanol e 4-hidroxinonenal (4-HNE) altamente reativos que atacam as PUFAs mais próximas, dando continuidade aos danos da membrana. Esses produtos também são usados como biomarcadores de estresse por peroxidação lipídica (OZBAL et al., 2012; AYALA et al., 2014). A catalase (CAT) é o antioxidante enzimático capaz de regular esses danos (LUZ et al., 2012; CARVALHO et al., 2014).

3.6 Mecanismos Antioxidantes

O que determina um antioxidante é sua ação inibitória de oxidação dos mais diversos substratos, como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; VANNUCCHI et al., 1998) com o objetivo de proteger sistemas biológicos da toxicidade dos radicais livres e inclui moléculas tanto endógenas como exógenas (LIGUORI et al., 2018). Os critérios que categorizam seu potencial são: i)

especificidade de extinção de radical livre; ii) atividade quelante de metal; iii) interação com outros antioxidantes; iv) concentração no compartimento intracelular e fluido extracelular; v) indução de proteínas implicadas na proteção antioxidante (ROCHETTE et al., 2013).

Antioxidantes endógenos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos e estão presentes no plasma seminal, epidídimos e testículos. As enzimas antioxidantes primárias são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx). Como mencionado acima, o oxigênio é convertido pelo SOD em H_2O_2 , o qual é decomposto em água e oxigênio pela catalase (CAT), prevenindo a produção de radicais hidroxila. Adicionalmente, GPx converte peróxido e radicais hidroxila em formas não tóxicas através da oxidação da glutathione reduzida (GSH) em glutathione (na forma dissulfeto) e então reduzida em GSH pela glutathione reductase (GR). Outras enzimas antioxidantes são glutathione-S-transferase (GST) e glucose-6-fosfato-desidrogenase (BIRBEN et al., 2012). Antioxidantes exógenos e não enzimáticos incluem ácido ascórbico (vitamina C), que expulsam hidroxila e superóxido radical ânion, alfa-tocoferol (vitamina E), o qual está envolvido contra a peroxidação lipídica das membranas celulares e antioxidantes fenólicos, que incluem derivados como resveratrol, ácidos fenóis, e flavonoides, óleo de lecitina, selênio, zinco, e fármacos como acetilcisteína (PISOSCHI; POP, 2015).

Para a saúde reprodutiva do macho, a homeostase das ROS é fundamental para manter seu potencial porque mediam funções importantes como capacitação, reação acrossomal, dentre outras, sem comprometer a qualidade espermática e sua capacidade fertilizante (MARTIN-HIDALGO et al., 2019). Nesse caso, o SOD vai agir convertendo um ânion superóxido ($-O_2$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), prevenindo a formação de radical hidroxila que é um indutor de peroxidação lipídica. No entanto, o H_2O_2 gerado é um forte oxidante de membrana que é rapidamente eliminado pelas atividades da CAT ou GPx, devolvendo H_2O como produto. Finalmente, o plasma seminal também contém componentes antioxidantes não enzimáticos como vitamina E, ácido ascórbico, piruvato, urato, taurina e hipotaurina (SALEH; AGARWAL, 2002).

Ao contrário dos fluidos do plasma seminal, do epidídimo e do testículo, os espermatozoides possuem baixa capacidade antioxidante porque, durante a espermiogênese, perdem quase completamente o citoplasma sendo o maior espaço

intracelular ocupado pelo DNA (O'FLAHERTY, 2018).

3.7 Agentes Antioxidantes na Prevenção da Degeneração Testicular

Em várias espécies buscam-se terapias com antioxidantes para reduzir o impacto de ROS nas células (MARTIN-HIDALGO et al., 2019; PEÑA et al., 2019), tendo sua eficácia estudada em diferentes órgãos, incluindo os testículos (COCUZZA et al., 2007). Sendo assim, os agentes antioxidantes têm sido sugeridos e aplicados com abordagens terapêuticas e preventivas para superar falhas reprodutivas induzidas pelo estresse oxidativo (MOHASSEB et al., 2011; AGUIRRE-ARIAS et al., 2017; BISHT et al., 2017). Dentro dessa variedade, temos vitaminas, flavonoides, carnitina, minerais como zinco e selênio, melatonina, entre outros.

Altamente relevante dentre as vitaminas, a vitamina E possui atividade protetora contra as ROS e possui efeitos positivos nas funções espermáticas como concentração e motilidade. Quando combinou vários componentes antioxidantes (Vitamina C, E, carnitina, ácido fólico, licopeno, selênio e zinco) em camundongos que sofreram choque térmico escrotal, observou-se reversão de oxidação do DNA espermático induzido pelo choque térmico e maior proteção nos túbulos seminíferos, além do dobro de taxa de fertilização, amenizando na reabsorção fetal (GHARAGOZLOO et al., 2016).

Já foi observado que a vitamina A é necessária para conter a degeneração testicular. Identificada sua deficiência, é preciso suplementá-la na dieta (CHIHARA et al., 2013). Seus benefícios já foram observados inclusive em espécies reprodução sazonal de fotoperíodo negativo, tendo sido capaz de reduzir efeitos deletérios sazonais nos ovinos, por exemplo (ABDULKAREEM et al., 2005).

Por ser naturalmente sintetizada no organismo, a carnitina costuma ser encontrada no plasma seminal. Sua forma bioativa é a L-carnitina que age na β -oxidação mitocondrial, transportando ácidos graxos de cadeia longa para a mitocôndria para que essa forneça energia para os espermatozoides no processo espermatogênico, durante e ao fim da maturação (JEULIN; LEWIN, 1996; KERNER; HOPPEL, 1998; AGARWAL; SAID, 2004).

A capacidade antioxidante da quercetina já foi testada no combate aos danos

testiculares induzidos por cádmio, por manganês, nanopartículas de dióxido de titânio e isquemia por torção induzida em roedores (KANTER et al., 2016; ADEDARA et al., 2017; CHI et al., 2017; KHORSANDI et al., 2017). O uso desse flavonoide antioxidante gerou melhora na qualidade espermática e na histologia testicular em conjunto ao aumento de concentração de testosterona, redução na apoptose das células germinativas e supressão do estresse oxidativo testicular.

O uso de pentoxifilina também mostrou-se capaz de reduzir os parâmetros negativos no sêmen de garanhões, no entanto não demonstrou ser eficaz como preventivo (SILVA, 2017).

O zinco é um cofator metaloproteína para transcrição de DNA e síntese de proteína e, além disso, é necessário para manutenção da espermatogênese e ótima funcionalidade do testículo, próstata e epidídimo e também com propriedades antioxidantes que previnem a LPO (ZAGO; OTEIZA, 2001; FALLAH et al., 2018).

Os demais antioxidantes testados que demonstraram capacidade de recuperar a fertilidade com resultados parcialmente positivos foram o ácido elágico associado a beta-caroteno que agiu como um bom protetor testicular em ratos que sofreram o choque térmico (YON et al., 2019).

3.8 Degeneração Testicular

Devido ao fato do epitélio seminífero ser extremamente sensível às adversidades externas e internas (AMANN, 1981; GALIL; SETCHELL, 1988), a degeneração testicular está diretamente ligada às alterações na termorregulação testicular (MOULE; WAITES, 1963; ALVARENGA; PAPA, 2009; HANSEN, 2009).

O processo degenerativo do parênquima testicular é um conjunto altamente frequente de alterações que podem ocorrer com a elevação de temperatura e causam disfunções bioquímicas e na estrutura da célula da linhagem germinativa, tornando o tecido menos funcional. Por possuir causas multifatoriais, é descrita nos mamíferos em geral, sendo a principal causa de redução da fertilidade nos machos, produção anormal de gametas e queda de qualidade espermática (TURNER, 2007; CELEGHINI et al., 2017; GARCIA, 2017). Por isso, existe muito interesse econômico para evitar perda de genética valiosa (TURNER, 2007).

3.8.1 Etiologia

Pode ter origem adquirida ou idiopática (TURNER, 2007; BIRCH, 2008). Dentre os fatores que alteram a termorregulação e podem ocasionar processos degenerativos estão: o aumento da temperatura ambiental, criptorquidismo, hérnia inguino-escrotal, exposição a toxinas, distúrbios endócrinos, dermatites escrotais, hidrocele e hematocele, deficiências nutricionais, inflamações ou traumas testiculares, lesões vasculares, infecções (como babesiose e outras patologias que acarretam picos febris), fármacos e anabolizantes (SETCHELL, 1998; TURNER, 2007; EDWARDS, 2008; ALVARENGA; PAPA, 2009; HANSEN, 2009; SILVA, 2017;).

Sendo assim, a degeneração testicular em si é uma afecção que ocorre posteriormente a uma alteração que prejudique a termorregulação da gônada masculina (EDWARDS, 2008). No caso, o aumento da temperatura gera aumento do metabolismo celular, porém sem aumento significativo da vascularização testicular, levando a hipóxia e estresse oxidativo e resultando em morte tecidual, fragmentação de DNA e apoptose celular (SETCHELL, 1998; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009; PAUL et al., 2009). Em bovinos e equinos, por exemplo, apenas algumas horas de alteração na termorregulação já são suficientes para comprometer a espermatogênese e levar a degeneração testicular, hipóxia e consequente morte tecidual (ALVARENGA; PAPA, 2009).

Esse tipo de lesão é dependente da intensidade e duração da exposição a injúria, podendo ser classificada como leve ou discreta, moderada e grave ou severa (BICUDO et al., 2007) ou em relação a sua localização, sendo categorizada como bilaterais (insultos sistêmicos, como febre, estresse térmico, exposição a toxinas e administração de anabolizantes) ou unilaterais (insulto local como trauma, infecção ou neoplasia); ou ainda como temporária ou permanente (SILVA, 2017; TURNER, 2007).

A gravidade e extensão da degeneração testicular são determinadas pelo tempo de duração e severidade do insulto e, tratando-se sua origem, cessa-se a progressão da degeneração testicular. Assim sendo, se foi brevemente afetado, o parênquima testicular tende a se recuperar completamente, enquanto, quanto maior

a intensidade, há possibilidade de não ser completamente recuperado (TURNER, 2007). Tratando-se a causa da degeneração, há grande possibilidade de que as espermatogônias-tronco, células de Sertoli e Leydig, que são mais termorresistentes, trabalhem para o retorno da homeostase testicular e repovoamento da população de células da linhagem espermática (HANSEN, 2009; SILVA, 2017).

Quando ocorre o insulto, os espermátócitos são as células que mais são afetadas por serem mais sensíveis, seguido dos espermátócitos e espermatogônias (SETCHELL, 2006; PÉREZ-CRESPO et al., 2008;). Também é descrito a desestruturação da barreira hemato-testicular (MRUK; CHENG, 2004) e mudanças na função endócrina, com elevação das secreções de FSH e LH, enquanto os níveis de inibina tiveram queda até quase não serem detectáveis (SILVA, 2017). No entanto, as mudanças no perfil endócrino nem sempre são observadas (SETCHELL, 2006; YAERAM et al., 2006).

Há quem veja a degeneração testicular como uma oportunidade de controle reprodutivo, fazendo uso de compostos químicos que induzem sua forma crônica para provocar esterilização de bovinos não interessantes para reprodução (GARCIA, 2017).

3.8.2 Diagnóstico

O exame andrológico minucioso é importante no diagnóstico da degeneração testicular. Aspectos como histórico clínico e reprodutivo devem ser detalhados e o uso da ultrassonografia será de grande importância para o diagnóstico diferencial. A hipoplasia testicular precisará ser descartada por ser uma condição clínica que apresenta algumas semelhanças com o processo degenerativo, por isso, atenção especial deve ser dada durante o exame físico, inspeção e palpação testicular, espermograma e histologia do testículo depois da coleta do material pela técnica de aspiração por agulha fina (BLANCHARD et al., 1990; WATSON et al., 1994; TURNER; LYSIAK, 2008; SILVA, 2017). Nesse caso, a anamnese pode ser a chave pois a busca de possíveis fatores causais, como trauma testicular, doença associada com febre, administração de esteroides anabolizantes ou outras substâncias que agem afetando a gônada (SILVA, 2017) darão o direcionamento.

Durante a palpação avalia-se a consistência, tamanho (biometria testicular) e perímetro escrotal (ruminantes). O quadro clínico de degeneração aguda deixa o testículo inicialmente tumefeito e com consistência macia à palpação com seguida redução paulatina do tamanho, ficando com consistência flácida, o tamanho do perímetro escrotal diminui com a cronicidade da degeneração (SETCHELL, 2006; TURNER, 2007; CELEGHINI et al., 2017; GARCIA, 2017;). Com a progressão e cronicidade, o tecido testicular enrijesse no lugar da flacidez e os epidídimos ficam mais proeminentes e desproporcionais em relação à gônada (BLANCHARD et al., 2001). Ao exame ultrassonográfico no modo B é observado o parênquima testicular com heterogeneidade comparado ao testículo normal (AHMADI; NOAKES, 1995; BRITO et al., 2003) e a depender da evolução, observa-se pontos de calcificação representados por áreas hiperecóicas (AHMADI; NOAKES, 1995). Adicionalmente, o uso da ultrassonografia rotineira pode facilitar a identificação precoce da degeneração testicular (TURNER, 2007; SILVA, 2017).

Na análise do espermograma deverá ser observado queda na qualidade com redução na motilidade espermática, aumento das alterações morfológicas de cabeça, cauda, cabeças isoladas e gotas citoplasmáticas proximais (VOGLER et al., 1993; CELEGHINI et al., 2017).

A termografia digital por infravermelho pode ser um exame complementar não invasivo para casos agudos e que apresenta vantagens diante da biópsia a partir do momento em que não interfere temperatura escrotal, tampouco provoca estresse ao indivíduo (COULTER et al., 1988; CELEGHINI et al., 2017). Em estudo com humanos e ovinos foram detectadas diferenças significativas na temperatura superficial da bolsa testicular entre indivíduos normais e indivíduos com varicocele e distúrbios reprodutivos de causas idiopáticas (GAZVANI et al., 2000; ALVES et al., 2016).

