MAÍRA BIANCHI RODRIGUES ALVES

**TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM CARNEIROS
COM SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A OU LASERTERAPIA DE
BAIXA INTENSIDADE**

Pirassununga
2014

MAÍRA BIANCHI RODRIGUES ALVES

**Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de
vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestrado em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Coorientador:
Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

De acordo: _____

Orientadora

Pirassununga

2014

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Nº CLASSE
Nº TOMBO 033601

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2967
FMVZ

Alves, Maíra Bianchi Rodrigues

Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade / Maíra Bianchi Rodrigues Alves. – 2014.
166 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profª. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

Coorientador: Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade.

1. Testículos. 2. Ovinos. 3. Insulação escrotal. 4. Termografia. 5. Sondas fluorescentes. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade", protocolado sob o nº 2467/2012, utilizando 36 (trinta e seis) carneiros, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Treatment of testicular degeneration in rams with vitamin A supplements or low-intensity laser therapy", protocol number 2467/2012, utilizing 36 (thirty six) rams, under the responsibility Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 23 de abril de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVES, Maíra Bianchi Rodrigues

Título: **Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*D*edico todo este trabalho às duas grandes mulheres da minha vida: minha mãe e minha avó (in memoriam), minhas fontes de inspiração.

Sem vocês tudo isso não teria acontecido, são as principais responsáveis por toda essa conquista.

Obrigada por sempre estarem me guiando, me acalmando, me apoiando, me inspirando, confiando em mim. Cada palavra, cada gesto, cada sorriso ficam sempre guardados na minha memória, todos os dias, e os carrego comigo para que consiga vencer cada dia. Obrigada por confiarem em mim e me apoiarem incondicionalmente. Por acreditarem que o que eu acredito é o melhor para mim, e por fecharem os olhos para confiar em mim.

Obrigada mãe, por sempre me mostrar o caminho da ciência, desde que eu era pequenininha.... Obrigada por sempre me apoiar e me amar. Espero ainda poder retribuir muito.

“Vó”, quando olho para o céu, eu procuro sempre a estrela mais brilhante, que sei que é você me seguindo. Isso me conforta e me acalma todos os dias. É tão bom saber que você está sempre por perto e que tenho essa força me guiando e me protegendo. Essa frase de Cora Coralina resume tudo que aprendi com você: “Não morre aquele que deixou na Terra a melodia de seu cântico na música de seus versos” - Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Para que essa dissertação ficasse pronta, para que este projeto, que começou a ser elaborado ainda em 2011, época da minha residência, saísse do papel, e se tornasse realidade de forma tão magistral, foram necessárias várias peças que eu considero parte de um imenso quebra-cabeça. Peças estas que surgiram bem no começo de toda essa empreitada, ou que vieram no final para completar este quebra-cabeça tão complexo e ao mesmo tempo tão bonito. Cada peça teve a sua importância e sem uma única peça o quebra-cabeça jamais teria ficado completo. Agradeço a cada uma a participação tão importante que teve nisso tudo. Vamos lá....

Agradeço primeiramente à minha mãe, **Leila**, por todo o apoio, confiança e inspiração. Por ter me ensinado a ser forte e insistir nos meus sonhos. Por ter me mostrado que acreditar e batalhar são essenciais para ser feliz. Agradeço à minha avó **Necy**, que sempre me apoiou e me incentivou muito. Que sempre se orgulhou de mim e me ensinou a lutar pelo que acredito. Um exemplo com a sua personalidade forte e durona, mas ao mesmo tempo tão encantadora. Agradeço ao meu padrasto, **Luiz Eduardo**, por ter surgido em nossas vidas e sempre ser tão prestativo e amoroso conosco. Agradeço por sempre ajudar em tudo, sempre estar preocupado e solícito e, principalmente, sempre querer a gente bem. Agradeço aos meus irmãos, **Iara e Ariel**, que colore a minha vida com suas brincadeiras e que, apesar de mais novos, são grandes exemplos para mim de como saber administrar todas as funções que nos são dadas, conciliar trabalho, família e amigos. Agradecimentos ao meu pai, **Beto**, à minha madrastra, **Silvana** e à minha avó **Regina** que mesmo longe, sempre trazem palavras de conforto e de motivação.

À **Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini** por ter confiado tanto em mim e ter me dado a oportunidade de participar de um projeto tão complexo e grande. Obrigada por abrir as portas da pesquisa de maneira tão empolgante, crítica e sempre tão ética. Por despertar dúvidas e desenvolver conceitos em mim que sei que seguirão para o resto da vida. Obrigada por ter me dado a oportunidade de trabalhar com tantas pessoas, cresci muito com isso. Obrigada por ter confiado em mim para o experimento piloto e pela responsabilidade pelos 36 carneiros. Obrigada pela amizade.

Ao **Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade** por ter aberto as portas do Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES), emprestado suas orientadas, aceitado ser meu coorientador e ter dedicado seu tempo à estatística desta dissertação. Obrigada por ter confiado em mim e por sempre estar disposto a conversar e me orientar. Obrigada por ter dedicado grande parte do seu tempo à minha formação e por ter despertado dúvidas e auto-críticas.

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda** por sempre estar presente, pelas palavras e conselhos. Obrigada por nos ajudar em cada etapa desgastante do experimento. Por ajudar na elaboração e na execução do piquete, foi muito importante. Obrigada por sempre estar nos apoiando e querendo o melhor para nós em prol da pesquisa. Obrigada por me permitir participar das atividades do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) quando cheguei em Pirassununga. Aprendi muito com o senhor, esta etapa foi fundamental para a minha formação, muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci**, **Prof. Dr. José Antunes Rodrigues**, e aos técnicos, **Marina Holanda** e **Rogério Azevedo**, do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, por abrirem as portas do laboratório para mim e me permitirem aprender muito. Obrigada pela realização das dosagens de testosterona e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Marcílio Nichi** e aos doutorandos **João Diego de Agostini**, **Daniel Angrimani** e **Andressa Dalmazzo** do Laboratório de Andrologia pelas análises do TBARS, grande apoio e pela amizade. Um agradecimento especial ao Diego por sempre atender às minhas dúvidas tão prontamente. Obrigada pela paciência.

Ao **Prof. Dr. Birgel**, à veterinária **Dani Birgel** e à doutoranda e amiga **Vanessa Storillo** por abrirem as portas do laboratório e pelo inestimável apoio para cuidar da saúde dos nossos animais. Muito obrigada por toda a ajuda e apoio.

À **Profa. Dra. Macau (Maria Claudia Sucupira)** pelo imenso apoio com a nutrição dos animais. Obrigada pela paciência e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Fábio Pogliani** e ao mestrando **Fábio Sellera** pela inspiração, incentivo e ensinamento na utilização da laserterapia neste trabalho. Um grande agradecimento especial ao Sellera por sempre nos atender tão prontamente. Muito obrigada!

Ao **Dr. Helder Thomé** e à veterinária **Carolina Canella** do Laboratório de Patologia da UNIFEOB por todo apoio com as amostras, pelo meu treinamento e pelo processamento das lâminas de histopatológico. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi (Kiky)**, pela ajuda, conversas, experiência. Obrigada pela ajuda com a aquisição dos carneiros, pelos grandiosos ensinamentos e pelos direcionamentos, todos cheios de experiência e empolgação únicos.

À **Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avilla Assumpção** e ao **Prof. Dr. José Antonio Visintin** por terem aberto as portas do laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal ainda quando eu estava no primeiro ano da graduação. Foi muito importante para despertar meu interesse pela pesquisa e pela reprodução animal. Obrigada **Profa. Dra. Mayra** por me acolher como sua aluna de iniciação científica e por ter me permitido participar de um grupo de pesquisa tão grandioso e bem coordenado. Obrigada pelos ensinamentos e amizade.

Aos **Profs. Drs. Ed Hoffmann** e **Mário Binelli**, do Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal em Pirassununga. Muito obrigada pela convivência, pelas palavras de conforto e conversas. **Prof. Mário** aproveito para agradecer muito pela ajuda e direcionamento dados no período final do experimento, muito obrigada! Agradeço também às pós-graduandas **Milena Oliveira** e **Moana França** pelo apoio nessa etapa!

À **Profa. Dra. Viviani Gomes**, pela amizade, por estar sempre pronta a me ouvir e aconselhar. Obrigada pelas palavras e por ter surgido em minha vida.

Aos **Profs. Drs. Camila Infantsi Vannucchi**, **Clair Motos de Oliveira**, **Claudia Barbosa Fernandes**, **Claudio Alvarenga de Oliveira**, **Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães**, **Pietro Sampaio Baruselli** e **Ricardo José Garcia Pereira** por toda a convivência, principalmente durante o período em que fiquei em São Paulo. Obrigada pela amizade e pelos conselhos.

Aos funcionários do CBRA, **Clayton**, **João**, **Márcio**, **Rildo**, **Zé Maria**, **Alexandra** e **Sandra** pela convivência, por tornar nosso trabalho muito mais prazeroso. Obrigada **Clayton**, por sempre atender nossos pedidos tão prontamente e com tanta qualidade. Obrigada **João**, **Márcio**, **Rildo**, **Zé Maria** por sempre se dedicarem tanto aos cuidados com os carneiros. Obrigada **Alexandra** e **Sandra** por todas as manhãs sempre estar com um sorriso no rosto e pela boa conversa.

Às funcionárias do VRA (SP), **Harumi, Roberta (Ro)** e **Thais**. Obrigada **Harumi** por sempre atender às minhas dúvidas com paciência e tamanho zelo. Muito obrigada pelas conversas e pela amizade. Obrigada **Ro e Thais** por sempre estarem com um sorriso no rosto e boa vontade em ajudar.

Aos funcionários do setor de ovinos, em especial ao **João** pela confiança no projeto piloto, por todo apoio e pela amizade.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro por meio da bolsa de mestrado e pelo auxílio-pesquisa que possibilitou a realização do projeto.

À **prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**, pelo apoio no projeto piloto e sempre que possível.

Ao pessoal da equipe que doou seu tempo durante o período experimental, que trabalhou duro, acordou cedo, buscou carneiro, levou carneiro, segurou carneiro, pesou carneiro, correu atrás de carneiro, colheu sêmen, colheu sangue, transportou sangue, transportou sêmen, embaixo de Sol, de chuva, de *bike*, de carro, de moto, sem vocês nada disso teria acontecido: **Bruna Oliveira (Bru)**, **Gisele Mouro (Gi)**, **Leonardo Batissaco (Bati)**, **Mariana Andrade (Mari)**, **Renata Lançoni (Rê)**, **Roberto Romano (Robertinho)**, **Shirley Florez (Shirleyzinha)**, **Tamie Guibu (Aga)** e **Vinícius Vellone**....cada um teve sua grande importância nisso tudo!! Muito obrigada por toda a ajuda e por toda a confiança! Agradeço a todos pela amizade, pela descontração, pelas conversas, pela paciência, pela qualidade no trabalho.... enfim, agradeço por toda a doação de tempo, de amizade, de trabalho que vocês fizeram, vocês são parte disso tudo e grandes responsáveis pela realização de tudo isso. Espero poder acrescentar um pouco na vida de vocês! Agradecimentos especiais ao Bati, à Gi, à Mari e à Shirley pela colaboração desde o início no experimento piloto, que acabou virando o experimento 1 desta grande empreitada. Agradeço também pela dedicação (e paciência) no condicionamento dos carneiros desde o começo. Agradeço também aos estagiários: **Andresa** pela imensa dedicação no período experimental, **Jorge, Willian, Fausto, Dayana, Gabriel, Lu, Sandra**. Muito obrigada! Enfim, agradeço a todos. Cada um teve sua grande importância e jamais esquecerei. Estou muito feliz que pude ter tantas pessoas trabalhando comigo e de maneira tão harmônica e prazerosa. Obrigada a todos pela amizade, convivência, sorriso e confiança.

Aos colegas de pós-graduação pela maravilhosa convivência, pelas risadas, histórias.... **Rê, Moana, Milena, Shirley, Bati, Mari, Gi, Roney, Henrique, Bruna, Saara, Mari Mário, Angela, Guilherme, Everton, Ticiano, Dani, Kleber, Bu, Marcela, Roberta, Guapa, Arroz, Milton, Estela, Ju Mega, Vanessa, Ju Diniz, Brenda**.....Agradecimento especial aos que estiveram comigo durante todo o período experimental, me ajudaram com conversas, almoços, lendo o que eu escrevia, me dando conselhos, assistindo minhas apresentações, me ouvindo....Obrigada **Rê, Mo, Ju, Van, Bre, Mi, Mari Bati e Rick**....Obrigada mesmo, cada um de vocês teve uma grande importância nesta etapa da minha vida e ficam aqui eternizados...

Aos meus amigos de Ribeirão e da graduação, **Bru, Nath, Ju, Clit, Dercy, Dê, Bu, Mands, Ju, Saulo, Três, Nadia, Leandro, Cauê** que mesmo distantes e fora disso tudo, entenderam a minha ausência e me apoiaram nesta jornada.

Aos **carneiros**...sem a colaboração deles nada disso teria sido realizado.

Por fim, e não menos importante, agradeço à **Deus** por dar calma, paz e serenidade.

“ Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso” – Charles Chaplin

RESUMO

ALVES, M. B. R. **Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade.** [Treatment of testicular degeneration in rams supplemented with vitamin A or low level laser therapy]. 2014. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

A degeneração testicular (DT) possui grande relevância dentre os distúrbios da reprodução e pode ser causada pelo aumento da temperatura testicular. Este provoca aumento do metabolismo celular, levando ao estresse oxidativo (EO) e apoptose. O tratamento usual consiste na retirada do agente causador e administração de antioxidantes; entretanto, pode não ser eficiente. Dessa forma, o presente estudo preconizou o tratamento da DT por meio de agentes com poder proliferativo: vitamina A e laserterapia de baixa intensidade (LTBI). Foram realizados três experimentos; o experimento 1 objetivou definir a dose de energia da LTBI necessária para a bioestimulação testicular. Foram utilizados seis carneiros distribuídos em três grupos: GC) insulação escrotal (IE) e sem tratamento (n=2); G28) IE e tratado com LTBI com 808 nm de comprimento de onda, 30 mW de potência e 28 J/cm² de densidade de energia por 15 dias a cada 48 horas (n=2); G56) IE e tratado com LTBI com 808 nm, 30 mW e 56 J/cm² por 15 dias a cada 48 horas (n=2). Foram feitas análises clínicas, reprodutivas e histopatológicas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Apesar da LTBI diminuir as taxas de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra, esta foi eficiente em aumentar a população celular dos túbulos seminíferos no G28. Portanto, a LBTI provocou efeito bioestimulatório em testículos degenerados de carneiros. O experimento 2 objetivou validar a técnica de avaliação do EO espermático por meio da sonda fluorescente CellROX Deep Red[®]. Foram realizados dois experimentos; o primeiro utilizou ejaculados de três carneiros tratados em T0 (ejaculado não submetido à indução de EO), T50 (50% não induzido e 50% induzido ao EO) e T100 (submetido ao EO). Os dados foram submetidos à regressão linear. No segundo experimento foram utilizados 16 carneiros submetidos à IE. Foram feitas avaliações do EO antes e após a IE. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste LSD de Fisher. O coeficiente de determinação foi de 0,728 e houve aumento do EO após a IE. Assim, a sonda CellROX[®] foi capaz de detectar o EO espermático. No experimento 3 foi proposto tratamento para a DT baseado na suplementação vitamínica ou LTBI. Foram utilizados 33 carneiros distribuídos em seis grupos: CC) sem IE e sem tratamento (n=5); CA) sem IE e tratado com vitamina A IM 120.000 UI/animal, duas

vezes por semana durante três semanas (n=6); CL) sem IE e tratado com LTBI protocolo G28 (experimento 1) (n=5); IC) IE e sem tratamento (n = 5); IA) IE e tratado com vitamina A IM 120.000 UI/animal, duas vezes por semana durante três semanas (n=6); IL) IE e tratado com LTBI protocolo G28 (n=6). Foram realizadas análises clínicas, reprodutivas, hormonais e histopatológicas. Os dados foram analisados usando o procedimento de modelos mistos e os efeitos dos tratamentos foram avaliados utilizando contrastes ortogonais. Não houve efeito benéfico dos tratamentos para as características ultrassonográficas, qualidade espermática, concentração de testosterona e aspectos histopatológicos. Assim, os tratamentos não foram eficientes para melhorar a qualidade espermática nem promover a proliferação celular.

Palavras-chave: Testículos. Ovinos. Insulação escrotal. Termografia. Sondas fluorescentes.

ABSTRACT

ALVES, M. B. R. **Treatment of testicular degeneration in rams supplemented with vitamin A or low level laser therapy.** [Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade]. 2014. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The testicular degeneration (TD) has great significance among the reproductive disorders and one of the main causes is the increase in testicular temperature. High testicular temperature results in increase cellular metabolism, leading to oxidative stress and apoptosis. The treatment consists in removing the causative agent and administration of antioxidants; however, it could be not efficient. The objective of this study is to recommend the treatment of TD by administering agents with proliferative action: vitamin A and low level laser therapy (LLLT). For this, three experiments were conducted. In experiment 1 the objective was to define the dose of energy for LLLT testicular biostimulation; it was used six rams distributed in three groups: GC) scrotal insulation (SI) and untreated (n=2); G28) SI and treated with LLLT with 808 nm, 30 mW and 28 J/cm² of power density for 15 days every 48 hours (n=2); G56) SI and treated with LLLT with 808 nm, 30 mW and 56 J/cm² for 15 days every 48 hours (n=2). Clinics, reproductive and histopathological analyzes were done. Data were subjected to analysis of variance and Tukey test. The rates of sperm with intact acrosome membrane were decreased by LLLT, but the LLLT was effective in increasing the cell population of the seminiferous tubules in the G28. Thus, LLLT was able of causing stimulatory effect in degenerate testis of rams. The objective of experiment 2 was to assess the technique of evaluation of sperm oxidative stress (OS). This study was divided in two experiments; in experiment 1 was used ejaculates of three rams treated in T0 (ejaculate that was not submitted to OS induction), T50 (50% without OS and 50% inducted to OS) and T100 (entire submitted to OS induction). Data obtained were evaluated by linear regression analysis. In experiment 2, sixteen rams were submitted to SI. Analyses of OS were done before and after the SI. Data obtained were evaluated by analysis of variance and Fisher's LSD test. The determination coefficient was of 0.728 and there were increase in sperm showing OS after SI period. Thus, CellROX[®] fluorescent probe was able to detect sperm OS. The objective of experiment 3 was establish a treatment for TD based on vitamin A supplementation or LLLT; 33 rams were distributed in six groups: CC) no SI and non-treated (n=5); CA) no SI and treated with 120,000 IU/animal of IM vitamin A, twice a week for three weeks (n=6); CL) no SI and treated with LLLT G28 protocol (experiment 1) (n=5); IC) SI and untreated (n=5); IA) SI and

treated with 120,000 IU/animal of IM vitamin A, twice a week for three weeks (n=6); IL) SI and treated with LLLT G28 protocol (n=6). Clinics, reproductive, hormonal and histopathological analyzes were performed. Data were analyzed using the mixed models procedure and treatments effects were evaluated using orthogonal contrasts. There was no beneficial effect of treatments for ultrasonographic characteristics, sperm quality, testosterone concentration and histopathological aspects. Thus, the treatments were not effective for improving sperm quality or promoting cell proliferation.

Keywords: Testes. Ovine. Scrotal insulation. Thermography. Fluorescent probes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia do piquete em que ficaram alojados os carneiros do experimento 1 no setor de Ovinocultura e Caprinocultura da Prefeitura do Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo. Ao fundo, as baias que ficaram abertas durante todo o período para garantir o acesso dos animais à área de sombra – Pirassununga - 2013	51
Figura 2 – Fotografia das bolsas testiculares insuladoras nos carneiros do experimento 1. As bolsas foram confeccionadas com uma camada externa impermeável e camada interna antiabrasiva, que ficou em contato direto com a superfície cutânea escrotal do animal – Pirassununga – 2013	52
Figura 3 – Esquema experimental.....	53
Figura 4 – Imagem termográfica da superfície escrotal caudal com as delimitações das áreas consideradas para a determinação da temperatura média da superfície escrotal (TMSE).....	54
Figura 5 – Avaliação computadorizada do movimento espermático pelo programa SCA (Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha).....	55
Figura 6 – Aplicação da LTBI em testículos de carneiro utilizando o aparelho de laser modelo Thera Laser® (DMC Equipamentos Médicos e Odontológicos, São Carlos, Brasil)	58
Figura 7 – Detalhe do corte histopatológico do parênquima testicular de carneiro mostrando como as áreas do túbulo seminífero e do lúmen foram delimitadas (HE, 100 x) feitas no programa NIS-Elements AR® (Nikon, Tóquio, Japão)	60
Figura 8 – Cortes histopatológicos do parênquima testicular de carneiros diferentes (HE, 100x). Em A: Grau 3 (severo) de degeneração testicular. Em B: Epitélio seminífero normal (Grau 0).....	60
Figura 9 – Espermatozoides ovinos corados pela sonda CellROX® e Hoescht 33342. Em A: espermatozoide sem ou com leve estresse oxidativo. Em B: espermatozoide com estresse oxidativo moderado. Em C: espermatozoide com estresse oxidativo intenso	81
Figura 10 – Fotografia dos piquetes em que ficaram alojados os carneiros do experimento 2 no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga - 2013	90

Figura 11 –Fotografia do cocho de água de um dos piquetes em que ficaram alojados os carneiros do experimento 2 no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga - 2013.....	90
Figura 12 –Fotografia da área coberta com fenil e cocho de um dos piquetes em que os carneiros do experimento 2 ficaram alojados no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga - 2013	91
Figura 13 –Fotografia da bolsa utilizada na insulação dos animais do experimento 2 adaptada para carneiros baseada no modelo proposto por Garcia (2004) para bovinos. Em A: vista da posição caudal da bolsa insuladora onde localize-se o sistema de fechamento em velcro. Externamente, a bolsa foi feita com tecido impermeável. Em B: bolsa aberta para visualização do velcro e da camada interna em tecido antiabrasivo – Pirassununga - 2013	93
Figura 14 –Fotografia dos carneiros do experimento 2 com a bolsa insuladora. Em A: animal com bolsa insuladora logo após a colocação. Em B: a esquerda animal com a bolsa insuladora colocada há 24 horas e a direita animal do grupo controle sem a bolsa insuladora – Pirassununga - 2013	93
Figura 15 –Esquema experimental das avaliações clínicas e reprodutivas realizadas nos momentos PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO	94
Figura 16 –Esquema experimental das colheitas de sangue e exames termográficos dos carneiros durante o período de insulação escrotal (momento INSULAÇÃO).....	94
Figura 17 –Imagens ultrassonográficas (M5Vet [®] , Mindray) de corte longitudinal do parênquima testicular de carneiros, probe convexa, 7,5 MHz, em modo-B, evidenciando os escores de homogeneidade dos parênquimas testiculares (0-2)	95
Figura 18 –Imagens ultrassonográficas (M5Vet [®] , Mindray) de corte longitudinal do parênquima testicular de carneiros, probe convexa, 7,5 MHz, em modo-B, evidenciando os escores de hiperecogeneidade dos parênquimas testiculares (0-3)	96
Figura 19 –Imagens ultrassonográficas (M5Vet [®] , Mindray) de corte transversal do plexo pampiniforme de ovino, probe convexa, 7,5 MHz, em modo espectral para determinação do índice de resistência (RI) das artérias supratesticulares.....	96
Figura 20 –Imagens ultrassonográficas (M5Vet [®] , Mindray) de corte transversal do plexo pampiniforme de ovino, probe convexa, 7,5 MHz, em modo	

color-Doppler para determinação do escore de vascularização do plexo pampiniforme (1-5).....	97
Figura 21 – Imagem ultrassonográfica em modo color Doppler (M5Vet [®] , Mindray) de corte longitudinal, probe convexa, 7,5 MHz, do parênquima testicular ovino evidenciando a classificação do escore de vascularização.....	97
Figura 22 – Fotografia da execução do exame termográfico em câmara climática com temperatura controlada a 20° C. A distância em que o animal foi mantido da câmera termográfica foi de 0,9 m – Pirassununga - 2013	98
Figura 23 – Colheita de sangue da veia jugular direita em carneiro do experimento 2 com tubo com acelerador de coagulação para obtenção do soro para dosagem de testosterona – Pirassununga - 2013	99
Figura 24 – Espermatozoides ovinos corados segundo Celeghini et al. (2010) pela técnica da tripla coloração de avaliação das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.....	102
Figura 25 – Espermatozoides ovinos corados com iodeto de propídio para a detecção de fragmentação de DNA pelo kit comercial HALOMAX [®] (Halotech [®] DNA, Madri, Espanha). As setas indicam os espermatozoides que apresentaram fragmentação de DNA e formação de halo em torno da cabeça.....	104
Figura 26 - Cortes histológicos de testículos de carneiros processados e aferidas pelo programa Leica QWin D3.5.1 (2006) para mensuração das áreas do lúmen e do epitélio seminífero (HE, 100 x).....	105