Na avaliação histológica, a degeneração testicular se manifesta inicialmente por perda e vacuolização citoplasmática das células germinativas e à medida que o processo evolui, a perda de células germinativas se intensifica, acumulando-se na luz dos túbulos seminíferos como células gigantes, observa-se picnose nuclear, fibrose intersticial, redução do número e descamação de células germinativas, desorganização do epitélio seminífero e redução da espessura do epitélio seminífero, com mineralização e espessamento da membrana basal tubular. A

medida que evolui, há queda ou até ausência de atividade espermatogênica e, em casos mais graves, há perda de todas as células do epitélio germinativo, restando apenas células de Sertoli. Hiperplasia de células de Leydig também pode ser observada quando o quadro é agravado (HUMPHREY; LADDS, 1975; WATSON et al., 1994; BLANCHARD et al., 2001; GEHLEN et al., 2001; TURNER, 2007; EDWARDS, 2008; GARCIA, 2017).

3.8.3 Tratamento

Não há tratamento específico e comprovado para degeneração testicular a partir do momento em que é necessário reconhecer e remover a causa primária. Além disso, a depender da intensidade da agressão, podem ser necessário alguns ciclos espermatogênicos completos para se observar melhora na qualidade seminal (BLANCHARD; VARNER, 1993; TURNER, 2007; SILVA, 2017).

O que dificulta a terapia nos quadros de degeneração testicular é o diagnóstico tardio e quando o processo atinge grau moderado a grave, tendo em vista a impossibilidade de remoção do agente causal, pois este pode não estar mais presente (CELEGHINI et al., 2017).

Dessa forma, sugere-se uso de terapia de suporte com administração de antioxidantes como vitamina E e selênio (ALVARENGA; PAPA, 2009) para auxiliar no retorno da função das espermatogônias, células de Leydig e Sertoli (HSU et al., 1998). Já foi descrito o uso de pentoxifilina como alternativa para tratar degeneração testicular em equino (SILVA, 2017).

O uso de antioxidantes tem sido indicado e estudado como meio preventivo (ALVARENGA; PAPA, 2009) porque auxiliam na diminuição da peroxidação lipídica, elevam a taxa de retorno ao processo espermatogênico. Com a produção de espermatozoides normais, melhora o aspecto histológico testicular e aumentam a concentração sérica de testosterona e LH (BEHNE et al., 1996; SAKR et al., 2011; VIGUERAS-VILLASEÑOR et al., 2011). Dentre as opções que têm mostrado alguma eficácia estão o Ácido Docosaenoico (DHA) (TURNER; ZENG, 2012; MARTÍNEZ-SOTO et al., 2016), os PUFAs (STOFFEL et al., 2020), a Vitamina A (ABDULKAREEM et al., 2005), a Quercetina (ADEDARA et al., 2017), até as combinações de Vitamina C, E, carnitina, ácido fólico, licopeno, selênio e zinco

(GHARAGOZLOO et al., 2016), entre diversas outras possibilidades.

Eventualmente, a retirada do agente causador ou a administração de antioxidantes não serão suficientes para tratar a lesão, pois a recuperação depende de respostas individuais associado ao grau da lesão (ALVARENGA; PAPA, 2009).

3.9 Ácido Alfa-Lipoico

O Ácido Alfa Lipoico (ALA) é um ácido graxo cuja estrutura de cadeia curta contém duas moléculas de enxofre e é encontrado naturalmente em praticamente todas as espécies vegetais e animais, células procariontes e eucariontes (BIEWENGA et al., 1997; PACKER et al., 2001). Esse potente antioxidante apresenta características hidrossolúveis e lipossolúveis, influenciando o metabolismo celular na eliminação de resíduos tóxicos. Já foi observado auxiliando na recuperação de lesões, na quelação de metais de transição, na inibição da ativação do fator NF-kappa β devido a seu perfil anfipático, consequentemente inibindo a resposta inflamatória (MAGALHÃES, 2000; MOINI et al., 2002). Por causa dessa larga capacidade antioxidativa e anti-inflamatória tem sido usado em produtos farmacêuticos e nutracêuticos (SANTOS, 2019). Inclusive, é importante pontuar que na suplementação oral, devido a sua característica anfifílica, é amplamente distribuído por todos os compartimentos do corpo (PECORA et al., 2016).

A meia-vida plasmática do ALA é de 30 minutos quando administrado na dieta e é capaz de acumular-se em diversos tecidos, tendo uma parte substancial convertida em ácido diidrolipoico (DHHLA) pela enzima lipoamida-dehidrogenase (ROCHETTE et al., 2013). Essa biodisponibilidade pode ser prejudicada se for ingerido concomitantemente a alimentação, sendo recomendado ingerir 30 minutos antes ou duas horas após a refeição (HERMANN; GUNDERT-REMY, 1996), pois acredita-se que o ALA seja transportado pelo mesmo carreador de ácidos graxos de cadeia média no intestino e que o ácido monocarboxilato seja capaz de inibi-lo (TAKAISHI et al., 2007).

Sua farmacocinética é formada pela absorção após lipólise, metabolização no fígado e liberação na circulação sistêmica (OZBAL et al., 2012). A metabolização do ALA para seu mais potente metabólito DHHLA é dependente das enzimas contidas

nas células (JONES et al., 2002), sendo estas a di-hidrolipoamida redutase celular mitocondrial dependente de NADH e a enzima glutatona redutase citosólica dependente de NADPH no caso de células não mitocondriais, como ocorre nos eritrócitos (MOINI et al., 2002). Portanto, o efeito do ALA é crescente em células contendo mitocôndria (JONES et al., 2002), onde ele é capaz de modular os próprios processos mitocondriais envolvidos na homeostase energética (VALDECANTOS et al., 2012).

A ação do ALA nas mitocôndrias é trabalhar como cofator de complexos multienzimáticos, reagindo contra as ROS. Além disso, age protegendo as membranas ao interagir com a vitamina C e a glutatona, que tanto é capaz de reciclar a vitamina E como suprimir a morte celular (PACKER et al., 1995a; VOLOBOUEVA et al., 2005) e inibir o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) induzido pela produção de ROS (BYUN et al., 2005). O ALA possui influência sobre o fator de crescimento do nervo (NGF), induzindo a expressão do gene superóxido dismutase (SOD), que resulta em aumento do antioxidante SOD, além de aumentar a atividade da CAT e GPx (AKPINAR et al., 2008). Sua ação antioxidante é vista como promissora terapêuticamente porque ainda é capaz de reparar proteínas oxidadas e quelar metais livres (SOHAIB et al., 2018), e como preventivo de condições crônicas associadas ao estresse oxidativo, como envelhecimento, doenças cardiovasculares, diabetes e suas complicações (SKIBSKA; GORACA, 2015).

Os principais mecanismos de ação do ALA e DHL são: aumento da produção de acetilcolina ativando acetilcolinesterase, causando aumento da absorção de glicose fornecendo assim mais acetilcoenzima A para produção de acetilcolina, quelação de metais de transição inibindo assim a formação de ROS e produtos de peroxidação lipídica, induzindo a produção de enzimas envolvidas na síntese de glutatona e outras enzimas antioxidantes protetoras (PACKER et al., 1995a).

Sua fama de “antioxidante de antioxidantes” se deve ao seu baixo potencial redox e capacidade redutiva ímpar, capturando ROS e formas oxidadas de outros antioxidantes, sendo capaz de regenerá-los (BILSKA; WŁODEK, 2005; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2008; ABDALI et al., 2015) e, conseqüentemente, reduzindo a susceptibilidade plasmática à oxidação (MARANGON et al., 1999).

Essas características fazem com que o ALA tenha alto valor terapêutico em

patologias relacionadas com o estresse oxidativo e acentuada produção de ROS, como é o caso da degeneração testicular, *diabetes mellitus*, doenças neurodegenerativas, deficiência de vitamina C e E, AIDS, litíase renal, intoxicação por etanol, isquemia cerebral, acidente vascular cerebral, doença de Parkinson, inflamação cutânea, neuropatia diabética, dano por radiação, catarata, reduz a severidade da asma, varicocele através da redução do grau de danos ao DNA e melhora na qualidade espermática, entre outras inúmeras patologias e injúrias ligadas ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica (PACKER et al., 1995a; BIEWENGA et al., 1997; BILSKA; WŁODEK, 2005; GONZALEZ-PEREZ; GONZALEZ-CASTANEDA, 2006; KARAKOYUN et al., 2009; SHAYGANNIA et al., 2018).

A aplicabilidade do ALA na biotecnologia e terapêutica reprodutiva do macho vem sendo estudada e já apresentou bons resultados para atenuar a perda de células de Sertoli, melhorar a taxa de motilidade, a qualidade e a concentração espermática e, além disso, minimizar danos causados ao DNA espermático em ratos diabéticos (CORRÊA et al., 2019) e na criopreservação de sêmen caprino (IBRAHIM et al., 2008). Também foi observada redução nos danos celulares e apoptoses em casos de isquemia/reperfusão testicular em ratos com efeitos protetivos e preventivos, controlando o estresse oxidativo e aumentando a atividade de GPx, SOD e reduzindo os níveis de malonaldeído (MDA) que é importante indicador da peroxidação lipídica (OZBAL et al., 2012).

Nos espermatozoides bovinos, o ALA adicionado ao diluidor de sêmen apresentou efeito crioprotetor e melhorou a qualidade do sêmen tanto a motilidade espermática como demais características cinemáticas (OSMAN et al., 2012). Esse antioxidante também funcionou bem associado ou não ao licopeno em diluidor para criopreservação de sêmen caprino, estudo desenvolvido por Ren et al. (2018) que observaram que a associação de ALA com licopeno teve maior potencial para reduzir as ROS intracelulares e assim elevar a qualidade espermática, o que resultou no aumento das taxas de prenhez.

Quando associado ao ácido ascórbico e tocoferol, o ALA atenuou danos oxidativos testiculares induzidos pela hiperglicemia e agiu como protetor contra apoptose de células germinativas (MOHASSEB et al., 2011). Canepa et al (2018) também descreveram a combinação de nutracêuticos compostos por mio-inositol,

ALA, ácido fólico, betaína e vitaminas na melhoria dos parâmetros espermáticos em homens sub-férteis.

O estudo de Shaygannia et al. (2018) com varicocele induzida em ratos demonstrou que o ALA reduz os efeitos negativos oriundos do estresse oxidativo por agir evitando dano ao DNA espermático e conseqüentemente aumenta a qualidade espermática.

Diante desses e vários outros resultados publicados, há uma visão otimista do uso desse poderoso antioxidante para melhorar a saúde reprodutiva e ser usado como componente de diluidores seminais para maximizar o potencial reprodutivo de machos usando as biotécnicas disponíveis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelos Experimentais

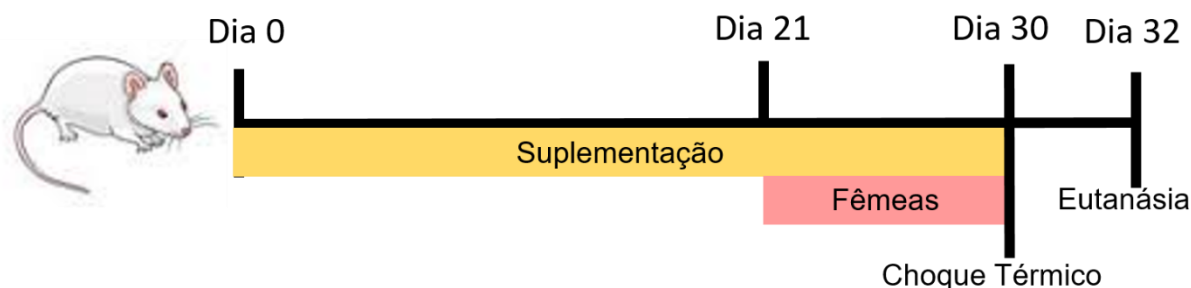
Para esse estudo foram utilizados 36 camundongos *Mus musculus*, adultos, machos com aproximadamente 60 dias de idade, da linhagem Swiss albina, com massa corpórea média de 37,83 gramas, oriundos do Laboratório de Recria, Manutenção e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (LaBio - UESC). Os camundongos foram alojados durante 35 dias em gaiolas de polipropileno com temperatura controlada a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com 12 horas de ciclo claro e 12 horas de ciclo escuro e comida e água *ad libitum* durante todo o período do experimento. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UESC sob o nº 030/19.

4.2 Delineamento Experimental

Os modelos experimentais foram separados aleatoriamente em quatro grupos: 10 camundongos submetidos ao placebo (controle positivo, CP); 10 camundongos submetidos à administração de Ácido Alfa-Lipoico (ALA) na concentração de 200mg/Kg (A2P); 10 camundongos submetidos à administração de Ácido Alfa-Lipoico na concentração de 400mg/Kg (A4P); 6 camundongos que não foram submetidos a nenhum tratamento (controle negativo, CN), sendo utilizados para atestar a qualidade e parâmetros do biotério (n total = 36). Todos os grupos, exceto o CN, foram submetidos ao choque térmico testicular, após 30 dias de tratamento.

No 22º dia, cada camundongo foi separado em caixas individuais com uma fêmea e permaneceram juntos, no mínimo, por oito dias (Figura 1) para o esgotamento das reservas epididimárias por meio do acasalamento.

Figura 1 - Linha do tempo das principais etapas do experimento



Fonte: Arquivo próprio

4.3 Ácido Alfa-Lipoico

O ALA (peso molecular 206,33 g/mol) foi encomendado em sachês contendo 900mg de pó em cada um, confeccionado pela farmácia de manipulação ViaPharma® (Itabuna, Brasil). Os sachês ficaram armazenados em geladeira na temperatura de 4-6°C até o momento do uso. Semanalmente fizemos a diluição com óleo de milho (GAD, 2009) para aplicação oral de 0,05mL de ALA (na concentração referente ao grupo) + óleo para cada 10 gramas do peso corporal do camundongo. Nesse caso, para o grupo de 200mg/Kg foram 900mg de ALA em 22,5mL de óleo de milho, enquanto que para o grupo de 400mg/Kg foi o dobro da dose do ALA no mesmo volume de óleo homogeneizados em centrífuga magnética até a completa dissolução. Posteriormente, a solução foi colocada em um recipiente dentro de uma caixa escura e retornava à geladeira até o momento de administração.

Chegado o momento da administração, o ALA era retirado da geladeira e deixado em temperatura ambiente por 30 minutos. A aplicação, via gavagem por sonda nº 4 adaptada para o experimento, foi realizada diariamente após ajuste de volume em relação ao peso corporal do indivíduo, que foi acompanhado cotidianamente por 33 dias. Após o uso, a solução restante retornava para geladeira.

4.4 Choque Térmico

Para realização do choque térmico (ch) foi aplicado 5mg/Kg de midazolam intraperitoneal e, enquanto os indivíduos entravam em plano anestésico, foi coletada a Largura Escrotal Total (LET) antes do procedimento (LETch). A cauda e testículos

dos camundongos foram imersos, individualmente, no banho-maria com temperatura controlada a 43°C durante 20 minutos, para que fosse observado os sinais vitais e comportamentais dos animais durante o procedimento. Os camundongos foram secos em compressa, postos em um ambiente aquecido por lâmpada incandescente e monitorados até apresentar normalidade no comportamento para voltar às gaiolas originais.

4.5 Eutanásia e Coleta de Material Biológico

No dia da eutanásia (eu), que ocorreu 48 horas após o insulto por choque térmico, os animais foram pesados. Vale ressaltar que já estavam separados das fêmeas e a suplementação havia sido interrompida no 30º dia. A eutanásia foi realizada com auxílio da guilhotina e cada indivíduo passou por todos os processamentos: coleta de sangue pós-decapitação por guilhotina; medida LET (LET_{eu}) com paquímetro, retirada do epidídimo direito que foi depositado em microtubo tipo Eppendorf® com 250µL de soro fisiológico pré-aquecido a 37°C para análise de sêmen; pesagem e avaliação macroscópica dos testículos, glândulas vesiculares e próstata.

Os testículos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% durante 24 horas. Por conseguinte foram transferidos para solução fixadora de álcool etílico a 70%, ficando armazenadas até o momento do processamento para histologia.

4.16 Testosterona

O sangue coletado dos camundongos durante a eutanásia foi centrifugado (Heraeus Megafuge 16R – ThermoFischer®) a 1200g durante 20 minutos a 4°C e o soro recuperado com auxílio de uma pipeta foi armazenado em microtubo no freezer a -80°C até o momento da avaliação pelo laboratório de endocrinologia da UNESP. A concentração de testosterona foi mensurada usando o Kit ImmuChem™ (Testosterona radioimunoensaio) seguindo as recomendações do fabricante.

4.6 Avaliação Biométrica Corporal e do Índice Gonadossomático dos Camundongos

O valor do peso corporal dos camundongos pesados antes da eutanásia foi utilizado para calcular o peso relativo dos órgãos retirados (testículo, glândula vesicular e próstata) através da fórmula **(1)** em que PO = peso do órgão e PC = peso corporal.

$$PR = \frac{PO}{PC} \times 100 \quad \mathbf{(1)}$$

Os dados coletados de LET antes do choque térmico e após eutanásia foram utilizados para calcular a variação da largura escrotal através da fórmula **(2)** em que LETv = variação da largura, LETeu = largura escrotal total no dia da eutanásia e LETch = largura pré-choque térmico.

$$LETv = LETeu - LETch \quad \mathbf{(2)}$$

Também foi calculado a LET relativa e sua variação final em relação ao peso individual para compreender se realmente houve algum comportamento variável dessa medida. A fórmula Índice Relativo de LET da eutanásia **(3)** em que IRLeu = Índice Relativo LET no dia da eutanásia; LETeu = largura escrotal total no dia da eutanásia; PCeu = Peso corporal no dia da eutanásia.

$$IRLeu = \frac{LETeu^2}{PCeu} \quad \mathbf{(3)}$$

Também foi calculado o Índice Relativo de LET do choque térmico **(4)** em que IRLch = Índice Relativo LET avaliado antes do choque térmico; LETch = largura escrotal total mensurada antes do choque térmico; PCch = peso corporal no dia do choque térmico.

$$IRLch = \frac{LETch^2}{PCch} \quad \mathbf{(4)}$$

O IRLv representa a variação no índice relativo de LET, calculado pela fórmula **(5)**.

$$IRLv = IRLeu - IRLch \text{ (5)}$$

Para as gônadas foi calculado o índice gonadossomático (IGS) da seguinte forma **(6)** em que PG = peso médio dos dois testículos e PC = peso corporal (LARA; FRANÇA, 2017).

$$IGS = \frac{PG}{PC} \times 100 \text{ (6)}$$

4.7 Coleta e Análises Espermáticas

O epidídimo coletado passou pelo processo de fatiamento com lâmina de bisturi em uma placa de petri de vidro sobre a mesa aquecedora a 37°C, foi lavado com solução fisiológica e realocado novamente no microtubo com 250µL de soro fisiológico a 37°C, permanecendo por 15 minutos em banho seco para garantir que os espermatozoides saíssem por capilaridade durante o período de incubação.

Depois dos 15 minutos, foram realizadas análises espermáticas, dentre essas: cinemática por meio de sistema computadorizado, concentração e morfologia espermática, integridade funcional e estrutural das membranas espermáticas e avaliação da cromatina.

4.8 Cinemática Espermática

O movimento espermático foi avaliado depois de rediluir o sêmen com mais 250µL de soro fisiológico a 37°C, permaneceu incubado em banho seco por mais 10 minutos, em seguida 3 µL da amostra foi depositada por capilaridade em Leja[®] 20 e analisada por um sistema computadorizado e os padrões utilizados do programa Sperm Class Analyser[®] (SCA - Microptics S.L, Evolution, Edição veterinária, Barcelona, Espanha) para roedor foram: 25 imagens/segundo com 25 Hz; tamanho de partícula capturado entre 5 e 70 µm/m²; espermatozoides considerados imóveis <10 µm/s, lento - médio = 15 µm/s e rápido acima de 25 µm/s. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP) expressos em porcentagem (%); Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Linear Progressiva

(VSL) e Velocidade Média do Trajeto (VAP) expressas em micrômetros por segundos ($\mu\text{m/s}$); Linearidade (LIN) e Retilinearidade (STR) expresso em porcentagem (%); Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça Espermática (ALH), expressa em micrômetros (μm).

4.9 Concentração e Morfologia Espermática

A concentração foi avaliada em câmara de Neubauer depois da fixação de 10 μL de sêmen em 190 μL da solução fisiológica formolizada e tamponada a 2,9% (taxa de diluição 1:20). A preparação da câmara e contagem dos espermatozoides foram de acordo com o recomendado pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA, 2013).

Para avaliação da morfologia espermática foi utilizada a mesma amostra fixada para concentração e os trabalhos de Takeda et al. (2016), Musa et al. (2019), Skinner et al. (2019) foram úteis para explorar as patologias esperadas em camundongo. A preparação úmida entre lâmina e lamínula seguiu as recomendações do CBRA (2013). As alterações morfológicas foram avaliadas em microscópio de contraste, no aumento de 1000x (Olympus® CX31) com uso de óleo de imersão. Ao menos 200 células foram analisadas categorizando as alterações, quando estavam presentes, pela classificação de Garcia (1971) e Rao (1971).

4.10 Teste Hiposmótico (HOST)

A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática foi realizada com a diluição de 10 μL de sêmen em 40 μL de água destilada (taxa de diluição 1:5), incubação em banho seco a 37° C por 15 minutos e leitura do percentual de reativos em lâmina sob lamínula, de acordo com a técnica de preparação úmida (CBRA, 2013). Foram avaliados 100 espermatozoides em microscópio de contraste de fase (Olympus® CX31), no aumento de 1000x, com uso de óleo de imersão. O valor de porcentagem reativa foi subtraído pela porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada/dobrada observados na morfologia.

4.11 Integridade Estrutural das Membranas

Para análise da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal foram utilizados dois fluorocromos, o Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e o Iodeto de Propídio (IP). Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi incubada em 40 µL de solução de trabalho contendo as sondas fluorescentes de acordo com o protocolo de Harrison e Vickers (1990), permaneceu por 8 minutos em temperatura ambiente até a leitura em microscopia de fluorescência (Olympus® BX51), no aumento de 400x. A coloração com CFDA foi avaliada usando o conjunto padrão de filtro de fluoresceína, enquanto a coloração com IP foi avaliada usando o conjunto padrão de filtros de rodamina. Foram analisados 100 espermatozoides, classificando-os em três categorias: íntegros (CFDA+ / IP -), lesados (CFDA - / IP+) e semi-lesados (CFDA + / IP +). Para a análise do efeito dos tratamentos apenas os espermatozoides íntegros foram considerados.

4.12 Teste de Avaliação da Cromatina

A integridade da cromatina espermática foi avaliada utilizando a técnica da metacromasia induzida pelo azul de toluidina (NAVES et al., 2004). Foram confeccionados esfregaços com uma alíquota de 10 µL da amostra, secados em temperatura ambiente e fixados por 1 min em solução de Carnoy (3:1, 75 mL de álcool 100 % + 25 mL de ácido acético) e em seguida em álcool a 70 % por 3 min. A hidrólise com ácido clorídrico 4N procedeu por 15 minutos, lavagem em água destilada e secagem em temperatura ambiente. Para a coloração do esfregaço foi depositado 10 µL da solução de azul de toluidina a 0,025 % (0,00125 g de azul de toluidina em 5 mL de solução de McIlveine, pH 4,0) entre lâmina e lamínula e avaliadas 200 células em microscopia de contraste de fase (1000x; Olympus® CX 31). Os espermatozoides foram classificados: com cromatina compacta (região da cabeça corada em azul claro) e com cromatina descompactada (região da cabeça corada em azul escuro ou violeta).

4.13 Análises Histológicas e Histomorfométricas

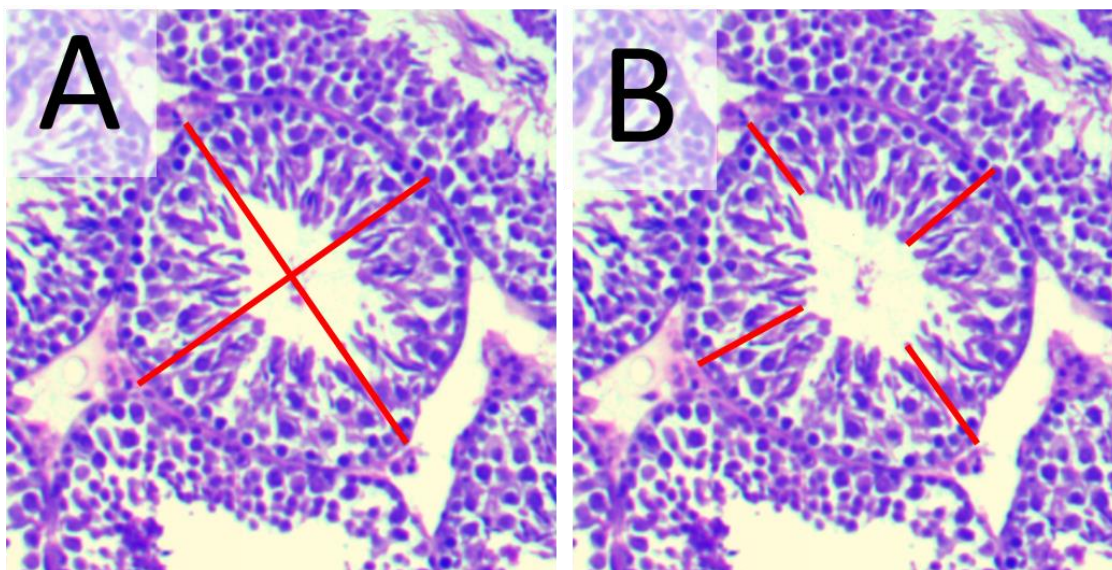
A preparação das amostras direcionadas para histologia foram separadas em uma estrutura de plástico denominada cassete e identificadas. Os cassetes, com três testículos cada, foram imersos em álcool 70% para em seguida serem imersos em álcool 80% durante duas horas. Completando esse tempo, foram transferidos para álcool 90% também por duas horas, posteriormente para álcool absoluto I durante duas horas, seguido de álcool absoluto II durante duas horas e então, xilol durante 10 minutos para o processo de clarificação. Posteriormente ficaram imersos na parafina derretida dentro da estufa por 15 minutos.

Para a etapa pré-coloração, cortes de 4 μm foram obtidos pelo micrótomo. A técnica de coloração está descrita no Anexo A.

4.14 Morfometria Testicular

Para histomorfometria foram contados 30 túbulos dos mais arredondados de cada animal em campos aleatórios. Com auxílio do programa ImageJ® foram traçadas duas linhas que cortaram os túbulos de uma extremidade até a outra para registrar a média de diâmetro tubular e quatro linhas iniciadas na extremidade do túbulo, compartimento basal, que seguiram até o final do compartimento adluminal, antes do início do compartimento luminal para obter a média de altura do epitélio tubular, conforme demonstrado na Figura 2. As medidas foram ajustadas pela escala e também foram contadas as células gigantes desses túbulos.