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Gráfico das médias da temperatura média da superfície escrotal (TMSE, ° C) ao longo de todas as avaliações para cada grupo experimental sendo os grupos controle (GC), grupo LTBI tratado com 28 J/cm ² de energia (G28) e grupo LTBI tratado com 56 J/cm ² de energia (G56)	62
Gráfico 2 –	Média dos espermatozoides que apresentaram membrana plasmática íntegra (PI, %) de acordo com os grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm ² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm ² de energia (G56) ao longo do período pós-insulação (T4, T5, T6 e T7).....	65
Gráfico 3 –	Média dos espermatozoides que apresentaram membrana acrossomal íntegra (AI, %) de acordo com os grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm ² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm ² de energia (G56) ao longo do período pós-insulação (T4, T5, T6 e T7).....	66
Gráfico 4 –	Média dos espermatozoides que apresentaram alto potencial de membrana mitocondrial (AP, %) de acordo com os grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm ² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm ² de energia (G56) ao longo do período pós-insulação (T4, T5, T6 e T7)	66
Gráfico 5 –	Média ± erro padrão da média do estresse oxidativo espermático (%) obtida nos tratamentos T0 (sem indução de estresse oxidativo), T50 (50% de indução de estresse oxidativo) e T100 (100% de indução de estresse oxidativo).....	82
Gráfico 6 –	Regressão linear do estresse oxidativo em espermatozoides ovinos detectados por CellROX Deep Red Reagent® submetidos aos tratamentos T0 (sem indução de estresse oxidativo), T50 (50% de indução de estresse oxidativo) e T100 (100% de indução de estresse oxidativo).....	83
Gráfico 7 –	Média da temperatura média da superfície escrotal (TMSE, ° C) de carneiros submetidos (insulados) ou não (controle) à insulação testicular um dia antes da colocação das bolsas insuladoras	110
Gráfico 8 –	Média da concentração sérica de testosterona (ng/mL) de carneiros submetidos (insulados) ou não (controle) à insulação testicular um dia antes (In-1) da colocação das bolsas insuladoras.....	111
Gráfico 9 –	Média da concentração sérica de testosterona (ng/mL) de carneiros submetidos ou não à insulação testicular 48h (In1) após a colocação das bolsas insuladoras	111

Gráfico 10 – Média da concentração sérica de testosterona (ng/mL) de carneiros submetidos ou não à insulação testicular após 48h (In4) da retirada das bolsas insuladoras	112
Gráfico 11 – Média $\pm$ erro padrão da concentração sérica de testosterona (ng/mL) de carneiros submetidos ou não à insulação testicular antes (In-1); durante (In1) e depois (In4) da insulação testicular	112
Gráfico 12 – Média da motilidade total (%) de espermatozoides ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)	118
Gráfico 13 – Média de defeitos espermáticos maiores (%) de espermatozoides ovinos nos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)	118
Gráfico 14 – Média de defeitos espermáticos totais (%) de espermatozoides ovinos nos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)	119
Gráfico 15 – Média das células com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA, %) no sêmen de ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)	121
Gráfico 16 – Média de espermatozoides ovinos sem ou com leve estresse oxidativo (%) nos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9).	122
Gráfico 17 – Média de DNA íntegro (%) de espermatozoides ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9).	122

- Gráfico 18 – Média da concentração sérica de testosterona (ng/dL) de ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9) 123
- Gráfico 19 – Média $\pm$ erro padrão da relação epitélio/túbulo seminífero (%) de testículos ovinos nos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, 145 dias após a insulação testicular 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Período da espermatogênese para as principais espécies de animais domésticos em dias	36
Tabela 2 –	Divisão dos grupos experimentais realizada no experimento 1 e características dos animais utilizados para o experimento 1 no tocante a idade, raça e peso (kg)	51
Tabela 3 –	Médias $\pm$ erro padrão da temperatura média da superfície escrotal (TMSE, °C) de todos os grupos sendo os grupos controle (GC), grupo LTBI tratado com 28 J/cm ² de energia (G28) e grupo LTBI tratado com 56 J/cm ² de energia (G56) nos momentos antes (M-8, M-5, M-1 e M0) e após (M3, M4, M6, M10, M17, M24 e M31) a colocação das bolsas insuladoras mostrando diferença ao longo do tempo	62
Tabela 4 –	Médias $\pm$ erro padrão das características da cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyser (SCA) ao longo dos tempos experimentais (T1 a T7). Motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPROG, %), velocidade do trajeto (VAP, μ m/s), velocidade progressiva (VSL, μ m/s), velocidade curvilínea (VCL, μ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, μ m), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).....	63
Tabela 5 –	Média $\pm$ erro padrão de defeitos espermáticos maiores, menores e totais (%) ao longo de todo o período experimental nos grupos controle (GC), grupo LTBI tratado com 28 J/cm ² de energia (G28) e grupo LTBI tratado com 56 J/cm ² de energia (G56) sem diferença entre os grupos	64
Tabela 6 -	Média $\pm$ erro padrão das células PIAIA (%) (membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial) de acordo com o tempo de avaliação considerando todo o período experimental	65
Tabela 7 –	Média $\pm$ erro padrão dos espermatozoides que apresentaram membrana plasmática íntegra (PI, %), membrana acrossomal íntegra (AI, %), alto potencial de membrana mitocondrial (AP, %) e espermatozoides com membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA, %) de acordo com os grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm ² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm ² de energia (G56) ao longo do período pós-insulação (T4, T5, T6 e T7).....	66

Tabela 8 –	Média ± erro padrão da relação lúmen/lúmen + epitélio seminífero (%) feita no exame histopatológico dos testículos ($p < 0,001$) dos animais dos grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm ² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm ² de energia (G56) e análise descritiva do grau de degeneração destes testículos	67
Tabela 9 –	Média ± erro padrão do estresse oxidativo espermático (%) antes (controle) e após a degeneração testicular em ovinos.....	83
Tabela 10 –	Média ± erro padrão da consistência testicular, motilidade total, motilidade progressiva, defeitos espermáticos maiores, menores e totais, das células com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial dos grupos CC e IC antes e após insulação	109
Tabela 11 -	Média ± erro padrão das características ultrassonográficas avaliadas durante o período experimental nos tempos T1 a T9.....	114
Tabela 12 –	Média ± erro padrão do escore de homogeneidade do parênquima testicular direito (HoPD) nos tempos T1 a T9.....	115
Tabela 13 –	Média ± erro padrão das características espermáticas avaliadas durante o período experimental nos tempos T1 a T9.....	117
Tabela 14 –	Média ± erro padrão dos defeitos espermáticos maiores e totais (%) nos tempos T1 a T9.....	120
Tabela 15 –	Média ± erro padrão da concentração sérica de testosterona (ng/mL) e da relação epitélio seminífero/túbulo seminífero (%) de testículos de ovinos nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9).....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
AI	membrana acrossomal íntegra
ALH	amplitude lateral de cabeça
AMP	adenosina monofosfato
AP	alto potencial de membrana mitocondrial
ATP	adenosina trifosfato
BCF	frequência de batimento
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
cm	centímetro
DNA	ácido desoxirribonucleico
FeSO_4	sulfato de ferro
g	força centrífuga
H_2DCF	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
h	hora
H33342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
IM	intra muscular
J	Joule
Kg	quilogramas

LIN	linearidade
LTBI	laserterapia de baixa intensidade
Mcal	megacaloria
mg	miligrama
min	minuto
mM	milimolar
mL	mililitro
MPROG	motilidade progressiva
MT	motilidade total
mW	miliwatts
Na	sódio
nm	nanômetro
ng	nanograma
p	probabilidade
PI	membrana plasmática íntegra
PIAIA	membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial
ppm	partes por milhão
PROC	procedimento
r	coeficiente de correlação
R ²	coeficiente de determinação
ROS	espécies reativas de oxigênio
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>

STR	retilinearidade
TMSE	temperatura média da superfície escrotal
UI	unidade internacional
VAP	velocidade média do trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

-	menos
%	por cento
/	por
:	para (1:1)
<	menor
>	maior
$\geq$	maior ou igual
$\leq$	menor ou igual
=	igual
$\pm$	mais ou menos
®	marca registrada
° C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	27
---	-------------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

2	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1	ASPECTOS ANATÔMICOS IMPORTANTES PARA A TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR	30
2.2	DEGENERAÇÃO TESTICULAR.....	32
2.3	FORMAS DE DIAGNÓSTICO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR.....	35
2.3.1	AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO DA DEGENERAÇÃO.....	35
2.3.2	EXAMES COMPLEMENTARES: ULTRASSONOGRAFIA BIDIMENSIONAL E COLOR-DOPPLER E TERMOGRAFIA COMO FERRAMENTAS PARA O DIAGNÓSTICO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR.....	41
2.4	TERAPIAS UTILIZADAS PARA A DEGENERAÇÃO TESTICULAR	44

CAPÍTULO 2

4	EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE ENERGIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NO TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM OVINOS	48
4.1	INTRODUÇÃO.....	48
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.2.1	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL	50
4.2.2	ANIMAIS E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS	50
4.2.3	MENSURAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL E ESCROTAL	53
4.2.4	AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA.....	54
4.2.5	LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE.....	57
4.2.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	58
4.2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
4.3	RESULTADOS	61
4.4	DISCUSSÃO.....	67
4.5	CONCLUSÕES.....	70
	APÊNDICES	71

CAPÍTULO 3

5	USO DE CELLROX DEEP RED® PARA A DETECÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZOIDE OVINO POR MEIO DE INDUÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>.....	76
5.1	INTRODUÇÃO.....	76
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	78
5.2.1	EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO POR CELLROX DEEP RED REAGENT® EM ESPERMATOZOIDE	78

5.2.2	EXPERIMENTO 2: INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZOIDE OVINO POR MEIO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR.....	80
5.3	RESULTADOS	82
5.3.1	EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO POR CELLROX DEEP RED REAGENT[®] EM ESPERMATOZOIDE	82
5.3.2	EXPERIMENTO 2: INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZOIDE OVINO POR MEIO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR.....	83
5.4	DISCUSSÃO.....	84
5.5	CONCLUSÃO.....	86

CAPÍTULO 4

6	TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM CARNEIROS COM SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A OU LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE	88
6.1	INTRODUÇÃO.....	88
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	89
6.2.1	LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO	89
6.2.2	ANIMAIS E INSTALAÇÕES	89
6.2.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	92
6.2.4	AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS	95
6.2.5	AVALIAÇÕES TERMOGRÁFICAS	98
6.2.6.	DOSAGEM SÉRICA DE TESTOSTERONA	99
6.2.7	AVALIAÇÕES REPRODUTIVAS	100
6.2.8	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	105
6.2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	106
6.3	RESULTADOS	107
6.3.1	EFEITO DA INSULAÇÃO	107
6.3.2	EFEITO DOS TRATAMENTOS.....	112
6.4	DISCUSSÃO.....	125
6.4.1	EFEITO DA INSULAÇÃO	125
6.4.2	EFEITO DOS TRATAMENTOS.....	128
6.5	CONCLUSÃO.....	131
	APÊNDICES	132
7	CONCLUSÕES GERAIS	142
7.1	EXPERIMENTO 1	142
7.2	EXPERIMENTO 2	142
7.3	EXPERIMENTO 3.....	143

REFERÊNCIAS	144
--------------------------	-----

ANEXOS	157
---------------------	-----

1 INTRODUÇÃO GERAL

A degeneração testicular possui grande relevância dentre os distúrbios da reprodução. Esta pode acometer além das mais diversas espécies de animais domésticos e selvagens, o homem. Ainda, a degeneração testicular ocorre com grande frequência, sendo relatada como a causa mais frequente da infertilidade em touros e garanhões (VALE FILHO et al., 1974; ALVARENGA; PAPA, 2009). A grande importância deste distúrbio está no fato de causar uma impotência do tipo *generandi*, em que o macho é capaz de montar, mas apresenta prejuízo nas taxas de fecundação do oócito, por haver comprometimento da qualidade espermática.