Figura 2 - Método de avaliação das medidas do diâmetro tubular (A) e altura do epitélio (B)



Fonte: Arquivo próprio

Foram calculadas Área Tubular (AT), Área Luminal (AL) e Área Epitelial (AE) de acordo com as fórmulas (7, 8 e 9) de Dias et al. (2019) que sofreram adaptação:

$$AR = \pi \left(\frac{\text{diâmetro tubular}}{2} \right)^2 \quad (7)$$

$$AL = \pi \left(\frac{\text{diâmetro tubular} - \text{altura do epitélio}}{2} \right)^2 \quad (8)$$

$$AE = AR - AL \quad (9)$$

A densidade volumétrica da composição do parênquima testicular foi obtida por contagem de pontos por alocação sistemática a qual foi aplicada o sistema-teste Grid Cycloid Arc no programa ImageJ® com 108 pontos de intersecção sobre a preparação histológica do testículo em aumento de 400x. Foram contabilizados 816 pontos por amostra aleatoriamente, somando um total de 20.400 pontos em todo experimento.

4.15 Histopatologia

Para estimar as proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos, foram contados 200 túbulos em campos aleatórios nas lâminas histológicas testiculares de cada animal. Foram considerados túbulos com patologias aqueles

que possuíam alterações (CARVALHO, 2009; NAKATA, 2019) que se enquadravam na descrição de JOHNSEN (1970) adaptada por DIAS et al. (2019) em 8 níveis (Tabela 1). A arquitetura histológica do parênquima testicular foi classificada em normal (nível 1) e foram agrupados de acordo com a intensidade das patologias em leve (nível 2 e 3), moderada (nível 4 e 5) e severa (nível 6, 7 e 8).

Tabela 1 – Descrição da arquitetura histológica do parênquima testicular de acordo com as alterações encontradas de acordo com o preconizado por Johnsen (1970) e adaptada por Dias et al. (2019)

Normal	Nível 1	Túbulo íntegro, com células germinativas dispostas em seu local normal com poucos vacúolos;
Leve	Nível 2	Vacúolos na base do epitélio;
	Nível 3	Vacúolos no ápice do epitélio;
Moderada	Nível 4	Vacúolos na base e ápice do epitélio;
	Nível 5	Células espermatogênicas no lúmen tubular e degeneração celular;
Severa	Nível 6	Túbulos apenas com células basais;
	Nível 7	Túbulos com células de Sertoli somente;
	Nível 8	Células de Sertoli e germinativas ausentes nos túbulos, caracterizando um estado irreversível de degeneração.

Fonte: JOHNSEN (1970) e DIAS et al. (2019)

4.17 Estatística

Os dados das análises foram inicialmente submetidos a identificação e retirada dos *outliers* através do software Tinn-R 6.01®, posteriormente submetido ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk através do software Graphpad Prism 8.0.2®. Quando identificada a distribuição paramétrica, aplicamos a ANOVA e optamos pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls. Quando observado comportamento

não paramétrico, aplicamos o teste de Kruskal-Wallis e, caso a hipótese nula fosse rejeitada, o teste de comparação múltipla de Dunn. Foi considerado o valor de $P < 0,05$.

5 RESULTADO

Os animais do grupo não tratado que não sofreram choque térmico apresentaram a maior média de peso corporal no último dia do experimento ($P < 0,05$; Tabela 2). No entanto, vale ressaltar que não foi verificada variação do peso corporal entre os grupos estudados no período experimental ($P > 0,05$; Tabela 2). No dia da eutanásia, os pesos testiculares nos grupos que sofreram choque térmico foram menores do que no grupo que não sofreu (CN; $P < 0,05$; Tabela 2). A maior variação de LET ocorreu para o grupo placebo que sofreu choque térmico (CP; $P < 0,05$; Tabela 2), indicando que houve maior aumento testicular por edema neste grupo. Por isso, os índices relativos da LET na eutanásia, no choque térmico e a variação do índice relativo de LET apresentou diferença para os tratados com ALA (CP; $P < 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação da biometria corporal, peso testicular e peso relativo de órgãos reprodutores com o peso corporal

	CN	CP	A2P	A4P	P-valor
Peso corporal (g)	48,58 ± 2,08 ^a	38,85 ± 4,46 ^b	34,68 ± 4,34 ^b	37,49 ± 3,18 ^b	0,0001
Peso testicular (g)	0,27 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,02 ^c	0,14 ± 0,02 ^d	0,18 ± 0,00 ^b	<0,0001
Variação de peso corporal (g)	NA	0,35 ± 1,46	- 0,75 ± 3,55	- 0,34 ± 5,02	0,79
Variação da LET (cm)	NA	0,39 ± 0,15 ^a	- 0,04 ± 0,10 ^b	- 0,06 ± 0,18 ^b	<0,0001
IRLeu (g/cm ²)	24,88 ± 3,42 ^b	20,47 ± 3,7 ^b	34,04 ± 5,93 ^a	30,83 ± 3,79 ^a	<0,0001
IRLch (g/cm ²)	NA	41,31 ± 10,58 ^a	32,27 ± 3,12 ^b	27,16 ± 5,88 ^b	0,0063
IRLv (g/cm ²)	NA	-20,84 ± 10,5 ^b	1,77 ± 6,84 ^a	3,68 ± 8,02 ^a	<0,0001
IGS (%)	0,53 ± 0,09 ^a	0,41 ± 0,04 ^{bc}	0,38 ± 0,05 ^c	0,47 ± 0,02 ^{ab}	0,0007
Peso relativo glândula vesicular (%)	0,53 ± 0,11	0,6 ± 0,07	0,53 ± 0,08	0,5 ± 0,07	0,1221
Peso relativo próstata (%)	0,09 ± 0,01 ^{ab}	0,09 ± 0,02 ^{ab}	0,11 ± 0,03 ^a	0,07 ± 0,02 ^b	0,049

Legenda: NA = Não Avaliado; CN – Grupo Controle Negativo; CP – Grupo Controle Positivo; A2P – Grupo ALA 200mg/Kg; A4P – Grupo ALA 400mg/Kg; LET – Largura Escrotal Total; IRLeu – Índice Relativo LET na eutanásia; IRLch – Índice Relativo LET no choque térmico; IRLv – Variação do Índice Relativo de LET; IGS – Índice Gonadossomático; Dados apresentados com a média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Números destacados em negrito indicam P-valor $< 0,05$.

O índice gonadossomático foi menor no grupo A2P quando comparado ao grupo não tratado que não sofreu choque térmico (CN; $P < 0,05$; Tabela 2). Enquanto, o peso relativo da próstata estava menor no grupo A4P comparado ao A2P ($P < 0,05$; Tabela 2).

Tabela 3 - Avaliação espermática pelo sistema Sperm Class Analyser®, avaliação de concentração por câmera de Neubauer, porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, porcentagem de integridade funcional (HOST) e estrutural (CFDA/PI) das membranas e avaliação da compactação da cromatina

	CN	CP	A2P	A4P	P-valor
Cinemática					
Espermática					
Motilidade Total (%)	31,21 ± 6,64	39,63 ± 13,04	48,82 ± 21,67	32,68 ± 19,43	0,23
Motilidade Progressiva (%)	24,14 ± 5,98	31,80 ± 12,69	38,86 ± 19,17	26,21 ± 18,78	0,34
VCL (µm/s)	95,62 ± 12,50	82,40 ± 16,94	76,86 ± 11,11	70,63 ± 15,43	0,0673
VSL (µm/s)	33,15 ± 4,54 ^a	24,23 ± 7,16 ^b	21,89 ± 3,95 ^b	17,73 ± 10,44 ^b	0,0056
VAP (µm/s)	50,46 ± 5,82	43,93 ± 9,43	41,63 ± 5,45	39,53 ± 7,64	0,1467
LIN (%)	31,69 ± 2,83	28,98 ± 2,96	27,20 ± 1,73	24,30 ± 12,03	0,1003
STR (%)	57,61 ± 4,03 ^a	49,93 ± 5,21 ^b	47,96 ± 4,91 ^b	47,67 ± 6,81 ^b	0,019
ALH (µm)	2,5 ± 0,32	2,4 ± 0,43	2,21 ± 0,28	2,09 ± 0,42	0,25
Concentração (esptz/mL) x 10 ⁶	28,5 ± 29,68	20,6 ± 14,29	36,71 ± 20,68	12,83 ± 11,65	0,16
Espermatozoides Normais (%)	42,2 ± 8,04	32,4 ± 10,53	31,17 ± 8,13	33,5 ± 1,29	0,1782
HOST (%)	47,83 ± 9,81 ^a	40,57 ± 6,65 ^{ab}	44,17 ± 5,67 ^{ab}	34,67 ± 9,22 ^b	0,054
Integridade Estrutural (CFDA+) (%)	8,5 ± 6,35	7,22 ± 6,0	7,71 ± 7,87	9,83 ± 12,42	0,99
Cromatina descompactada (%)	0,67 ± 0,26 ^b	2,22 ± 1,46 ^{ab}	2,83 ± 0,98 ^{ab}	7,33 ± 3,34 ^a	0,0008

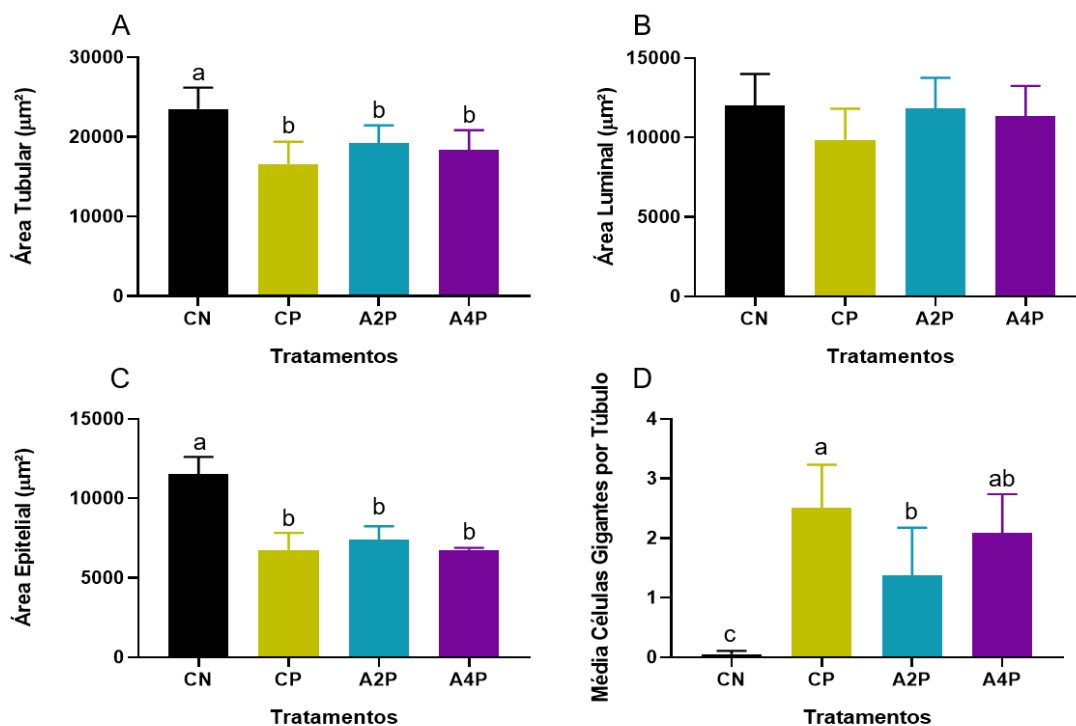
Legenda: CN – Grupo Controle Negativo; CP – Grupo Controle Positivo; A2P – Grupo ALA 200mg/Kg; A4P – Grupo ALA 400mg/Kg; VCL – Velocidade Curvilínea; VSL – Velocidade Linear Progressiva; VAP – Velocidade Média do Trajeto; LIN – Linearidade; STR – Retilinearidade; ALH – Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça Espermática; HOST – reativos ao teste de integridade funcional da membrana plasmática. CFDA+ - corados pelo diacetato de carboxifluoresceína indicando integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal. Dados apresentados com a média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Números destacados em

negrito indicam P-valor < 0,05.

Nas análises de cinemática espermática, foi possível verificar que o choque térmico (CP, A2P e A4P) acarretou redução de VSL, STR quando comparado ao controle que não sofreu choque térmico (CN; $P < 0,05$; Tabela 3). O percentual de espermatozoides com membrana funcionalmente íntegra foi superior no grupo A2P quando comparado ao A4P ($P < 0,05$; Tabela 3). O percentual de espermatozoides com DNA descompactado foi maior no grupo A4P do que no grupo que não sofreu choque térmico (CN; $P < 0,05$; Tabela 3)

A área tubular e epitelial dos túbulos seminíferos foi maior no grupo que não sofreu choque térmico (CN; $P < 0,05$; Figura 3). Enquanto que a média de células gigantes por túbulo foi significativamente menor neste grupo CN quando comparado ao tratado com ALA e o CP. Vale ressaltar que o grupo tratado A2P teve a menor média de células gigantes quando comparado ao grupo CN e CP ($P < 0,05$; Figura 3).

Figura 3 – Distribuição das áreas epiteliais entre os tratamentos



Fonte: Arquivo Próprio

Legenda: CN – Grupo Controle Negativo; CP – Grupo Controle Positivo; A2P – Grupo ALA 200mg/Kg; A4P – Grupo ALA 400mg/Kg. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

Quanto a distribuição dos elementos teciduais foi possível verificar que o percentual de túbulos seminíferos, epitélio seminífero e células de Leydig foi muito menor no grupo A2P ($P < 0,05$; Tabela 4). Além disso, o percentual de compartimentos intertubular e espaço linfático foi muito maior no grupo suplementado com A2P do que no CN, CP e A4P ($P < 0,05$, Tabela 4 e Figura 4).

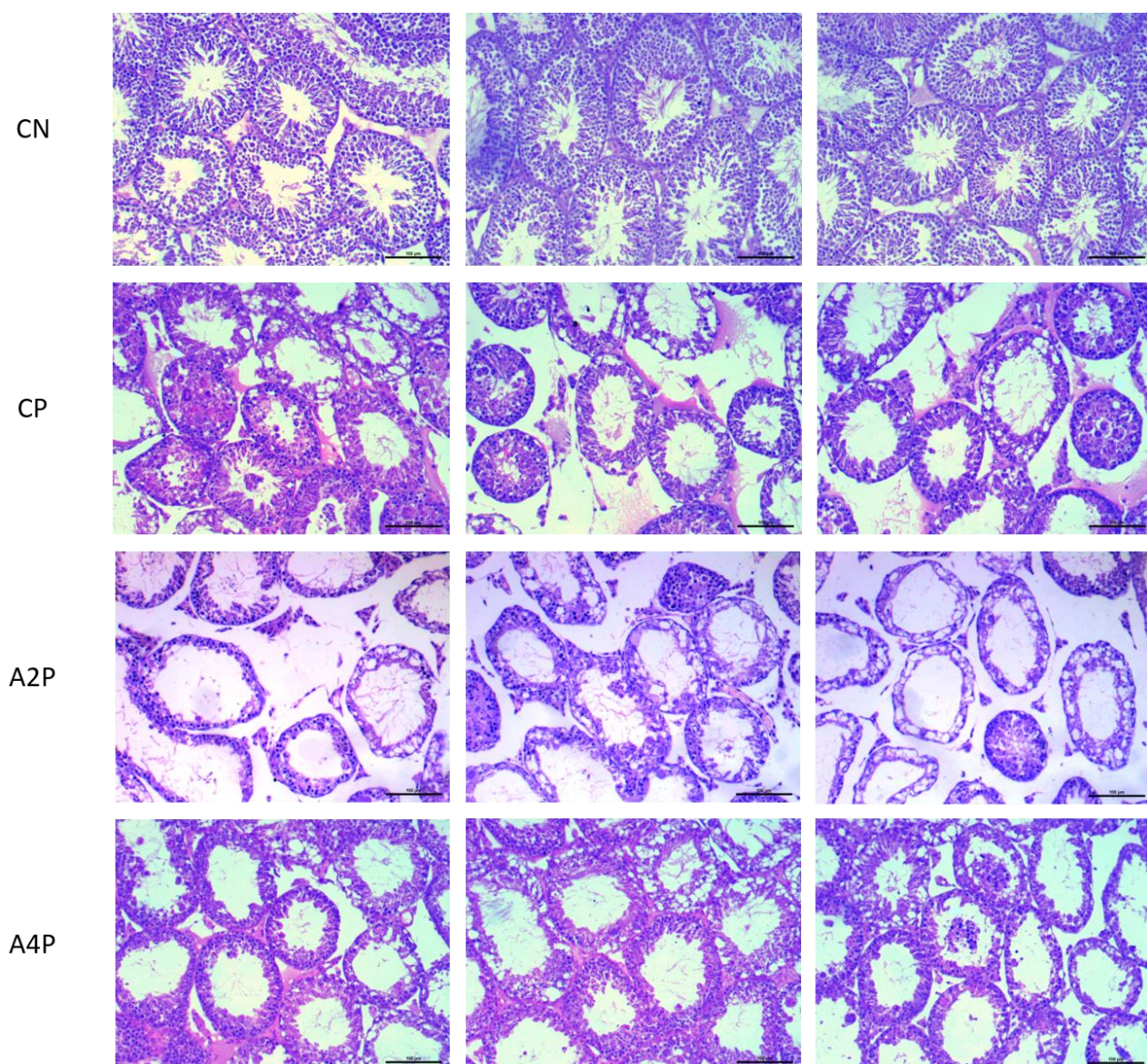
Notamos que a suplementação com 400 mg/Kg/dia de ALA foi mais eficiente em controlar a severidade das lesões tubulares ($P < 0,05$; Figura 5), pois teve resultado semelhante ao grupo CN.

Tabela 4 - Avaliação da densidade volumétrica de componentes teciduais testiculares

	CN	CP	A2P	A4P	P-valor
Túbulos Seminíferos (%)	85,48 ± 2,91 ^a	82,64 ± 4,64 ^a	59,22 ± 6,72 ^b	78,87 ± 4,49 ^a	<0,0001
Túnica Própria (%)	9,16 ± 1,19 ^a	5,39 ± 2,14 ^b	5,09 ± 1,08 ^b	4,21 ± 1,34 ^b	<0,0001
Epitélio Seminífero (%)	60,01 ± 5,94 ^a	48,74 ± 4,11 ^b	35,70 ± 4,23 ^c	46,37 ± 1,91 ^b	<0,0001
Lúmen (%)	16,31 ± 3,23 ^b	27,95 ± 3,55 ^a	18,44 ± 5,48 ^b	27,73 ± 4,17 ^a	<0,0001
Compartimento Intertubular (%)	14,46 ± 2,94 ^b	18,04 ± 3,4 ^b	40,43 ± 6,32 ^a	21,08 ± 4,48 ^b	<0,0001
Células de Leydig (%)	3,6 ± 0,89 ^a	4,18 ± 0,7 ^a	2,77 ± 0,47 ^b	3,74 ± 1,07 ^a	0,0181
Vaso Sanguíneo (%)	0,98 ± 0,51	1,24 ± 0,23	0,84 ± 0,47	1,44 ± 0,25	0,0633
Espaço Linfático (%)	6,46 ± 4,03 ^b	10,81 ± 5,33 ^b	33,86 ± 6,24 ^a	12,27 ± 4,49 ^b	<0,0001
Tecido Conectivo (%)	3,43 ± 1,84	4,82 ± 2,98	2,97 ± 1,11	3,64 ± 0,71	0,3532

Legenda: CN – Grupo Controle Negativo; CP – Grupo Controle Positivo; A2P – Grupo ALA 200mg/Kg; A4P – Grupo ALA 400mg/Kg. Dados apresentados com a média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Números destacados em vermelho indicam P-valor < 0,05.

Figura 4 – Histologia testicular, coloração H&E, aumento de 200x

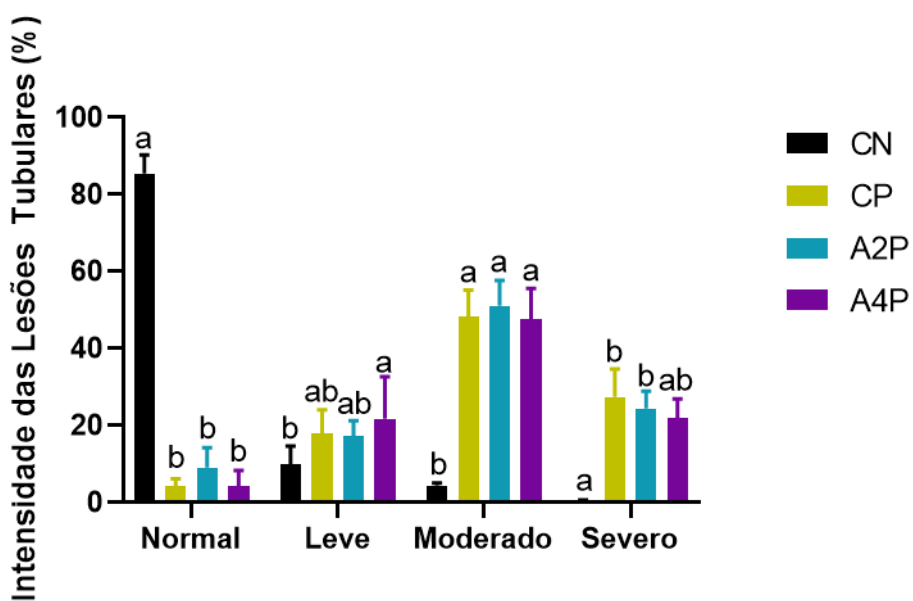


Fonte: Arquivo próprio

Legenda: CN – Grupo Controle Negativo; CP – Grupo Controle Positivo; A2P – Grupo ALA 200mg/Kg/dia; A4P – Grupo ALA 400mg/Kg/dia.

Registramos que não houve diferença significativa na concentração de testosterona sérica entre os grupos (CN= $2,14 \pm 3,0$ ng/mL, CP= $2,57 \pm ,87$ ng/mL; A2P= $0,12 \pm 0,12$ ng/mL; A4P= $1,94 \pm 1,69$ ng/mL; $P = 0,0758$).

Figura 5 - Distribuição da intensidade de lesões tubulares



Fonte: Arquivo próprio

Legenda: CN – Grupo Controle Negativo; CP – Grupo Controle Positivo; A2P – Grupo ALA 200mg/Kg/dia; A4P – Grupo ALA 400mg/Kg/dia; Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O peso corporal foi superior nos camundongos do grupo controle negativo quando comparado aos animais que passaram pelo tratamento e choque térmico. Essa diferença pode ser atribuída a situação de estresse que os animais foram submetidos e a manipulação constante e diária com administração de ALA e placebo nos grupos tratados. Vale ressaltar que os camundongos do grupo controle negativo não foram manipulados para suplementação e choque térmico. O fenômeno da perda de peso ocorreu também em relação ao peso testicular, tendo em vista que os grupos tratados tiveram peso testicular significativamente mais baixo do que o grupo controle negativo.

É importante pontuar que já foi demonstrado que o ALA atua no controle da obesidade. Contudo, devido a indicação do óleo de milho como veículo de suplementação ser de, no máximo, por 30 dias (GAD, 2009), não houve tempo suficiente para estudar o efeito deste antioxidante sobre o peso nas condições experimentais que os camundongos estavam submetidos. Fora isso, quando consumido diariamente por pelo menos 20 semanas, o ALA é capaz de promover a perda de peso em pacientes com obesidade de forma altamente significativa e com efeitos adversos leves (KOH et al., 2011). O controle da obesidade é de grande importância por estar ligada a saúde reprodutiva, já que a termorregulação fica comprometida pela deposição de gordura no cordão espermático e bolsa testicular, estando diretamente ligada na resposta inflamatória crônica que acaba por alterar a qualidade espermática (IVELL, 2007; BHATTACHARYA et al., 2020).

Os resultados de peso corporal influenciaram na variação da largura escrotal total, nos índices IRLeu, IRLch e IRLv, em que notamos diferença significativa entre os animais do grupo controle positivo e os animais tratados com ALA 200 e 400 mg. A diferença entre a LET avaliada no dia da eutanásia e antes do choque térmico foi maior nos camundongos que sofreram o choque térmico e não receberam ALA para prevenir o edema e a inflamação. A presença do edema escrotal nos animais do grupo controle positivo foi bem expressiva durante a inspeção e palpação testicular, sendo uma resposta fisiológica esperada depois de uma exposição aguda ao aumento de temperatura a 43° C (GALIL; SETCHELL, 1988; SETCHELL, 2006). O ALA tem ação anti-inflamatória (JIA et al., 2019; KHABBAZI et al., 2012; OZBAL et

al., 2012), por isso, é possível sugerir que o ALA tenha efeito preventivo benéfico no edema de bolsa testicular em caso de choque térmico agudo.

Os dados de peso corporal e peso testicular discutidos acima claramente influenciaram no Índice Gonadossomático. Nesse aspecto, os camundongos tratados com 400mg de ALA apresentaram resultado mais próximo dos animais do controle negativo, tido como parâmetro experimental, enquanto os camundongos tratados com 200 mg de ALA tiveram o menor peso testicular e IGS. Na avaliação macroscópica durante a necropsia, os testículos dos animais do grupo controle positivo e tratados com 200 mg de ALA apresentaram flacidez durante a palpação e presença de edema na bolsa testicular. Na avaliação histológica apresentaram maior espaço linfático intertubular, menor percentual de túbulos seminíferos, epitélio seminífero e células de Leydig. Isso sugere que a menor dose de ALA estudada não foi suficiente para conter a flacidez gonadal e as alterações histológicas característica de degeneração testicular (GARCIA, 2017).

Sabemos que o aumento do espaço linfático intertubular interfere na distribuição da testosterona para células germinativas (CLARK, 1976). Por isso, avaliando os animais tratados, o uso de 400 mg de ALA foi mais eficiente para controlar o edema de bolsa testicular e a arquitetura tecidual com relação aos espaços linfáticos intertubulares. Aplicações por via intraperitoneal de 100 mg/Kg de ALA já foram descritas como capaz de controlar o edema e a hemorragia em lesões de isquemia/reperfusão testicular e resultar em melhoria na aparência histológica do testículo (OZBAL et al., 2012). No entanto, o uso oral exige que a dose seja maior porque apenas 20-40% do ALA vai ser absorvido pelo plasma sanguíneo (SHAY et al., 2008, 2009).

O ALA não influenciou no peso da glândula vesicular entre os grupos experimentais, no entanto foi possível observar que o peso da próstata relativa ao peso do indivíduo foi maior no grupo tratado com 200 mg de ALA e menor no grupo tratado com 400 mg de ALA. Infelizmente, não foi possível identificar uma explicação lógica para este achado. Apesar desse efeito do ALA sobre a próstata já ter sido relatado em estudos com ratos sem os autores explorarem de forma aprofundada de que forma o ALA pode atuar sobre essa glândula sexual acessória (YENI et al., 2012)

No presente estudo, a eutanásia ocorreu 48 horas depois do choque térmico

testicular. Por essa razão, percebemos que a maioria das alterações nos parâmetros espermáticos foi nas células que estavam no ambiente epididimário. Apesar das lesões histológicas terem sido impactantes, as alterações espermáticas compatíveis com comprometimento do processo espermatogênico só seriam percebidos depois de sete dias (RIZZOTO; KASTELIC, 2020). Percebemos que o choque térmico, independente do tratamento, acarretou em redução de VSL e STR. Já foi demonstrado que o choque térmico agudo causa redução de motilidade dos espermatozoides de rato no período de um a dois dias depois do aumento agudo da temperatura intratesticular (SETCHELL, 2006). Apesar do choque térmico ter influenciado negativamente em dois parâmetros da cinemática espermática, não foi possível observar diferença no percentual de motilidade total e progressiva entre os grupos estudados corroborando com os dados apresentados por outros autores da área (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; QUEIROZ, 2010; GHARAGOZLOO et al., 2016) que não observaram modificação no padrão de motilidade até sete dias depois do choque térmico agudo.