O aumento da temperatura testicular, que pode ser causado por diversos fatores, tais como traumas, inflamações, altas temperaturas ambientais, provoca aumento concomitante do metabolismo celular, levando às células presentes nos testículos a entrarem em estado de hipóxia. Dessa forma, há um desbalanço na quantidade de espécies reativas de oxigênio, culminando no estresse oxidativo e, consequente fragmentação de DNA, levando à apoptose das células dos túbulos seminíferos (SETCHELL, 1998; PAUL et al., 2008, 2009; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009). O distúrbio pode ser induzido experimentalmente pelo aumento da temperatura testicular por meio da insulação escrotal, indução do criptorquidismo ou aumento rápido da temperatura testicular por meio da imersão dos testículos em água quente, por exemplo (SETCHELL, 1998; BRITO et al., 2003; PAUL et al., 2008, 2009; VIGUERAS-VILLASEÑOR et al., 2011).

O prognóstico reprodutivo e a resposta ao tratamento dependerão do grau de comprometimento do epitélio seminífero. Atualmente, preconiza-se a retirada do agente causador e a administração de agentes antioxidantes como soluções terapêuticas para minimizar os danos provocados pela doença (ALVARENGA; PAPA, 2009). Entretanto, muitas vezes o diagnóstico é realizado em um estágio em que o agente causador já não está mais presente e a administração de agentes antioxidantes não será eficiente.

O poder proliferativo da vitamina A e da laserterapia de baixa intensidade os tornam grandes alternativas no tratamento dos casos de degeneração em que o agente causador não está mais presente, ou seja, nos casos em que o estresse oxidativo deixou de ser o fator principal. Em carneiros deficientes de vitamina A já foram observadas atrofia dos órgãos sexuais acessórios e degeneração testicular (ZERVOS et al., 2005) e, em ratos, essa deficiência levou à diminuição da concentração plasmática de testosterona (LIVERA et al.,

2002). A laserterapia de baixa intensidade (LTBI) possui efeito bioestimulatório em diversos tecidos e células (HALCIN; UITO, 1997; MESTER, 2013; WU et al., 2013) e foi eficaz em promover o aumento da quantidade de espermátócitos e espermátides no epitélio seminífero de ratos (TAHA; VALOJERDI, 2004).

Dessa forma, o presente estudo pretende encontrar formas alternativas de tratamento para casos de degeneração testicular em que o insulto não está mais presente. Tendo em vista o prejuízo causado às células germinativas da linhagem espermática na degeneração de grau moderado, as terapias preconizadas no presente trabalho têm como objetivo principal aumentar a taxa de proliferação celular, levando a uma recuperação mais rápida do epitélio seminífero. Os tratamentos preconizados com este objetivo foram: administração por via intramuscular de vitamina A (Monovin A[®], Bravet, Brasil) e a LTBI realizada diretamente nos testículos dos animais com o aparelho modelo Thera Laser[®] (DMC Equipamentos Médicos e Odontológicos, São Carlos, Brasil).

Para isso, o trabalho foi dividido em três experimentos. O experimento 1 teve como objetivo testar duas doses de energia da LTBI que causasse proliferação celular nos túbulos seminíferos. O experimento 2 foi realizado para validar a técnica de avaliação do estresse oxidativo dos espermatozoides utilizada no experimento 3. E, por fim, o experimento 3 objetivou comparar a LTBI (na dose ideal obtida no experimento 1) com a suplementação com vitamina A no tratamento da degeneração testicular. Os três experimentos utilizaram a espécie ovina como modelo experimental.

A dissertação está estruturada em capítulos. No capítulo 1 há a revisão de literatura. Em seguida, no capítulo 2 está o artigo referente ao experimento 1, no qual foi avaliada e estabelecida a dose de energia da LTBI a ser utilizada no experimento 3. No capítulo 3 há o artigo referente ao experimento 2. Por fim, o capítulo 4 descreve o experimento 3, referente à influência dos tratamentos com vitamina A e LTBI sobre a degeneração testicular.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

“Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge com nossos pensamentos. Com nossos pensamentos, fazemos o nosso mundo” – Buda

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o intuito de expor as novas técnicas de diagnóstico e tratamentos para a degeneração testicular, foram compilados dados literários abrangendo aspectos ligados às particularidades anatômicas testiculares, bem como prevalência, fatores predisponentes, etiopatogenia, formas de diagnóstico e tratamentos no tocante à degeneração testicular.

2.1 ASPECTOS ANATÔMICOS IMPORTANTES PARA A TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR

A evolução da localização anatômica testicular é muito debatida. Na maioria dos mamíferos domésticos, os testículos estão alojados em uma bolsa, o escroto, e ficam localizados externamente à cavidade abdominal (HANSEN, 2009). Porém, existem algumas exceções, como os elefantes, por exemplo, em que não há o escroto e os testículos estão localizados internamente à cavidade abdominal (GAETH et al., 1999).

Existem várias hipóteses formuladas com o objetivo de explicar a origem do escroto (KLEISNER et al., 2010). A hipótese mais antiga e popular é baseada na “*cooling hypothesis*” proposta por Moore¹ (1926 apud KLEISNER et al., 2010, p.27) que consiste em afirmar que a espermatogênese somente ocorrerá de maneira ideal se os testículos estiverem em condições em que a temperatura destes fique menor do que a temperatura corporal e, por isso, os testículos ficariam localizados externamente à cavidade abdominal. Entretanto, contradizendo esta hipótese, há alguns mamíferos que possuem testículos internos e possuem funções testiculares e epididimárias normais (GLOVER, 1973).

Werdelin e Nilsson (1999) sugerem que o escroto, ao longo da evolução, foi sendo perdido pelos mamíferos, pois a descida testicular é um processo de grande demanda energética. Os autores acreditam que o escroto continuará a desaparecer ao longo da evolução, conforme a espermatogênese for sendo menos dependente de baixas temperaturas (WERDELIN; NILSSON, 1999). Por outro lado, Kleiner et al. (2010) sugerem que as

¹MOORE, K.L. The biology of the mammalian testis and scrotum. *The Quarterly Review of Biology*, v. 1, p. 4-50, 1926.

diferenças das localizações testiculares são resultantes das diferentes pressões de seleção com o objetivo de permitir pleno desenvolvimento e armazenamento espermático e proteger as gônadas de agentes físicos, distúrbios fisiológicos e mutações do DNA (KLEISNER et al., 2010), além de levar a menor vascularização testicular permitindo que as mitocôndrias tenham maior desenvolvimento do sistema enzimático do metabolismo oxidativo, fazendo com que tenham maior capacidade aeróbica e então os espermatozoides tenham mais atividade e as células germinativas mais capacidade de realizar divisões (FREEMAN, 1990). Ainda, há espécies, como os cetáceos, que apesar de os testículos estarem localizados internamente à cavidade abdominal, possuem mecanismos para que a temperatura fique mais baixa que a corporal e possibilite a espermatogênese plena (SETCHELL, 1998).

Apesar de diferentes teorias sobre a evolução da localização anatômica testicular, a espermatogênese, na maioria dos mamíferos domésticos e na espécie humana, ocorre de maneira plena quando os testículos estão em temperaturas mais baixas que a temperatura interna corporal (HANSEN, 2009). Dessa forma, do ponto de vista anatômico, os testículos nesses mamíferos estão localizados externamente à cavidade abdominal permitindo com que a temperatura dessas gônadas fique abaixo da temperatura interna corporal (HANSEN, 2009) constituindo um processo chamado de termorregulação testicular.

A termorregulação testicular consiste na manutenção da temperatura testicular cerca de 2 a 6° C abaixo da temperatura corporal, permitindo que a espermatogênese ocorra normalmente (KASTELIC et al., 1996a,b). O plexo pampiniforme, os músculos da túnica *dartus* e cremaster, a superfície escrotal e as glândulas sudoríparas escrotais são fundamentais para que a temperatura testicular seja inferior à temperatura corporal (BLAZQUEZ et al., 1988; HANSEN, 2009).

O plexo pampiniforme, localizado no funículo espermático, consiste em um entrelaçamento de artérias e veias, que permite que o sangue arterial seja resfriado pelo sangue venoso, vindo dos testículos, antes de chegar aos testículos (KASTELIC et al., 1996a; HANSEN, 2009; BARROS et al., 2011). A túnica *dartus*, estrutura de fibras musculares lisas, localizada abaixo da pele escrotal, é responsável por regular a temperatura dos testículos. A presença de nervos sensitivos alocados na superfície escrotal permite que a túnica *dartus* contraia ou relaxe de acordo com a temperatura escrotal (SENGER, 2003). Já o músculo estriado cremaster é responsável pelo controle da posição do escroto em relação ao corpo (HANSEN, 2009) e sua função principal parece ser alterar o fluxo sanguíneo no testículo quando contrai e relaxa permitindo a termorregulação (SENGER, 2003).

A superfície escrotal possui importância pela sua capacidade de radiação, havendo

maior troca de calor evitando aumento brusco de temperatura nos testículos (KASTELIC et al., 1997). Ademais, a superfície escrotal se faz importante para a termorregulação pelo fato de nesta estarem presentes as glândulas sudoríparas, que promovem a evaporação na superfície escrotal resfriando os testículos (MOULE; WAITES, 1963), sendo mais importante a densidade do que propriamente a quantidade destas (BLAZQUEZ et al., 1988; PÉREZ-CRESPO et al., 2008). Ainda, há nervos termossensitivos localizados no escroto que são responsáveis pela regulação do grau de sudorese escrotal e da frequência respiratória do animal (SENGER, 2003).

2.2 DEGENERAÇÃO TESTICULAR

O aumento da temperatura testicular e a consequente perda da termorregulação dos testículos faz com que ocorra um processo chamado de degeneração testicular (MOULE; WAITES, 1963). A perda da termorregulação testicular ocasionada por processos que levam ao aumento da temperatura testicular pode ocorrer em diversas situações. Altas temperaturas ambientais, processos febris sistêmicos, criptorquidismo, dermatites escrotais, edema, hidrocele e excesso de gordura escrotal podem levar a degeneração testicular por ocasionarem aumento de temperatura testicular (SETCHELL, 1998; NASCIMENTO, SANTOS, 2003; ALVARENGA; PAPA, 2009; HANSEN, 2009; VIGUERAS-VILLASEÑOR et al., 2011) e consequente perda da termorregulação testicular. Ainda, a degeneração testicular pode ocorrer consequente a infecções, inflamações ou traumas testiculares, a lesões vasculares e a deficiências nutricionais, como a deficiência de vitamina A (LIVERA et al., 2002; NASCIMENTO; SANTOS, 2003; ZERVOS et al., 2005). Os fatores auto-imunes decorrentes da perda da barreira hematotesticular, a obstrução da cabeça do epidídimo, a ação de agentes químicos, físicos, tóxicos e distúrbios endócrinos como a administração de esteroides anabolizantes também podem levar à degeneração testicular (NASCIMENTO; SANTOS, 2003; ALVARENGA; PAPA, 2009; SAKR et al., 2011; ALMASIOVA et al., 2012). Dessa forma, a degeneração testicular é um distúrbio reprodutivo de grande importância para o homem e para os animais, visto que possui fatores predisponentes multifatoriais.

A degeneração testicular, no entanto, geralmente não resulta na diminuição da libido do macho acometido e o distúrbio pode levar à infertilidade transitória total ou parcial

(PÉREZ-CRESPO et al., 2008) caracterizando uma impotência *generandi* (LAGERLOF, 1938). Dessa forma, este distúrbio tem grande importância do ponto de vista reprodutivo, já que o macho terá a capacidade de fecundar o oócito diminuída, mas continuará a cobrir as fêmeas, levando a grandes prejuízos econômicos e afetivos. Ademais, possui notável destaque por ser a causa mais comum de infertilidade ou redução da mesma em machos (LAGERLOF, 1938; VALE FILHO et al., 1974; ALVARENGA; PAPA, 2009).

A classificação da degeneração testicular pode ser feita em grau 1 (leve), grau 2 (moderada) ou grau 3 (grave) (LAGERLOF, 1938; BICUDO et al., 2007) dependendo da injúria causada ao epitélio seminífero e, conseqüentemente, à produção espermática; sendo que os espermatócitos são as células mais sensíveis, seguidos das espermátides, dos espermatozoides e das espermatogônias (SETCHELL, 1998; PÉREZ-CRESPO et al., 2008).

Na degeneração testicular de graus 1 e 2, o macho tem queda da fertilidade não acompanhada de alterações clínicas gerais e do sistema reprodutivo (LAGERLOF, 1938). A motilidade espermática pode-se manter inalterada ou ter uma leve queda e a presença de alterações morfológicas dos espermatozoides pode aumentar levemente (grau 1) ou consideravelmente (grau 2) (LAGERLOF, 1938; BICUDO et al., 2007). Nesses casos de degeneração leve ou moderada, as espermatogônias, as células de Sertoli e as células de Leydig podem voltar a desempenhar suas funções normalmente após a remoção do agente causador da degeneração testicular (MOULE; WAITES, 1963; BICUDO et al., 2007). Na degeneração grau 3, há alterações clínicas no sistema reprodutivo (LAGERLOF, 1938). Os valores da concentração, motilidade e quantidade de espermatozoides normais ficam extremamente baixos e é possível notar a presença de células gigantes (LAGERLOF, 1938). Nesses casos, em que há um insulto crônico, a espermatogênese pode estar totalmente comprometida levando a uma esterilidade do animal acometido (BICUDO et al., 2007).

Em cães sem raça definida de porte médio e grande da região de São João da Boa Vista, SP, Brasil, a degeneração testicular foi o distúrbio reprodutivo mais frequentemente encontrado, seguida pela epididimite (THOMÉ et al., 2007). No exame histopatológico dos testículos de 1000 animais, dentre eles bovinos, equinos, suínos e caninos, a degeneração foi encontrada em 41% deles, sendo a alteração testicular de maior ocorrência (LAGERLOF, 1938).

A degeneração testicular foi relatada como a maior causa de baixa fertilidade em garanhões do Brasil (ALVARENGA; PAPA, 2009). Os autores relatam que a babesiose atua como fator determinante para a ocorrência do distúrbio, além do fato dos garanhões chegarem a viver idades mais avançadas e nessa fase apresentarem dificuldade para realizar os

mecanismos de termorregulação, predispondo ao distúrbio (ALVARENGA; PAPA, 2009).

Em levantamento feito no Brasil com 628 touros, a degeneração testicular foi a causa mais frequente (40,3% dos animais avaliados) nos casos de baixa fertilidade ou infertilidade (VALE FILHO et al., 1974). Em bovinos de origem europeia (*Bos taurus*) criados em regiões de clima semi-árido, subtropical e tropical essa doença é corriqueiramente diagnosticada devido a não adaptação de determinadas raças às altas temperaturas destas regiões (KUMIDIKA et al., 1981; WILDEUS; HAMMOND, 1993; BRITO et al., 2004). A vascularização e a morfologia testicular de bovinos indianos (*Bos indicus*) parecem contribuir para a maior resistência destes às altas temperaturas em relação a bovinos *Bos taurus* (BRITO et al., 2003, 2004). O escroto de bovinos indianos possui maior número de glândulas sudoríparas, maior superfície cutânea, maior comprimento da artéria testicular e menor espessura da parede arterial (BRITO et al., 2003, 2004). Ademais, o plexo pampiniforme destes animais possui uma circulação artério-venosa em contato muito íntima permitindo com que ocorra um resfriamento mais eficiente do sangue arterial (BRITO et al., 2004).

No tocante à etiopatogenia, a doença ocorre normalmente com o aumento da temperatura testicular. Este aumento provoca aumento concomitante do metabolismo celular sem aumento proporcional, no entanto, da vascularização testicular, levando a hipóxia celular (SETCHELL, 1998; PAUL et al., 2009). Consequentemente, as células em hipóxia sofrem um desbalanço na quantidade de espécies reativas de oxigênio e entram em estresse oxidativo (SETCHELL, 1998; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009; PAUL et al., 2009). O estresse oxidativo, por sua vez, pode levar a alterações nucleares como a descondensação da cromatina, a fragmentação de DNA (PAUL et al., 2008) e a alteração no formato nuclear (FERNANDES et al., 2008).

De maneira geral, a indução da degeneração testicular pode ser realizada experimentalmente pela indução do criptorquidismo, pelo aumento da temperatura testicular por um curto período e por meio da insulação escrotal (SETCHELL, 1998). O criptorquidismo pode ser induzido por meio de procedimento cirúrgico ou pela administração de flutamida para as fêmeas gestantes (SETCHELL, 1998; VIGUERAS-VILLASEÑOR et al., 2011). A imersão dos testículos por um curto período em água quente se mostra eficaz na indução de prejuízos às células da espermatogênese de ratos (PAUL et al., 2008, 2009). Por fim, a insulação escrotal é uma maneira muito eficiente de promover a perda da termorregulação testicular e consequente dano à qualidade espermática e ao epitélio seminífero. Diversos estudos mostram prejuízos à qualidade espermática por meio da colocação de bolsas insuladoras testiculares (VOGLER et al., 1993; LOVE; KENNEY, 1999;

BRITO et al., 2003; GARCIA, 2004; RAHMAN et al., 2011). A colocação de bolsa insuladora somente na região do cordão espermático também se mostrou eficaz para causar prejuízos à qualidade espermática (KASTELIC et al., 1996).

2.3 FORMAS DE DIAGNÓSTICO DA DEGENERACÃO TESTICULAR

O diagnóstico da degeneração testicular pode ser feito a partir do exame andrológico. Neste exame podem ser encontradas alterações da consistência testicular e da circunferência escrotal, além de alterações ultrassonográficas. Porém, somente essas constatações não são suficientes para a conclusão do diagnóstico sendo necessária a colheita e avaliação do ejaculado (LAGERLOF, 1938; BARTH; OKO, 1989; BICUDO et al., 2007; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009).

2.3.1 Avaliação espermática aplicada ao diagnóstico da degeneração

Na avaliação do sêmen de animais apresentando degeneração testicular, a concentração e a motilidade espermática podem estar diminuídas e a proporção de espermatozoides com alterações morfológicas pode estar aumentada conforme o grau de degeneração. As alterações de cabeça e cauda, cabeças isoladas e gotas citoplasmáticas proximais são os defeitos espermáticos mais encontrados nesse distúrbio (LAGERLOF, 1938; BARTH; OKO, 1989; BICUDO et al., 2007; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009).

Para a realização do diagnóstico, é de grande valia o conhecimento do período de passagem dos espermatozoides pela cabeça, corpo e cauda do epidídimo que no carneiro dura de 13 a 15 dias (SWIERSTRA, 1968), bem como a duração da espermatogênese para as diferentes espécies (Tabela 1). Desta forma, alterações relacionadas ao epidídimo serão as primeiras a serem notadas no ejaculado. Além disso, a recuperação da produção espermática terá relação direta com o período de espermatogênese da espécie. Estudos com equinos, touros e carneiros mostram que as alterações relacionadas à maturação epididimária, gotas citoplasmáticas proximais e distais associadas a defeitos de cauda, começam a aparecer nos primeiros 15 dias após o insulto (MOREIRA et al., 2001; ALVARENGA; PAPA, 2009; RAHMAN et al., 2011).

Tabela 1 - Período da espermatogênese para as principais espécies de animais domésticos em dias

Espécie	Período da espermatogênese (dias)
Ovinos	47 (42-53)
Bovinos	61
Equinos	55
Suínos	39
Coelhos	48

Fonte: (SENGER, 2003)

Aproximadamente 15 a 30 dias após o insulto, em garanhões e carneiros, é notado aumento da quantidade de cabeças isoladas no ejaculado e presença de espermatozoides com gotas protoplasmáticas proximais (MOREIRA et al., 2001; ALVARENGA; PAPA, 2009). Após 30 dias decorridos da injúria, a presença de gotas protoplasmáticas proximais ainda ocorre juntamente com cabeças subdesenvolvidas, células redondas e formas teratogênicas nesta espécie (ALVARENGA; PAPA, 2009).

No aumento da temperatura testicular causado pela colocação de bolsas insuladoras por 48 horas em seis touros Holandeses, a motilidade começou a apresentar queda 12 dias após a colocação da bolsa e, nesse mesmo dia, a presença de defeitos no ejaculado começou a aumentar (VOGLER et al., 1993). Dezoito dias após a colocação da bolsa, os touros apresentaram a maior porcentagem de defeitos no ejaculado ($86,3 \pm 24,3\%$), sendo os mais frequentes: cabeças isoladas (12 a 15 dias após a colocação da bolsa), defeitos de diadema (*diadem defect*; vacúolos nucleares alinhados na região equatorial; 18 dias após), cabeça piriforme e vacúolos nucleares (*pouch formation*; 21 dias após), defeitos de acrossoomo (*knobbed sperm*; 27 dias após) e cauda fortemente enrolada (*Dag defect*; 30 dias após) (VOGLER et al., 1993).

Em cachaços submetidos a uma temperatura ambiental elevada por 90 dias, quando comparados com cachaços não submetidos a este estresse térmico, houve queda da motilidade espermática após duas semanas do início do estresse sendo esta queda mais acentuada da terceira a sexta semana após o início do estresse ($85,3 \pm 3,7\%$ para o grupo controle x $46,4 \pm 3,7\%$ para o grupo estressado) (WETTEMANN et al., 1976). Nesses animais houve aumento da presença de anormalidades na morfologia espermática a partir da segunda semana após o início do estresse (WETTEMANN et al., 1976).

A exposição ao calor ($40,5^{\circ}\text{C}$) de 12 carneiros da raça Merino por dois períodos de seis horas diárias durante três dias resultou na presença de anormalidades espermáticas nos ejaculados colhidos 12 a 21 dias após o estresse (MOULE; WAITES, 1963). Os defeitos

espermáticos mais frequentemente encontrados no ejaculado desses animais foram: cabeça isolada e cauda enrolada (MOULE; WAITES, 1963).

A maioria dos estudos descrevem os prejuízos à motilidade, concentração e morfologia espermática. Entretanto, as análises clássicas (concentração, motilidade e morfologia espermáticas) por serem subjetivas podem muitas vezes não denotar a necessária precisão (ARRUDA et al., 2011) e assim, seus resultados podem não corresponder à realidade, gerando diagnósticos errôneos. Os programas computadorizados de análise de motilidade e a utilização de sondas fluorescentes para a verificação da integridade e função celular (ARRUDA et al., 2011) podem ser métodos muito importantes na avaliação de espermatozoides de animais que apresentem degeneração testicular, porém ainda não estão bem estabelecidas as características de motilidade que são afetadas pela degeneração testicular e as funções da célula espermática que são comprometidas nesse distúrbio.

2.3.1.1 Avaliação computadorizada das características da cinética espermática

Os valores da motilidade total, da motilidade progressiva e da velocidade rápida, avaliadas pelo sistema computadorizado de análise de motilidade de espermatozoides (CASA) utilizando o aparelho Hamilton-Thorne Motility Analyser de carneiros submetidos à insulação escrotal por 16 horas por dia durante 21 dias consecutivos, diminuíram nos carneiros insulados quando comparados aos não insulados. A motilidade total apresentou queda nos primeiros 20 dias após a insulação. As características velocidade de trajeto (VAP), amplitude lateral da cabeça (ALH), velocidade curvilínea (VCL) e velocidade progressiva (VSL) apresentaram queda nos primeiros 20 dias e foram aumentando gradativamente após os 20 dias de insulação, retornando aos valores iniciais do período pré insulação (ARMAN et al., 2006).