Os dados de motilidade, VCL, VAP, LIN, ALH, concentração de espermatozoides na amostra, integridade estrutural das membranas não diferiram significativamente quando os grupos tratados e não tratados foram avaliados. No entanto, o uso de 400 mg de ALA não foi capaz de melhorar a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides coletados 48 horas depois do choque térmico. Vale ressaltar ainda que o choque térmico foi capaz de acarretar alterações no DNA e que o uso do ALA, independente da dose, não foi capaz de reverter. Já foi comprovado que o aumento da temperatura intratesticular induz quebra na fita de DNA (BANKS et al., 2005). Outros eventos desencadeados pelo aumento da temperatura são alterações nos níveis de oxigênio, água, transporte iônico, síntese e secreção proteica e, também, modificação estrutural celular do epitélio epididimário (PÉREZ-CRESPO et al., 2008), comprometendo os espermatozoides que estão passando pela maturação ou estão armazenados na cauda do epidídimo.

Ao analisar a intensidade das lesões tubulares nos testículos, foi possível perceber a preservação da arquitetura tubular foi maior nos camundongos que não sofreram choque térmico quando comparado aos que sofreram (CP, A2P e A4P). Além disso, a área tubular e a área epitelial foi maior nesse mesmo grupo conjuntamente a menor média de células gigantes. Percebemos aumento

significativo de túbulos seminíferos com lesões consideradas moderada nos camundongos que sofreram o choque térmico (CP, A2P e A4P) quando comparado aos que não sofreram (CN) (JOHNSEN, 1970; DIAS et al., 2019). Com isso, podemos afirmar que choque térmico influenciou negativamente a arquitetura do parênquima testicular como esperado (CREASY et al., 2012; KANTER, 2010), independente da suplementação com o ALA. Embora, valha ressaltar, que os camundongos tratados com 400 mg do antioxidante apresentaram redução nas alterações tubulares consideradas severas (JOHNSEN, 1970; DIAS et al., 2019). Sugerimos então que o ALA na maior dose tem potencial efeito preventivo evitando as lesões testiculares severas depois do choque térmico agudo, sendo necessário estudar se a longo prazo esse efeito poderia ser expresso de forma mais eficiente. Acreditamos que a arquitetura do parênquima testicular e outros parâmetros avaliados poderiam ter tido efeito positivo caso essas avaliações tivessem ocorrido em momentos mais distantes do choque térmico agudo como, por exemplo, sete dias pós-insulto.

Ainda sobre as alterações tubulares, a quantidade de células gigantes em menor presença no grupo tratado com 200mg de ALA e maior no grupo controle positivo demonstra que esse antioxidante possui a capacidade de controlar o surgimento dessa alteração. Após a indução ao estresse térmico, as células de Sertoli ficam comprometidas e não conseguem manter as espermátides redondas e é dessa forma que se dá a etiopatogenia das células gigantes multinucleadas. Com a persistência da lesão, seja pela insuficiência de antioxidantes ou pela insistência da fonte de lesão, as células germinativas passam a sofrer mutações durante a divisão meiótica, dentre elas a indução de síntese de DNA não programada concomitantemente a danos ocorridos nas pontes celulares (GREAVES, 2012). A partir daí existem duas vias: essas células morrem e são fagocitadas pelas células de Sertoli ou migram para o lúmen, onde serão descartadas, podendo estar presentes na ejaculação (CREASY et al., 2012). Quanto aos demais parâmetros avaliados na morfometria testicular (área tubular, área luminal, área epitelial, altura do epitélio e diâmetro tubular), os tratamentos não apresentaram diferença significativa, excetuando-se o controle negativo.

É importante salientar que a suplementação com 200 mg/kg/dia de ALA resultou em percentuais de túbulos seminíferos, de epitélio seminífero e de células

de Leydig reduzido e percentuais de compartimento intertubular e espaço linfático aumentado. Essa arquitetura histológica provavelmente impacta negativamente na comunicação entre os túbulos seminíferos, na ação das células de Leydig que controlam a espermatogênese, e na distribuição da testosterona e no movimento de moléculas advindas do plasma sanguíneo para o parênquima testicular (CLARK, 1976). Além disso, os camundongos suplementados com esta dose de ALA apresentaram a menor concentração sérica de testosterona, provavelmente, associado ao baixo percentual de células de Leydig, porém não foi encontrada diferença significativa entre os grupos estudados. No entanto, é importante ressaltar que a dosagem de testosterona foi realizada em um número menor de camundongos e isso pode ter influenciado na análise estatística.

Independentemente dos indícios do potencial preventivo da suplementação com 400 mg/kg/dia de ALA em camundongos, é importante apresentar que houve um percentual de perda de animais por morte ao longo do período experimental em torno de 40% nesse grupo e 30% no grupo de suplementação com 200mg/kg/dia de ALA. Há forte relação com a dose fornecida pois já foi relatado que os camundongos costumam ser mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do ALA quando comparados aos ratos, os quais possuem a DL50 para tratamento oral de 502mg/Kg de peso corporal em média (CREMER et al., 2006) Os sinais apresentados pelos animais que vieram a óbito foram perda de peso, comportamento mais quieto, opacidade dos pelos, estertor respiratório, tendo os órgãos recolhidos durante a necropsia para análises posteriores. Vale ressaltar que a causa das mortes nos animais deste grupo experimental precisa ser avaliada para averiguar se tem relação direta com o tratamento. Ainda em Cremer et al. (2006), os únicos órgãos afetados nos ratos do estudo foram fígado e rins, observando-se aumento de peso, porém histologicamente ele não observou sinais significantes de intoxicação. Com isso, o efeito tóxico do ALA em camundongos permanece com investigação necessária.

7 CONCLUSÃO

A suplementação oral com 400 mg/kg/dia de ALA mostrou potencial preventivo nas lesões teciduais severas no parênquima testicular. É importante investigar se os indícios de ação preventiva do processo de degeneração testicular sejam capazes de reverter os danos teciduais em intervalo de tempo maior depois do insulto, tendo em vista que os dados experimentais aqui apresentados foram analisados 48 horas depois do choque térmico agudo. É necessário aprofundar o estudo sobre o efeito antioxidante do ALA nos tecidos.

REFERÊNCIAS

- ABDALI, D. et al. How effective are antioxidant supplements in obesity and diabetes? **Medical Principles and Practice**, v. 24, n. 3, p. 201–215, 14 mar. 2015.
- ABDULKAREEM, T. A. et al. Sperm abnormalities associated with vitamin a deficiency in rams. **Small Ruminant Research**, v. 57, n. 1, p. 67–71, 1 fev. 2005.
- ABREU, C. O. DE et al. Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 993–998, 2009.
- ADEDARA, I. A. et al. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 263, p. 88–98, 1 fev. 2017.
- AGARWAL, A. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1–17, 2014.
- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Carnitines and male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 8, n. 4, p. 376–384, 2004.
- AGUIRRE-ARIAS et al. Effects of ascorbic acid on spermatogenesis and sperm parameters in diabetic rats. **Cell Tissue Research**, 2017.
- AITKEN, J. R.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 636, p. 153–171, 2008.
- AHMADI, N.; NOAKES, D. E. Ultrasound imaging in determining the presence of testicular degeneration in two male goats. **British Veterinary Journal**, v. 151, n. 1, p. 101–110, 1995.
- AHOTUPA, M.; HUHTANIEMI, I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis¹. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 6, p. 1114–1118, 1 jun. 1992.
- AKPINAR, D. et al. The effect of lipoic acid on antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. **Physiology Research**, v. 57, p. 893–901, 2008.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. Supl. 6, p. 204–209, 2009.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 3, p. 334–346, 1 nov. 1995.
- ALVES, M. B. R. et al. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal

characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 795- 805.e2, 2016.

AMANN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, v. 2, n. 1, p. 37–58, 2 jan. 1981.

AMANN, R. P. Functional anatomy of the adult male. In: MCKINNON, A. O. et al. (Eds.). . **Equine Reproduction**. 2. ed. Philadelphia, London: Wiley-Blackwell, 2011. p. 867–880.

AYALA, A. et al. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, n. 360438, p. 31, 2014.

AZIZ, N. et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 2, p. 349–354, 1 fev. 2004.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 257–267, 2008.

BANKS, S. et al. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. **Reproduction**, v. 129, p. 505–514, 2005.

BEDFORD, J. M. Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: Experimental studies. In: ZORNIOTTI, A. W. (Ed.). **Temperature and Environmental Effects on the Testis**. New York: Plenum Press, 1991. p. 19–32.

BEHNE, D. et al. A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 2, p. 291–297, 1 mar. 1996.

BHATTACHARYA, K. et al. Obesity, systemic inflammation and male infertility. **Chemical Biology Letters**, v. 7, n. 2, p. 92–98, 2020.

BICUDO, S. et al. Patologias do sistema reprodutor de touros. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 43–48, 2007.

BIEWENGA, G. P. et al. The pharmacology of the antioxidant: Lipoic acid. **General Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 315–331, 1 set. 1997.

BILSKA, A.; WŁODEK, L. Lipoic acid - The drug of the future? **Pharmacological Reports**, v. 57, n. 5, p. 570–577, 2005.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 13 jan. 2012.

BIRCH, S. M. **A Survey of Testicular Lesions in Stallions**. 2008. Tese (Mestrado em Ciência) - Oklahoma State University, Oklahoma, 2008.

BISHT, S. et al. Oxidative stress and male infertility. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n. 8, p. 470–485, 1 ago. 2017.

BLANCHARD, T. L. et al. 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, 1 maio 1996.

BLANCHARD, T. L. et al. Low daily sperm output per ml of testis as a diagnostic criteria for testicular degeneration in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 1, p. 11–35, 1 jan. 2001.

BLANCHARD, T. L. et al. Identifying testicular hypoplasia in large animals. **Veterinary Medicine**, v. 85, p. 405–408, 1990.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Testicular degeneration. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 855–860.

BOER, M. Several examinations on the reproductive status of lowland gorillas (*Gorilla g. gorilla*) at Hannover Zoo. **Zoo Biology**, v. 2, p. 267–280, 1983.

BOZKAYA, F. et al. Effects of long-term heat stress and dietary restriction on the expression of genes of steroidogenic pathway and small heat-shock proteins in rat testicular tissue. **Andrologia**, v. 49, n. 6, p. 1–7, 1 ago. 2017.

BRITO, L. F. C. et al. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 1–2, p. 1–15, 20 nov. 2003.

BUJAN, L. et al. Increase in scrotal temperature in car drivers. **Human Reproduction**, v. 15, n. 6, p. 1355–1357, 1 jun. 2000.

BYUN, C. H. et al. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. **Journal Bone Minerals Research**, v. 20, n. 7, p. 1125–1135, 2005.

CARLSEN, E. et al. History of febrile illness and variation in semen quality. **Human Reproduction**, v. 18, n. 10, p. 2089–2092, 1 out. 2003.

CARMELIET, P. et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature**, v. 394, n. 6692, p. 485–490, 30 jul. 1998.

CARVALHO, A. A. et al. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 140–147, 1 ago. 2014.

CARVALHO, F. A. R. . **Morfologia e morfologia testicular de camundongos adultos submetidos à exposição crônica ao arsenato**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, 2009.

CASAO, A. et al. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are

correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 11 jun. 2010.

Colégio Brasileiro de Andrologia Animal (CBRA). **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª Edição ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução, 2013.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Degeneração testicular: visão científica. **Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)**, p. 30–36, 2017.

CHANDRASEKARAN, A. et al. Redox control of senescence and age-related disease. **Redox Biology**, v. 11, p. 91–102, 1 abr. 2017.

CHI, K. K. et al. Comparison of intraperitoneal and intraepididymal quercetin for the prevention of testicular torsion/detorsion-induced injury. **Urology**, v. 99, p. 106–111, 1 jan. 2017.

CHIHARA, M. et al. Wave and initial formation of the blood-testis barrier, resulting in irreversible testicular degeneration in mice. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 6, p. 11–13, 2013.

CHOWDHURY, A. K.; STEINBERGER, E. Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. **Journal of reproduction and fertility**, v. 22, n. 2, p. 205–212, 1 jul. 1970.

CLARK, R. V. Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. **The Anatomical Record**, v. 184, n. 2, p. 203–225, 1976.

COCUZZA, M. et al. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: An evidence based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, n. 5, p. 603–621, 2007.

COLLINS, P.; LACY, D. Studies on the structure and function of the mammalian testis. II. Cytological and histochemical observations on the testis of the rat after a single exposure to heat applied for different lengths of time. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 172, n. 26, p. 17–38, 11 mar. 1969.

COOPER, A. **Observations on the structure and disease of the testis**. London: Longman, 1845.

CORNWALL, G. A. Epididymis: Sperm maturation and motility. In: SKINNER, M. K. (Ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. 2. ed. London: Elsevier, 2018. v. 1p. 292–297.

CORRÊA, L. B. N. S. et al. Antioxidant action of alpha lipoic acid on the testis and epididymis of diabetic rats: morphological, sperm and immunohistochemical evaluation. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 45, n. x, p. 1–10, 2019.

COULTER, G. H. et al. Relationship of scrotal surface temperature measured by

infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p. 417–423, 1 nov. 1988.

CREASY, D. et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. **Toxicologic Pathology**, v. 40, p. 40S-121S, 2012.

CREMER, D. R. et al. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 46, n. 1, p. 29–41, 2006.