2.3.1.2 Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial espermáticas

O advento da avaliação espermática por meio da utilização de sondas fluorescentes é

de grande importância para a andrologia, pois as análises espermáticas tornaram-se mais minuciosas, detalhistas e específicas, uma vez que é possível detectar alterações em estruturas espermáticas isoladas relacionadas à função espermática (GILLAN et al., 2005). Nas espécies domésticas, as avaliações espermáticas através do uso de sondas fluorescentes tem tido cada vez mais destaque (ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007, 2010). A avaliação da integridade da membrana plasmática, integridade da membrana acrossomal e do potencial de atividade mitocondrial possui grande importância para a análise da atividade e função espermática (ERICSSON et al., 1993; GRAVANCE et al., 2001), visto que a membrana plasmática está diretamente relacionada com a viabilidade celular (BORGES et al., 2011), a estrutura acrossomal com a capacidade fecundante (OSMANL et al., 1989; BRENER et al., 2002) e a mitocôndria com a produção de energia celular (GRAVANCE et al., 2001).

A porcentagem de células com a membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de mitocôndria foi verificada em touros submetidos previamente à insulação escrotal por 96 horas. Duas semanas após o insulto, a porcentagem de células desta categoria foi de $4,38 \pm 2,40\%$ em animais submetidos à insulação, sendo significativamente reduzida ($p=0,0003$) quando comparada aos animais não insulados (controle) em que este percentual foi de $49,5 \pm 12,01\%$. Aproximadamente dois meses após o insulto, os grupos controle e insulado já apresentavam valores semelhantes na quantidade dessas células, sendo a porcentagem de células no grupo controle de $50 \pm 14,06\%$ e no grupo insulado de $63,75 \pm 4,26\%$ ($p>0,05$) (GARCIA, 2004).

2.3.1.3 Avaliação do estresse oxidativo espermático

O estresse oxidativo e a fragmentação do material genético são outras alterações da célula espermática que podem ser verificadas durante a degeneração testicular. As espécies reativas de oxigênio (ROS), formadas em grande quantidade durante este distúrbio, geram um desbalanço no equilíbrio ROS x agentes antioxidantes, ocasionando o estresse oxidativo, que, por sua vez, leva à peroxidação da membrana plasmática espermática e à fragmentação de DNA espermático (GUTHRIE; WELCH, 2012). Em baixas quantidades, as ROS, tais como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico, desempenham papéis fundamentais na capacitação espermática (GUTHRIE; WELCH, 2012). Porém, seu desbalanço é prejudicial para a célula.

Atualmente, existem formas de mensurar a quantidade de agentes antioxidantes e oxidantes no sêmen e no espermatozoide. A quimioluminescência é a técnica mais usada para este fim, porém possui limitações por não diferenciar a produção de ROS espermática da produção leucocitária (AITKEN et al., 2013). A citometria de fluxo e a espectrofotometria também podem ser utilizadas com este fim (AITKEN et al., 2013). Os agentes antioxidantes podem ser quantificados também pela quimioluminescência e pelas dosagens imunocitoquímica e enzimática (SHEKARRIZ et al., 1995).

Existem outras formas, no entanto, de mensurar o estresse oxidativo na amostra. A técnica de dosagem do malondialdeído utilizando a técnica de reação do ácido tiobarbitúrico é bastante utilizada (AITKEN et al., 1993) para aferir o estresse oxidativo de maneira indireta, uma vez que por esta técnica é quantificado o malondialdeído, produto do acúmulo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática espermática, gerado durante a peroxidação lipídica pelas ROS (AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012; GUTHRIE; WELCH, 2012). Esta técnica é chamada de TBARs (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Entretanto, a técnica pode incorrer em resultados superestimados, uma vez que outras substâncias podem ser reativas com o ácido e resultarem em produtos com absorbância similar ao malondialdeído, além de fatores como pH e temperatura influenciarem na indução da peroxidação durante a técnica (JANERO, 1990). A técnica pode ser realizada de duas maneiras: espontânea, em que são aferidas as quantidades de malondialdeído inicialmente presentes no plasma seminal; e induzida, em que é imposto um desafio à célula espermática com sulfato de ferro e ascorbato, e dessa forma, as células susceptíveis ao estresse oxidativo apresentarão peroxidação lipídica e irão, conseqüentemente, produzir malondialdeído, enquanto os espermatozoides resistentes não (GOMEZ et al., 1998).

Nichi et al. (2006) compararam o ejaculado de touros *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* no verão e no inverno por dois anos consecutivos quanto ao estresse oxidativo por meio da técnica TBARs e encontraram que no verão ($728,1 \pm 79,3$ ng/mL) a quantidade de malondialdeído no ejaculado dos touros foi maior ($p=0,01$) que no inverno ($423,8 \pm 72,6$ ng/mL).

Além da técnica do malondialdeído, existem outras técnicas para a quantificação das ROS. Dentre elas, estão as sondas fluorescentes como o BODIPY. Esta possui afinidade pela membrana plasmática espermática e é um análogo dos ácidos graxos poliinsaturados. Dessa forma, na presença de grande quantidade de ROS, ela muda de cor (passa de vermelho para verde), mimetizando uma peroxidação lipídica (PAP et al., 1999). Sendo assim, é possível qualitativamente verificar, de maneira indireta, se há presença de grande quantidade de ROS

livres na amostra.

Outras técnicas mais recentes estão sendo usadas e validadas para a aferição de estresse oxidativo como o uso da sonda fluorescente CellROX[®], descrita na literatura como eficaz na detecção de estresse oxidativo em células endoteliais da artéria pulmonar de bovinos, e que possui a grande vantagem de poder ser analisada por espectrofotometria, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Ademais, poder ser executada com amostras conservadas em formaldeído (GRINBERG et al., 2013) para posterior análise, além de poder ser associada com outras sondas (AHN et al., 2012) possibilitando a realização de diversas análises concomitantemente. Entretanto, apesar de todas as vantagens, o CellROX[®] ainda não foi testado para espermatozoides.

2.3.1.4 Avaliação da fragmentação de DNA espermático

A fragmentação de DNA resultante do estresse oxidativo (PAUL et al., 2009; GUTHRIE; WELCH, 2012) pode ser verificada por diversas técnicas. Malama et al. (2013) avaliaram a fragmentação de DNA, utilizando a técnica SCSA padronizada por Evenson et al. (1999), de ejaculados coletados durante o período de 12 meses de nove carneiros. Além da porcentagem de fragmentação de DNA, foi aferida a temperatura da superfície escrotal com aparelho de termografia no período de coleta do ejaculado. Os autores verificaram correlação significativa negativa entre as duas variáveis ($r=-0,179\pm0,061$; $p=0,004$) (MALAMA et al., 2013). Outros testes para a verificação da fragmentação também são usados. O teste Cometa e o TUNEL foram úteis para a verificação de fragmentação de DNA em células espermáticas humanas (DONNELLY et al., 2000). Fortes et al. (2012) utilizaram o Halomax e o SCSA para verificar a fragmentação de DNA em espermatozoides bovinos. Os autores verificaram não haver correlação entre os resultados. Outro grupo verificou o mesmo resultado e afirma que as duas técnicas podem ter mecanismos diferentes de aferir a fragmentação de DNA (GARCÍA-MACÍAS et al., 2007; FORTES et al., 2012). Em estudo realizado com espermatozoides caprinos, os autores verificaram que a técnica do Halomax e Cometa são úteis para a verificação de fragmentação de DNA (FRASER et al., 2010).

2.3.2 Exames complementares: ultrassonografia bidimensional e color-Doppler e termografia como ferramentas para o diagnóstico da degeneração testicular

As características do ejaculado no tocante à concentração, motilidade, morfologia, produção de ROS e estruturas celulares são muito importantes para o diagnóstico da degeneração testicular. Entretanto, devido ao fato de este distúrbio ter diversos graus e fases, muitas vezes não é claro o padrão espermático a ser encontrado em determinada fase, dificultando o diagnóstico. Além disso, por ser um distúrbio com evoluções variáveis, para o correto diagnóstico se faz necessária a execução de exames andrológicos seriados para a conclusão correta do diagnóstico e fechamento do prognóstico (BRITO et al., 2003, 2004; ARTEAGA et al., 2005; ALVARENGA; PAPA, 2009). Desta forma, outras ferramentas diagnósticas se tornam necessárias.

Os exames complementares podem ser ferramentas valiosas no diagnóstico da degeneração testicular e na identificação de seus diferentes graus e fases. A ultrassonografia atua como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico desta alteração testicular e possui uma grande importância. A termografia também pode servir como método auxiliar no diagnóstico, porém com alguns pontos a serem aprofundados ainda. Normalmente essas avaliações são feitas antes da avaliação espermática e seus achados serão complementares aos achados laboratoriais e juntos possibilitarão o correto diagnóstico da doença (COULTER et al., 1988; ARTEAGA et al., 2005; CAPRARO et al., 2008; DUDEA et al., 2010; NETO et al., 2011).

2.3.2.1 Ultrassonografia bidimensional e color-Doppler

A ultrassonografia pode ser utilizada no modo-B (bidimensional), em que as imagens aparecem em escalas de cinza e que é amplamente utilizada para avaliação da estrutura e atividade de órgãos e tecidos, ou pode ser utilizada no modo color-Doppler, em que é possível avaliar a vascularização (GINTHER, 1998, 2007). No modo color-Doppler as imagens podem ser feitas de forma bidimensional, em que o fluxo sanguíneo aparece numa imagem de modo-B, ou no modo espectral, em que é possível avaliar a variação de velocidade de um determinado fluxo durante um pulso arterial (GINTHER, 2007). No tocante à degeneração

testicular, a avaliação pelo modo-B das características a serem consideradas já estão bem estabelecidas. Entretanto, o color-Doppler ainda está sendo estudado e pouco se tem conhecimento sobre este nas estruturas do aparelho reprodutivo dos machos (GINTHER, 2007). Muitas informações existem da utilização deste na reprodução humana, em que este é usado desde a década de 80 e possui importante aplicação para o diagnóstico de neoplasias e inflamações em testículos, epidídimos e cordão espermático (GINTHER, 2007).

Dependendo do grau e da fase, a degeneração testicular pode apresentar, histologicamente, calcificação dos túbulos seminíferos (AHMADI; NOAKES, 1995). No histopatológico de bodes que apresentaram aspecto heterogêneo com áreas hiperecoicas na imagem ultrassonográfica foi notada a presença de calcificação evidente em alguns túbulos (AHMADI; NOAKES, 1995). A intensidade dos pixels de imagens ultrassonográficas de testículos de touros submetidos à insulação escrotal diminuiu após 14 e 28 dias ($p < 0,05$) do período de insulação. Após 21, 49 e 56 dias, os números de pixels das imagens testiculares diminuíram ($p < 0,05$). Desta forma, pode-se verificar que o efeito da insulação sobre o parênquima testicular de touros, induzindo uma degeneração testicular, altera a intensidade de pixels da imagem. Entretanto, apesar de haver alteração na qualidade do sêmen, não houve correlação entre a alteração de intensidade de pixels com esta característica (ARTEAGA et al., 2005).

A heterogeneidade do parênquima testicular obtida por meio de exame ultrassonográfico modo-B 60 dias antes da colheita e avaliação de sêmen em carneiros apresentou correlação negativa com a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais ($r = -0,73$; $p < 0,01$) e com a motilidade progressiva ($r = -0,76$; $p < 0,01$). Além disso, teve correlação positiva com a porcentagem de espermatozoides com defeito de cauda ($r = 0,72$; $p < 0,01$) e cabeças isoladas ($r = 0,79$; $p < 0,01$) (AHMADI et al., 2012).

A ultrassonografia Doppler pode ser usada para verificar a fertilidade de machos. Ao comparar camelídeos machos férteis e inférteis, Kutzler et al. (2011) verificaram que a velocidade do pico sistólico e a velocidade do diastólico das artérias suprategesticulares foram maiores ($p = 0,0004$; $p = 0,0325$, respectivamente) nos machos férteis do que nos inférteis. Entretanto, o índice de resistência não foi diferente entre os férteis e inférteis (KUTZLER et al., 2011).

O volume de fluxo sanguíneo (mL/min) das artérias testiculares direita e esquerda de garanhões obtido por ultrassonografia color-Doppler apresentou correlação positiva com a concentração de estrógeno circulante após a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG; $p < 0,05$). Já o índice de pulsatilidade (PI) destes mesmos garanhões não

apresentou esta relação (BOLLWEIN et al., 2008).

Em humanos, os valores normais do índice de resistência para adultos e o aspecto testicular no tocante à vascularização em diversas doenças testiculares já estão bem estabelecidos (DUDEA et al., 2010). Na orquite aguda, por exemplo, o parênquima se apresenta intensamente colorido, denotando aumento da vascularização, denominado de aspecto típico de “inferno testicular” (DUDEA et al., 2010). Entretanto, a degeneração testicular é pouco caracterizada ainda ultrassonograficamente com o modo color-Doppler.

2.3.2.2 Termografia testicular

A termografia, uma ferramenta relativamente nova para a identificação de distúrbios reprodutivos, também pode ser usada como método diagnóstico. A técnica se baseia na captação das ondas eletromagnéticas de frequências infravermelhas emitidas pelas superfícies corporais, e representação destas com diferentes cores na imagem termográfica dependendo da quantidade de calor irradiado (COULTER et al., 1988; BASILE et al., 2010).

Com o exame é possível detectar a temperatura superficial da área examinada, no caso da superfície escrotal. Por ser um exame não invasivo, não interfere na temperatura escrotal e é possível ser feito sem provocar estresse ao animal. Foi evidenciada correlação positiva ($r=0,95$) entre a temperatura testicular interna aferida com a colocação de termossensores ($34,9\pm0,09^{\circ}\text{C}$) e a temperatura resultante do exame termográfico da superfície escrotal ($30,1\pm0,1^{\circ}\text{C}$), sendo a diferença de $4,8^{\circ}\text{C}$ entre estas em temperatura ambiente de 24 a $26,6^{\circ}\text{C}$ (COULTER et al., 1988).

A técnica, entretanto, ainda possui algumas limitações. Os resultados da termografia variam conforme a temperatura ambiente ao qual o animal está submetido no momento do exame. No entanto, há uma fórmula matemática para corrigir esta interferência. Além disso, a superfície a ser termografada não pode estar suja nem molhada, pois há interferência nos resultados do exame. Em adição, a aplicação de produtos tópicos e o toque da região devem ser evitados por pelo menos uma hora antes do exame. A presença de pêlos pode influenciar no exame, porém a retirada destes não deve ser feita momentos antes do exame, pois pode influenciar nos resultados (BASILE et al., 2010).

Em homens sem problemas reprodutivos, a temperatura da superfície escrotal média foi de $33,6\pm0,9^{\circ}\text{C}$. Já em homens diagnosticados com varicocele, a temperatura escrotal

média foi de $34,7 \pm 0,7^\circ \text{C}$ e nos homens com causas idiopáticas de oligozoospermia, a temperatura escrotal média foi de $34,2 \pm 0,7^\circ \text{C}$ havendo diferenças significativas (GAZVANI et al., 2000).

Em estudo com seis carneiros submetidos à torção testicular unilateral, os autores mostraram que os testículos submetidos à torção apresentaram diminuição da temperatura superficial detectada pela termografia quando comparado aos testículos não submetidos à torção. A diferença de temperatura detectada entre os dois testículos foi de $1,7^\circ \text{C}$ (CAPRARO et al., 2008). Entretanto, apesar da existência de estudos com a termografia, ainda não está estabelecido um valor de temperatura escrotal superficial que seja considerado normal para as diferentes espécies.

2.4 TERAPIAS UTILIZADAS PARA A DEGENERAÇÃO TESTICULAR

O tratamento atual da degeneração testicular consiste em retirar o agente causador e administrar terapia suporte com antioxidantes (ALVARENGA; PAPA, 2009). Entretanto, a sintomatologia clínica da degeneração testicular é observada quando a doença atinge grau moderado a grave e muitas vezes o fator causador já não está presente. Nestes casos, somente a retirada do agente causador ou a administração de antioxidantes não são suficientes para o sucesso do tratamento, pois a recuperação plena da capacidade espermática dependerá de respostas individuais e principalmente do grau do dano causado (ALVARENGA; PAPA, 2009). É sabido que a suplementação com substâncias antioxidantes pode auxiliar o retorno da função das espermatogônias, células de Leydig e Sertoli (HSU et al., 1998). Dessa forma, a vitamina E e o selênio são amplamente usados com esta finalidade (ALVARENGA; PAPA, 2009).

Há diversos estudos com a suplementação de vitamina E e selênio. Martins et al. (no prelo)² não encontraram efeitos benéficos com o uso do selênio em cachacos, apesar de ter aumentado a concentração da enzima antioxidante PHGPx. Apesar de não ter alterado a qualidade espermática, o selênio juntamente com a vitamina E em cachacos (BRZEZINSKA-

² MARTINS, S. M. M. K.; ANDRADE, A. F. C. de; ZAFFALON, F. G.; BRESSAN, F. F.; PUGINE, S. M. P.; MELO, M. P.; CHIARATTI, M. R.; MORETTI, A. S.. ARRUDA, R. P. Organic selenium supplementation increases PHGPx but does not improve viability in chilled boar semen. **Andrologia**, p. 1-6, jan. 2014. No prelo.

SLEBODZINSKA et al., 1995) e em humanos (GEVA et al., 1996) diminuiu as taxas de ROS no sêmen, aumentando os índices de fertilidade e concentração espermática. Em ovinos também houve melhora da qualidade do sêmen em animais suplementados (YUE et al., 2010). Em ratos com criptorquidismo experimentalmente induzido foi notada diminuição da peroxidação lipídica ($p < 0,001$) e maior taxa de retorno à espermatogênese ($p < 0,001$) quando estes foram suplementados com 30 mg/kg de vitamina E comparados com ratos sem a suplementação, mas com a indução experimental do criptorquidismo (VIGUERAS-VILLASEÑOR et al., 2011). A deficiência de selênio na dieta de ratos suplementados com outros antioxidantes resultou em hipomotilidade dos espermatozoides (WU et al., 1973). Além disso, a produção de testosterona e a formação e desenvolvimento normal de espermatozoides é negativamente afetada pela deficiência de selênio em ratos (BEHNE et al., 1996). Ainda em ratos suplementados com selênio, estudos com o fornecimento de carbimazole a estes animais (droga usada no tratamento do hipertireoidismo e que induz alterações testiculares degenerativas) por oito semanas, resultaram em menor peroxidação lipídica espermática do que ratos que receberam a droga, mas não receberam o selênio (SAKR et al., 2011). Além disso, houve melhora no aspecto histológico testicular, aumento da concentração sérica de testosterona e LH destes ratos quando comparados aos que somente receberam o carbimazole (SAKR et al., 2011).

Apesar dos agentes antioxidantes possuírem papel importante e conhecido frente à degeneração testicular, os resultados variam muito, as doses de administração ainda não estão bem estabelecidas e os tratamentos com os antioxidantes devem ser preventivos, ou seja, o fornecimento dos antioxidantes deve ser feito na dieta de reprodutores sadios (ALVARENGA; PAPA, 2009) para evitar o distúrbio. Dessa forma, a vitamina A por ter poder proliferativo, principalmente em epitélios, poderia ser uma alternativa viável aos tratamentos. A suplementação com esta vitamina é feita para animais que estão sob regime de colheita periódico com o objetivo de estimular a produção espermática, porém sua utilização na degeneração testicular ainda é pouco relatada. Sabe-se, no entanto, que a deficiência de vitamina A provoca a degeneração testicular em carneiros (ZERVOS et al., 2005). Em ratos, essa deficiência leva à atrofia dos órgãos sexuais acessórios por causar diminuição da concentração plasmática de testosterona (LIVERA et al., 2002). A suplementação com vitamina A em ovinos diminui os defeitos espermáticos, assim como a sua deficiência causa aumento destes (ABDULKAREEM et al., 2005). A avitaminose A, ainda, ocasiona degeneração das espermatogônias e deficiência na secreção de testosterona (LIVERA et al., 2002). Além disso, a atividade enzimática dos ativadores de plasminogênio e de acrosina

diminui em carneiros que receberam dietas com deficiência de vitamina A (ZERVOS et al., 2005). Essas enzimas são fundamentais na indução da reação acrossomal e na ligação do espermatozoide com o oócito, mostrando mais uma grande importância da vitamina A na espermatogênese (ZERVOS et al., 2005).

Outra possibilidade de tratamento para a degeneração testicular seria a estimulação proliferativa das células de Leydig, Sertoli e espermatogônias. A laserterapia de baixa intensidade (LTBI) pode auxiliar na estimulação destas células. Existem lasers de baixa potência e de alta potência (PEARSON; SCHUCKERT, 2003). Os de baixa potência emitem densidades energéticas baixas com característica de agentes não térmicos, por não aumentarem ou aumentarem em até 0,5° C a temperatura da área tratada (HALCIN; UITO, 1997). A variação de temperatura que o aparelho de baixa potência provoca nos tecidos irradiados é inferior a 0,5° C, mostrando que seus efeitos não estão relacionados a efeitos térmicos (ARNDT et al., 1997). A densidade de energia, medida em J/cm², é calculada em função do tempo (segundos), potência (Watts) e área (cm²), sendo multiplicado o tempo pela potência e o resultado dividido pelo valor da área a ser irradiada.

Apesar da escassez de estudos utilizando a laserterapia de baixa intensidade sobre os testículos, esta tem sido utilizada na estimulação da proliferação de tecidos ósseos (HUERTAS et al., 2014), de melanócitos (AVCI et al., 2013) e na angiogênese (COLOMBO et al., 2013) com sucesso. Ademais, a laserterapia de baixa potência em meio de cultura celular acelera a produção de fatores de crescimento (RICCI, 2003) e aumenta a taxa de proliferação das células em cultivo (LOPES, 1999). Em adição, a utilização da laserterapia de baixa intensidade em células musculares de ratos com lesão muscular promove melhor organização do tecido, com maior número de células musculares íntegras, menor número de fibras fragmentadas e edema intercelular menos evidente quando comparado a lesões musculares não irradiadas (COSTARDI et al., 2008). A irradiação de diferentes densidades de energia em testículos de ratos (28,05 J/cm² e 48,8 J/cm²), feita uma vez por dia, durante 15 dias, mostrou que a densidade de energia de 28,05 J/cm² foi eficaz para promover aumento da quantidade de espermatócitos e espermátides no epitélio seminífero testicular; já a dose de 46,8 J/cm² mostrou ter efeito destrutivo (TAHA; VALOJERDI, 2004). Estes autores afirmaram ainda que o laser de baixa intensidade teria efeito bioestimulatório sob o epitélio seminífero e que baixas densidades de energia já seriam suficientes para promover benefícios aos pacientes com oligospermia e azoospermia.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE ENERGIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA
INTENSIDADE NO TRATAMENTO DA DEGENERACÃO TESTICULAR EM
OVINOS

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” – Cora Coralina

4 EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE ENERGIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NO TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM OVINOS

4.1 INTRODUÇÃO

A laserterapia de baixa intensidade (LTBI) utiliza potências entre 5 a 50mW e é conhecida por seu efeito bioestimulatório (MESTER, 2013). Esta terapia age aumentando a síntese de adenosina-trifosfato (ATP), principalmente quando a célula está sob algum estresse ou injúria (KARU, 1988; MESTER, 2013). Apesar da escassez de estudos utilizando a terapia sobre os testículos, esta tem sido utilizada na estimulação da proliferação de tecidos ósseos (HUERTAS et al., 2014), de melanócitos (AVCI et al., 2013), tratamento de feridas (BEHEREGARAY et al., 2010) e na estimulação da angiogênese (COLOMBO et al., 2013) com sucesso. Ademais, a terapia mostrou ter efeito positivo sobre células musculares de ratos com lesão muscular promovendo melhor organização do tecido com maior número de células musculares íntegras, menor número de fibras fragmentadas e edema intercelular menos evidente (COSTARDI et al., 2008).