DANNO, S. et al. Decreased expression of mouse Rbm3, a cold-shock protein, in Sertoli cells of cryptorchid testis. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1685–1692, 1 maio 2000.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 369–377, 1 set. 2000.

DESAI, N. R. et al. Pathophysiology of cell phone radiation: Oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 114, 22 out. 2009.

DIAS, F. C. R. et al. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, n. August 2018, p. 179–189, 2018.

DU PLESSIS, S. S. et al. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do spermatozoa use? **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 2, p. 230–235, 1 mar. 2015.

DURAIRAJANAYAGAM, D. et al. Testicular heat stress and sperm quality. In: **male infertility: A complete guide to lifestyle and environmental factor**. New York: Springer Science and Business Media, 2014. p. 105–125.

DURAIRAJANAYAGAM, D. et al. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 14–27, 2015.

EBEID, T. A. Vitamin E and organic selenium enhances the antioxidative status and quality of chicken semen under high ambient temperature. **British Poultry Science**, v. 53, n. 5, p. 708–714, out. 2012.

EDWARDS, J. F. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 197–207, 1 set. 2008.

EISENBERG, M. L.; LIPSHULTZ, L. I. Varicocele-induced infertility: Newer insights into its pathophysiology. **Indian Journal of Urology**, v. 27, n. 1, p. 58–64, jan. 2011.

ENARI, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 43–50, 1 jan. 1998.

FALLAH, A. et al. Zinc is an essential element for male fertility: a review of zn roles in

men's health, germination, sperm quality, and fertilization. **Journal of reproduction & infertility**, v. 19, n. 2, p. 69–81, 2018.

FAYOMI, A. et al. Spermatogonia. In: SKINNER, M. K. (Ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. 2. ed. London: Academic Press Inc., 2018. p. 24–35.

FIRTH, J. D. et al. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A: Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 36, p. 21021–21027, 8 set. 1995.

FORSYTHE, J. A. et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 9, p. 4604–4613, 1 set. 1996.

GAD, S. C. Common vehicles for nonclinical evaluation of therapeutic agents. In: GAD, S. C. (Ed.). **Drug Safety Evaluation**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2009. p. 1140–1160.

GALIL, K. A. A.; SETCHELL, B. P. Effects of local heating of the testis on testicular blood flow and testosterone secretion in the rat. **International Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73–85, 1 fev. 1988.

GARCIA, A. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 33–39, 2017.

GAROLLA, A. et al. Seminal and molecular evidence that sauna exposure affects human spermatogenesis. **Human Reproduction**, v. 28, n. 4, p. 877–885, 1 abr. 2013.

GAZVANI, M. R. et al. Assessment of testicular core temperatures using microwave thermography. **Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 1723–1726, 1 ago. 2000.

GEHLEN, H. et al. Azoospermia due to testicular degeneration in a breeding stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 3, p. 137–139, 1 mar. 2001.

GHARAGOZLOO, P. et al. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: Promising preclinical evidence from animal models. **Human Reproduction**, v. 31, n. 2, p. 252–262, 2016.

GLAD SORESEN, H. et al. Efficiency of the countercurrent transfer of heat and ¹³³Xenon between the pampiniform plexus and testicular artery of the bull under in-vitro conditions. **International Journal of Andrology**, v. 14, p. 232–240, 1991.

GONZALEZ-PEREZ, O.; GONZALEZ-CASTANEDA, R. E. Therapeutic perspectives on the combination of α -lipoic acid and vitamin E. **Nutrition Research**, v. 26, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2006.

GONZÁLEZ-PÉREZ, Ó. et al. Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine. **Revista de Investigación Clínica**, v. 60, n. 1, p. 58–67, 2008.

GOTTLIEB, E. et al. Bcl-xL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 15, p. 5680–5689, 1 ago. 2000.

GREAVES, P. Male genital tract. In: **Histopathology of Preclinical Toxicity Studies**. 4th. ed. London: Elsevier, 2012. p. 1–10.

GUO, J. et al. Heat treatment induces liver receptor homolog-1 expression in monkey and rat sertoli cells. **Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 1255–1265, 1 mar. 2007.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). **International Journal of Oncology**, v. 22, n. 1, p. 15–20, 1 jan. 2003.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª ed. Barueri, SP: Manole, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. 2. ed. London: Clarendon Press, 1989.

HAMILTON, T. R. DOS S. **Estudo dos fatores envolvidos na fragmentação de DNA dos espermatozoides em ovinos**. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2014.

HAMMADEH, M. E. et al. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 277, n. 6, p. 515–526, 20 jun. 2008.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341–3350, 2009.

HARI PRIYA, P.; REDDY, P. S. Effect of restraint stress on lead-induced male reproductive toxicity in rats. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 317, n. 7, p. 455–465, 1 ago. 2012.

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. 343–352, 1 jan. 1990.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–776, 12 out. 2000.

HERMANN, R.; GUNDERT-REMY, U. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers. **Article in European Journal of Clinical Pharmacology**, p. 513-514, 1996.

HESS, R. A.; FRANCA, L. R. DE. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.**, p. 1–15, 2009.

HIKIM, A. P. S. et al. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3167–3175, 1 jul. 2003.

HJOLLUND, N. H. I. et al. The relation between daily activities and scrotal temperature. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 209–214, 1 maio 2002.

HÖCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 4, p. 266–276, 21 fev. 2001.

HOLSTEIN, A. F. et al. Morphological analysis of tissue components in the tunica dartos of man. **Cell and Tissue Research**, v. 154, n. 3, p. 329–344, set. 1974.

HOU, Y. et al. Heat-stress-induced metabolic changes and altered male reproductive function. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 3, p. 1495–1503, 6 mar. 2015.

HSU, P. C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 128, n. 3, p. 169–179, 17 jul. 1998.

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, n. 2, p. 135–141, 1 set. 1975.

IBRAHIM, S. F. et al. A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. **Clinics**, v. 64, p. 545–550, 2008.

IIDA, T. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces cell cycle arrest of endothelial cells. **Genes to Cells**, v. 7, n. 2, p. 143–149, 1 fev. 2002.

IKEDA, M. et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 2, p. 393–399, 1 ago. 1999.

IVELL, R. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 15, 20 abr. 2007.

IZU, H. et al. Heat shock transcription factor 1 is involved in quality-control mechanisms in male germ cells. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, p. 18–24, 1 jan. 2004.

JANNES, P. et al. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. **Human Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 372–375, 1998.

JENSEN, T. K. et al. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 danish men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4059–4063, 1 dez. 1997.

JEULIN, C.; LEWIN, L. M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 2, p. 87–102, 1 mar. 1996.

JIA, J. et al. Autophagy enhancing contributes to the organ protective effect of alpha-lipoic acid in septic rats. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. July, p. 1–13, 2019.

JOHNSEN, S. G. Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. **Hormones**, v. 1, p. 2–25, 1970.

JONES, W. et al. Uptake, recycling, and antioxidant actions of α -lipoic acid in endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 1, p. 83–93, 1 jul. 2002.

JØRGENSEN, N. et al. Regional differences in semen quality in Europe. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 1012–1019, 1 maio 2001.

JUNG, A. et al. Influence of heating car seats on scrotal temperature. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 2, p. 335–339, 1 ago. 2008.

JUNG, A.; SCHUPPE, H. C. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. **Andrologia**, v. 39, n. 6, p. 203–215, 1 dez. 2007.

KANDEEL, F. R.; SWERDLOFF, R. S. Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 1, p. 1–23, 1 jan. 1988.

KANTER, M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, n. 3, p. 314–320, 1 dez. 2010.

KANTER, M. et al. Role of quercetin in cadmium-induced oxidative stress, testicular damage, and apoptosis in rats. **Analytical Quantification Cytopathology Histopathology**, v. 38, n. 1, p. 45–51, 2016.

KANTER, M.; AKTAS, C. Effects of scrotal hyperthermia on Leydig cells in long-term: a histological, immunohistochemical and ultrastructural study in rats. **Journal of Molecular Histology**, v. 40, p. 123–130, 2009.

KANTER, M. et al. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: An immunohistochemical and ultrastructural study. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 2, p. 99–113, 14 mar. 2013.

KARAKOYUN, B. et al. Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. **Inflammation**, v. 32, n. 1, p. 37–46, 2009.

KASTELIC, J. P. Thermoregulation of the Testes. In: HOPPER, R. M. (Ed.). **Bovine Reproduction**. Ed1. John Wiley & Sons, Inc, 2014. p. 26–29.

KASTELIC, J. P. et al. Hyperthermia is more important than hypoxia as a cause of disrupted spermatogenesis and abnormal sperm. **Theriogenology**, v. 131, p. 177–181, 2019.

KERNER, J.; HOPPEL, C. Genetic disorders of carnitine metabolism and their

nutritional management. **Annual Review of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 179–206, 28 jul. 1998.

KHABBAZI, T. et al. Effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammation, oxidative stress, and serum lipid profile levels in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. **Journal of Renal Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 244–250, 2012.

KHORSANDI, L. et al. Beneficial effects of quercetin on titanium dioxide nanoparticles induced spermatogenesis defects in mice. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 6, p. 5595–5606, 2017.

KIM, B.; PARK, K.; RHEE, K. **Heat stress response of male germ cells** *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer. 25 ago. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-012-1165-4>>. Acesso em: 9 set. 2020

KOH, E. H. et al. Effects of alpha-lipoic acid on body weight in obese subjects. **American Journal of Medicine**, v. 124, n. 1, p. 85.e1-85.e8, 1 jan. 2011.

KOPPERS, A. J. et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199–3207, 1 ago. 2008.

KUMAR, N.; SINGH, A. K. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 47, n. 10, p. 565–572, 1 dez. 2018.

KUMAR, S. et al. Semen quality and reproductive hormones among welders - A preliminary study. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 8, n. 2, p. 64–67, 2003.

LAMIRANDE, E. DE et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

LARA, N. L. M.; FRANÇA, L. R. Neonatal hypothyroidism does not increase Sertoli cell proliferation in iNOS^{-/-} mice. **Reproduction**, v. 154, n. 1, p. 13–22, 2017.

LÉGARÉ, C. et al. Expression of heat shock protein 70 in normal and cryptorchid human excurrent duct. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 197–202, 1 mar. 2004.

LEWIS, S. E. M.; AITKEN, R. J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 1, p. 33–41, 24 out. 2005.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757–772, 2018.

LIU, J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient α -lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: An overview. **Neurochemical Research**, v. 33, p. 194–203, 2008.

LIU, Y. X. Temperature control of spermatogenesis and prospect of male contraception. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, n. 2, p. 730–755, 1 jan. 2010.

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: Certainties and incognita. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 19–26, 10 abr. 2000.

LUE, Y.-H. et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: Role of intratesticular testosterone on stage specificity. **Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 1709–1717, 1 abr. 1999.

LUZ, H. K. M. et al. catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediol-freezing medium. **Biopreservation and Biobanking**, v. 10, n. 4, p. 338–342, 1 ago. 2012.

MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. **Cosmetologia: com questões de avaliação**, p. 33–42, 2000.

MAIA, M.; BICUDO, S. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183–193, 2009.

MARANGON, K. et al. Comparison of the effect of α -lipoic acid and α -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 1114–1121, 1 nov. 1999.

MARTIN-HIDALGO, D. et al. Antioxidants and male fertility: From molecular studies to clinical evidence. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 89, 1 abr. 2019.

MARTÍNEZ-SOTO, J. C. et al. Dietary supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) improves seminal antioxidant status and decreases sperm DNA fragmentation. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 62, n. 6, p. 387–395, 1 nov. 2016.

MCDANIEL, C. D. et al. An attempt at alleviating heat stress infertility in male broiler breeder chickens with dietary ascorbic acid. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 9, p. 593–602, 2004.

MIEUSSET, R. et al. Effect of posture and clothing on scrotal temperature in fertile men. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 1, p. 170–175, 20 set. 2006.

MOHASSEB, M. et al. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 185–194, 2011.

MOINI, H. et al. Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, n. 1, p. 84–90, 2002.

MOORE, C. R.; QUICK, W. M. J. The scrotum as a temperature regulator for the testes. **American Physiological Society**, v. 68, p. 70–79, 1924.

MORGENTALER, A. et al. Testis and temperature: an historical, clinical, and

research perspective. **Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 189–195, 1970.

MOULE, G. R.; WAITES, G. M. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1963.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747–806, 1 out. 2004.

MUNKELWITZ, R.; GILBERT, B. R. Are boxer shorts really better? A critical analysis of the role of underwear type in male subfertility. **Journal of Urology**, v. 160, n. 4, p. 1329–1333, out. 1998.

MUNSON, L. Diseases of captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*): results of the cheetah research council pathology survey, 1989-1 992. **Zoo biology**, v. 12, p. 105–124, 1993.

MUSA, N. H. C. et al. Evaluation of acute and sub-acute oral toxicity effect of aquilaria malaccensis leaves aqueous extract in male ICR mice. **Natural Product Sciences**, v. 25, n. 2, p. 157–164, 2019.

NAKATA, H. Morphology of mouse seminiferous tubules. **Anatomical Science International**, v. 94, n. 1, 2019.

NANAYAKKARA. **The physiological mechanisms of scrotal temperature regulation and the effects of its dysregulation on endocrine function of the testes**. 2009. Tese (Doutorado em Fisiologia) University of Western Australia, 2011.

NAVES, C. S. et al. Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e “acridine orange”. **Bioscience Journal**., v. 20, n. 3, p. 117–124, 2004.

NEUER, A. et al. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 2, p. 149–159, 2000.

O'FLAHERTY, C. Peroxiredoxin 6: The protector of male fertility. **Antioxidants**, v. 7, n. 12, p. 173, 24 nov. 2018.

OSMAN, K. et al. Effects of alpha lipoic acids on cattle sperm kinetics using computer assisted semen analysis. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 73–77, 2012.

OZBAL, S. et al. The effects of α -lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in rats. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

PACKER, L. et al. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 888–895, 1 out. 2001.

PACKER, L. et al. Alpha-lipoic Acid as a Biological Antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 2, p. 227–250, 1995a.

PACKER, L. et al. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology**

& Medicine, v. 19, n. 2, p. 227–250, 1995b.

PAUL, C. et al. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction Research**, v. 136, p. 73–84, 2008.

PAUL, C. et al. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death¹. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 913–919, 1 maio 2009.

PECORA, T. M. G. et al. Evaluation of Eudragit® Retard polymers for the microencapsulation of alpha-lipoic acid. **Current Drug Delivery**, v. 13, n. 7, p. 1165–1175, 2016.

PEI, Y. et al. Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis. **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n. 1, p. 81–87, 10 jan. 2012.

PELTOLA, V. et al. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation¹. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 5, p. 1146–1150, 1 nov. 1995.

PEÑA, S. T. et al. Antioxidant supplementation mitigates DNA damage in boar (*Sus scrofa domesticus*) spermatozoa induced by tropical summer. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0216143, 30 abr. 2019.

PÉREZ-CRESPO, M. et al. 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, p. 40–47, jan. 2008.

PÉREZ-CRESPO, M. et al. Scrotal heat stress in mice affects viability and DNA integrity of sperm, and sex ratio of the offspring. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 104–104, 2006.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 21 abr. 2015.

QUEIROZ, G. C. D. DE. **Efeitos preventivos e/ou restauradores da pentoxifilina sobre a espermatogênese de ratos wistar adultos submetidos a choque térmico testicular**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.

RAO, M. et al. Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 668–675, 1 jul. 2015.

REN, F. et al. Lycopene and alpha-lipoic acid improve semen antioxidant enzymes activity and cashmere goat sperm function after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 84, n. May, p. 27–32, 2018.

RIZZOTO, G.; KASTELIC, J. P. A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants? **Theriogenology**, v. 147, p. 166–175, 2020.

ROCHETTE, L. et al. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 1, p. 114–125, 2013.

ROCKETT, J. C. et al. Effects of Hyperthermia on Spermatogenesis, Apoptosis, Gene Expression, and Fertility in Adult Male Mice¹. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 229–239, 2001.

RUCKER, E. B. et al. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 7, p. 1038–1052, 1 jul. 2000.

SAKAHIRA, H. et al. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 96–99, 1 jan. 1998.

SAKR, S. A. R. et al. Effect of selenium on carbimazole-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, n. 1, p. 59–66, 1 jan. 2011.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737–752, 2002.

SANTOS, S. M. **Avaliação do Efeito Protetor do Ácido Alfa Lipoico na Neuroinflamação e Estresse Oxidativo no Hipocampo Induzidos por Dapsona em Modelo Animal**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pará, 2019.

SENGER, P. L. The organization and function of the male reproductive system. In: PC, C. (Ed.). **Pathways to pregnancy and parturition**. Pullman: Current Conceptions, Inc, 2003. p. 272.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Segment-Specific Morphological Changes in Aging Brown Norway Rat Epididymis¹. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 2, p. 497–513, 1 fev. 1998.

SETCHELL, B. The Scrotum and Thermoregulation. In: **The Mammalian Testis**. New York: Cornell University Press, 1978. p. 90–108.

SETCHELL, B. The effects of heat on testes of mammals. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 81–91, 2006.

SETCHELL, B. P. The Parkes lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, n. 2, p. 179–194, 1 nov. 1998.

SETCHELL, B. P.; WAITES, G. M. H. 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. **Reproduction**, v. 30, n. 2, p. 225–233, 1 ago. 1972.

SHAHA, C. et al. Male germ cell apoptosis: Regulation and biology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1501–1515, 27 maio 2010.

SHAY, K. P. et al. Is α -lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. **IUBMB Life**, v. 60, n. 6, p. 362–367, 2008.

SHAY, K. P. et al. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1149–1160, 2009.

SHAYGANNIA, E. et al. Alpha - Lipoic Acid improves the testicular dysfunction in rats induced by varicocele. **Andrologia**, v. e13085, n. May, p. 1–9, 2018.

SHEFI, S. et al. Wet heat exposure: A potentially reversible cause of low semen quality in infertile men. **International Braz J Urol**, v. 33, n. 1, p. 50–56, 2007.

SHEYNKIN, Y. et al. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. **Human Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 452–455, 1 fev. 2005.

SHEYNKIN, Y. et al. Protection from scrotal hyperthermia in laptop computer users. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 2, p. 647–651, 1 fev. 2011.

SHIRAISHI, K. et al. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. **International Journal of Urology**, v. 19, n. 6, p. 538–550, 1 jun. 2012.

SHWEIKI, D. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, p. 843–845, 1992.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 1 abr. 2015.

SILVA, Y. F. R. S. **Efeito da Pentoxifilina na Função Testicular e Produção Espermática de Equinos Submetidos a Estresse Térmico Escrotal**. 2017. Tese (Douorado em Biotecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2017.

SKIBSKA, B.; GORACA, A. The protective effect of lipoic acid on selected cardiovascular diseases caused by age-related oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

SKINNER, M. K. **Encyclopedia of Reproduction**. 2. ed. Academic Press, 2018. v. 1

SKINNER, B. M. et al. A high-throughput method for unbiased quantitation and categorization of nuclear morphology. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 5, p. 1250–1260, 2019.

SOHAIB, M. et al. Alpha-lipoic acid: An inimitable feed supplement for poultry

nutrition. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 33–40, 2018.

SONG, G.-S.; SEO, J. T. Changes in the scrotal temperature of subjects in a sedentary posture over a heated floor. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 446–457, 1 ago. 2006.

SRIVASTAVA, S. et al. Incorporation of ascorbic acid, caffeine and chloroquine diphosphate in dilutor improves structural and functional status of frozen semen. **Open Access Library Journal**, v. 1, p. 1–12, 2014.

STOCKER, T. F. et al. **Climate change 2013 the physical science basis working group I contribution to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change edited by**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2013.

STOFFEL, W. et al. Dietary ω 3-and ω 6-Polyunsaturated fatty acids reconstitute fertility of Juvenile and adult Fads2-Deficient mice. **Molecular Metabolism**, v. 36, p. 100974, 1 jun. 2020.

TAKAISHI, N. et al. Transepithelial transport of α -lipoic acid across human intestinal Caco-2 cell monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5253–5259, 27 jun. 2007.

TAKEDA, N. et al. Viable offspring obtained from Prm1-deficient sperm in mice. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.

TOPPARI, J. et al. SRIVASTAVA Cryptorchidism - Disease or symptom? **Annales d'Endocrinologie**, v. 75, n. 2, p. 72–76, 1 maio 2014.

TURNER, R. M. O. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 278–284, 1 dez. 2007.

TURNER, R.; 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. SUPPL.4, p. 178–186, ago. 2012.

TURNER, T. T.; LYSIAK, J. J. Oxidative stress: A common factor in testicular dysfunction. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 5, p. 488–498, 2008.

VALDECANTOS, M. P. et al. Lipoic acid administration prevents nonalcoholic steatosis linked to long-term high-fat feeding by modulating mitochondrial function. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 12, p. 1676–1684, 1 dez. 2012.

VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 31, n. 1, p. 31, 30 mar. 1998.

VERA, Y. et al. Mitochondria-dependent pathway is involved in heat-induced male germ cell death: Lessons from mutant mice¹. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5,

p. 1534–1540, 1 maio 2004.

VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M. et al. Protective effect of α -tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92, n. 2, p. 131–139, 1 abr. 2011.

VOGELSTEIN, B. et al. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307–310, 2000.

VOGLER, C. J. et al. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculates spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, p. 1207–1219, 1993.

VOLOBOUEVA, L. A. et al. (R)- α -lipoic acid protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 11, p. 4302–4310, 1 nov. 2005.

WAITES, G. M. H. Temperature Regulation and the Testis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDERMARK, N. L. (Eds.). . **The Testis: Development, Anatomy and Physiology**. New York and London: Academic Press, 1970. p. 241–272.

WAITES, G. M. H.; VOGLMAYR, J. K. The functional activity and control of the apocrine sweat glands of the scrotum of the ram. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 14, n. 6, p. 839–851, 1963.

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, n. 3, p. 213–224, 1 ago. 1961.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 3, p. 1230–1237, 20 jan. 1995.

WATSON, E. D. et al. Testicular degeneration in 3 stallions. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 6, p. 507–510, 1 nov. 1994.

WECHALEKAR, H. et al. Whole-body heat exposure induces membrane changes in spermatozoa from the cauda epididymidis of laboratory mice. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, n. 4, p. 591–598, 2010.

WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 10, p. 1151–1162, 1 ago. 2002.

WIDLAK, W. et al. Inducible 70 kDa heat shock protein does not protect spermatogenic cells from damage induced by cryptorchidism. **International Journal of Andrology**, v. 30, n. 2, p. 80–87, 1 abr. 2007.

WRIGHT, C. et al. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, p. 684–703, 2014.

YAERAM, J. et al. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 6, 2006.

YAO, C. et al. Protection of pentoxifylline against testis injury induced by intermittent hypobaric hypoxia. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

YENI, D. et al. Effect of α -lipoic acid on sperm quality, reproductive tract measures in thinner exposed rats. **Andrologia**, v. 44, n. SUPPL.1, p. 74–80, 2012.

YIN, Y. et al. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 159–165, 1997.

YING, Z. et al. Lipoic acid effects on established atherosclerosis. **Life Sciences**, v. 86, p. 95–102, 2010.

YON, J. et al. Beta-carotene prevents the spermatogenic disorders induced by exogenous scrotal hyperthermia through modulations of oxidative stress, apoptosis, and androgen biosynthesis in mice. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 2, p. 59–67, 2019.

ZAGO, M. P.; OTEIZA, P. I. The antioxidant properties of zinc: Interactions with iron and antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 266–274, 15 jul. 2001.

ZHANG, M. et al. Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 41412, 2012.

ZHANG, X.-S. et al. Dedifferentiation of adult monkey sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1237–1245, 1 mar. 2006.

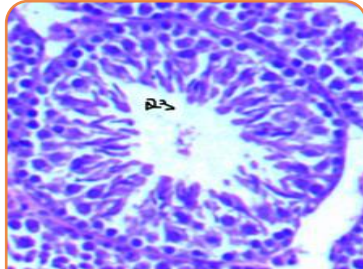
ZHU, B. et al. Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. **Andrologia**, v. 36, n. 6, p. 384–394, dez. 2004.

ZORNIOTTI, A. et al. Effect of clothing on scrotal temperature in normal men and patients with poor semen. **Urology**, v. 19, n. 2, p. 176–178, 1 fev. 1982.

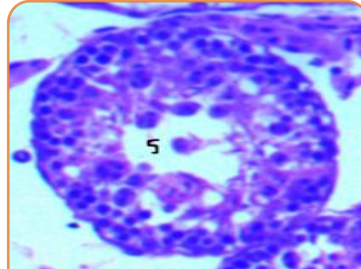
**ANEXO A - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DAS LÂMINAS COM
HEMATOXILINA E EOSINA**

Solução	Duração
Xilol I	20 min
Xilol II	20 min
Álcool absoluto I	5 min
Álcool absoluto II	5 min
Álcool absoluto III	5 min
Álcool 90%	5 min
Álcool 80%	5 min
Água destilada	3 min
Hematoxilina	2 min
Água corrente	15 min
Eosina	20 seg
Água corrente	10 seg
Álcool 90%	Imersão 5 vezes
Álcool absoluto I	Imersão 5 vezes
Álcool absoluto II	20 min
Álcool absoluto III	20 min
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min

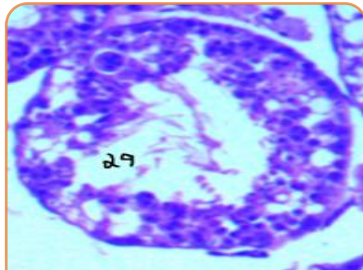
ANEXO B – ARQUITETURA HISTOLÓGICA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR DE ACORDO COM AS ALTERAÇÕES CLASSIFICADAS POR JOHNSEN (1970)



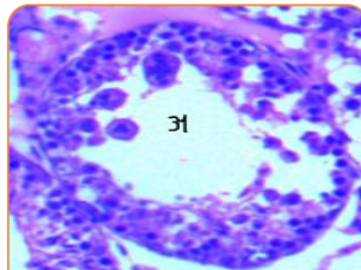
Nível 1



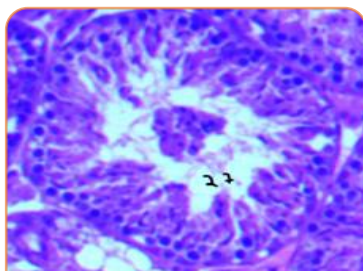
Nível 2



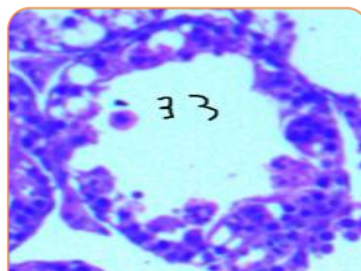
Nível 3



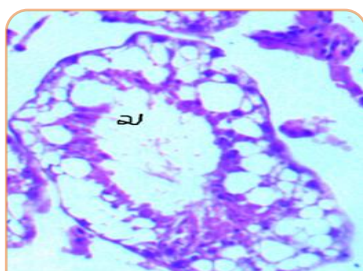
Nível 4



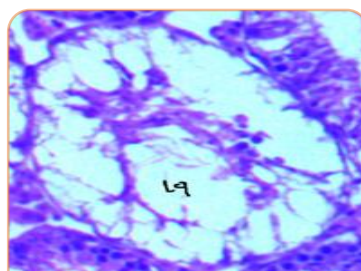
Nível 5



Nível 6



Nível 7



Nível 8