A utilização da LTBI na reprodução animal, no entanto, é pouco estudada. Espermatozoides de cães irradiados com diferentes potências apresentaram diferentes características de movimento (CORRAL-BAQUÉS et al., 2009). A irradiação dos espermatozoides com uma potência baixa (6,84 mW) não levou a alterações dos movimentos; entretanto, a irradiação com uma potência maior (49,7 mW) alterou as características do movimento espermático, aumentando a velocidade do trajeto (VAP), a velocidade progressiva (VSL), a retilinearidade (STR) e a linearidade (LIN) e diminuindo o deslocamento lateral da cabeça (ALH) (CORRAL-BAQUÉS et al., 2009). Em espermatozoides de búfalos, também foi observado efeito positivo sobre a motilidade quando estes foram irradiados com laser de baixa potência por quatro minutos (ABDEL-SALAM et al., 2011). A LTBI, quando realizada diretamente em testículos de ratos, apresentou efeito bioestimulatório sob o epitélio seminífero (TAHA; VALOJERDI, 2004). Nestes, foi feito o tratamento com diferentes densidades de energia (28,05 J/cm² x 48,8 J/cm²), uma vez por dia, durante 15 dias, utilizando a mesma potência (30 mW) nos dois grupos. A densidade de energia de 28,05 J/cm² foi eficaz para promover aumento da quantidade de espermátócitos e espermátides no epitélio seminífero testicular; já a densidade de 46,8 J/cm² mostrou ter efeito destrutivo (TAHA;

VALOJERDI, 2004). Em estudo anterior, a mesma dose de energia (28,05 J/cm²) aumentou a quantidade de cDNA de espermátocitos e espermatogônias de ratos (BERMÚDEZ et al., 1991, 1993).

A degeneração testicular, doença que acomete as mais diversas espécies de animais domésticos e o homem, consiste basicamente no aumento do metabolismo celular devido ao aumento da temperatura testicular (SETCHELL, 1998; HANSEN, 2009). Como este aumento não é acompanhado por aumento proporcional da vascularização testicular, ocorre a hipóxia celular resultando em estresse oxidativo das células espermáticas (SETCHELL, 1998; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009; PAUL et al., 2009). O estresse oxidativo, por sua vez, pode levar a alterações nucleares como a descondensação da cromatina, a fragmentação de DNA (PAUL et al., 2008) e a apoptose celular (SETCHELL, 1998; SHIRAISHI et al., 2010; AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012). Dessa forma, há perda de células dos túbulos seminíferos, sendo os espermátocitos as células mais sensíveis e as espermatogônias as de maior resistência (SETCHELL, 1998). O distúrbio pode ser induzido através da colocação de bolsas insuladoras escrotais (SETCHELL, 1998; BRITO et al., 2003), que impossibilitam a troca de calor da superfície escrotal com o meio e assim levam ao aumento da temperatura testicular.

Não há relatos na literatura da utilização da laserterapia de baixa intensidade em testículos de carneiros nem em animais com degeneração testicular. Pelo fato de a LTBI promover efeito bioestimulatório e ter sua ação maximizada frente a uma injúria (KARU, 1988), a utilização desta terapia na degeneração testicular em carneiros pode ser bastante promissora. Dessa maneira, este estudo objetivou comparar dois protocolos distintos quanto à densidade de energia (G28 x G56) da laserterapia de baixa intensidade em testículos de carneiros com degeneração testicular. Baseando-se na literatura, esperou-se que o protocolo com menor dose de energia (G28) fosse mais eficiente do que o protocolo com uma dose maior (G56) na promoção de efeitos na qualidade espermática e proliferação celular.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local e período experimental

As atividades experimentais foram desenvolvidas no setor de Ovinocultura e Caprinocultura da Prefeitura do *Campus* de Pirassununga da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Patologia Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB). O período do experimento estendeu-se de fevereiro a abril de 2013.

4.2.2 Animais e condições climáticas

Seis ovinos machos, três da raça Santa Inês e três mestiços Dorper/Santa Inês, hígidos, com idade média de $10 \pm 0,89$ meses e peso médio de $30,8 \pm 7,57$ kg foram utilizados para a realização deste experimento. Os animais foram mantidos em piquete com acesso à área de sombra nas instalações do setor de Ovinocultura e Caprinocultura da Prefeitura do *Campus* de Pirassununga da Universidade de São Paulo ($21^{\circ}56'13''$ Sul e $47^{\circ}28'27''$ Oeste) (Figura 1). O manejo nutricional dos animais foi feito à base de silagem de milho e concentrado duas vezes ao dia. A água ficou disponível permitindo a ingestão *ad libitum* durante todo o período experimental. A temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade ambiental (%) foram aferidas por estação climatológica localizada no *Campus* da Universidade de São Paulo em Pirassununga, SP. A temperatura média ao longo do período experimental foi de $22,29^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa do ar foi de 81,59 %. A temperatura máxima foi de 35°C aferida no dia 16/02/2013 e a mínima de $10,9^{\circ}\text{C}$ aferida dia 16/04/2013 (Apêndices A e B).

Figura 1 – Fotografia do piquete em que ficaram alojados os carneiros do experimento 1 no setor de Ovinocultura e Caprinocultura da Prefeitura do *Campus* de Pirassununga da Universidade de São Paulo. Ao fundo, as baias que ficaram abertas durante todo o período para garantir o acesso dos animais à área de sombra – Pirassununga - 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Foram consideradas a raça e a idade para a distribuição dos animais nos grupos experimentais: GC) controle: insulado e não tratado ($n = 2$); G28) insulado e tratado com LTBI com 808 nm de comprimento de onda, 30 mW de potência e 28 J/cm^2 de densidade de energia por 15 dias a cada 48 horas ($n = 2$); G56) insulado e tratado com LTBI com 808 nm de comprimento de onda, 30 mW de potência e 56 J/cm^2 de densidade de energia por 15 dias a cada 48 horas ($n = 2$) (Tabela 2). A colheita de sêmen foi realizada por meio de vagina artificial, sendo que dois animais não responderam ao condicionamento e foram submetidos à colheita de sêmen por eletroejaculação. A indução da degeneração testicular foi feita com a insulação escrotal com bolsas insuladoras confeccionadas com uma camada externa impermeável e camada interna antiabrasiva que ficou em contato direto com a superfície cutânea escrotal. As bolsas foram mantidas por 72 horas (Figura 2).

Tabela 2 – Divisão dos grupos experimentais realizada no experimento 1 e características dos animais utilizados para o experimento 1 no tocante a idade, raça e peso (kg)

Grupos Experimentais	Tratamento	Carneiro	Idade (meses)	Raça	Peso (kg)
GC	Controle	579	11	Santa Inês	24,8
		611	9	Dorper/Santa Inês	31,3
G28	LTBI 28 J/cm^2	575	10	Santa Inês	23,2
		609	9	Dorper/Santa Inês	41,2
G56	LTBI 56 J/cm^2	592	11	Dorper/Santa Inês	38,5
		602	10	Santa Inês	25,8

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Figura 2 – Fotografia das bolsas testiculares insuladoras nos carneiros do experimento 1. As bolsas foram confeccionadas com uma camada externa impermeável e camada interna antiabrasiva, que ficou em contato direto com a superfície cutânea escrotal do animal – Pirassununga – 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Os animais foram avaliados em relação às temperaturas corporal e escrotal. As características da motilidade, a morfologia espermática, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial também foram avaliados. Três avaliações clínicas e reprodutivas foram realizadas antes dos animais serem submetidos à insulação escrotal (T1, T2 e T3) e quatro foram realizadas após a insulação escrotal (T4, T5, T6 e T7) conforme esquematizado na figura 3. As colheitas foram semanais, sendo a primeira colheita realizada após a insulação escrotal, 10 dias após a retirada da bolsa. A orquiectomia bilateral dos animais foi realizada ao final do experimento.

Ainda nas avaliações clínicas e reprodutivas foram feitas análises da concentração e volume espermáticos, da consistência testicular, da circunferência escrotal e das frequências respiratória e cardíaca. Os resultados dessas análises se encontram nos apêndices C e D.

Figura 3 – Esquema experimental

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Antes do período de insulação de 72 horas foram feitos três exames clínicos e reprodutivos (T1, T2 e T3). Após o período de insulação foram feitos quatro exames clínicos e reprodutivos (T4, T5, T6 e T7), sendo T4 após 10 dias da retirada das bolsas de insulação, T5 após 17 dias, T6 após 24 dias e T7 após 31 dias da retirada das bolsas insuladoras. Nas primeiras duas semanas após a retirada das bolsas insuladoras, foi feito o tratamento com a laserterapia de baixa intensidade durante 15 dias a cada 48 horas utilizando a potência de 30 mW e a dose de energia total de 28 J/cm² ou 56 J/cm². Os exames termográficos foram feitos nos tempos M-8 (oito dias antes da colocação das bolsas insuladoras), M-5 (cinco dias antes da colocação das bolsas insuladoras), M-1 (um dia antes da colocação das bolsas insuladoras), M0 (no dia da colocação das bolsas insuladoras), M3 (no dia da retirada das bolsas insuladoras), M4 (um dia após a retirada das bolsas insuladoras), M6 (três dias após a retirada das bolsas insuladoras), M10 (sete dias após a retirada das bolsas insuladoras), M17 (14 dias após a retirada das bolsas insuladoras), M24 (21 dias após a retirada das bolsas insuladoras) e M31 (28 dias após a retirada das bolsas insuladoras). Ao término do experimento foi feita a orquiectomia bilateral dos animais.

4.2.3 Mensuração da temperatura corporal e escrotal

A temperatura corporal foi aferida por meio de termômetro clínico de mercúrio na mucosa retal do animal. A temperatura média da superfície escrotal (TMSE) foi aferida por meio do aparelho de termografia T640 (FLIR Systems, EUA) e as imagens foram analisadas no programa FLIR Quick Report[®] (FLIR Systems, EUA) (Figura 4). Todos os animais foram mantidos na sombra e posicionados à mesma distância da câmera (0,9 m) e os testículos não

foram manipulados por pelo menos 30 minutos antes do exame. A emissividade foi ajustada em 0,98. Para ser possível a comparação ao longo do tempo de diferentes imagens termográficas de um mesmo animal, realizou-se a padronização dos dados em função da temperatura ambiental conforme descrito por Basile et al. (2010). A TMSE e a temperatura retal foram aferidas antes da colheita de sêmen dos animais. As imagens termográficas foram feitas em diversos momentos ao longo do período experimental: oito dias antes da colocação das bolsas (M-8), cinco dias antes da colocação das bolsas (M-5), um dia antes da colocação das bolsas (M-1), no dia da colocação das bolsas (M0), no dia da retirada das bolsas, sendo feita logo após a retirada das bolsas (M3), um dia após a retirada da bolsa (M4), três dias após a retirada da bolsa (M6), sete dias após a retirada da bolsa (M10), 14 dias após a retirada da bolsa (M17), 21 dias após a retirada da bolsa (M24) e 28 dias após a retirada da bolsa (M31).

Figura 4 – Imagem termográfica da superfície escrotal caudal com as delimitações das áreas consideradas para a determinação da temperatura média da superfície escrotal (TMSE)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

4.2.4 Avaliação espermática

A avaliação espermática consistiu na análise das características da motilidade espermática, avaliação da morfologia espermática, da integridade de membrana plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial ao longo do período experimental. Foram considerados sete tempos de avaliações, sendo o T1, T2 e T3 correspondentes às primeiras colheitas de sêmen realizadas antes do período de insulação e T4, T5, T6 e T7 correspondentes ao período pós-insulação, sendo as avaliações feitas 10 dias após a insulação.

(T4), 17 dias após (T5), 24 dias após (T6) e 31 dias após (T7) a retirada das bolsas insuladoras.

4.2.4.1 Características da cinética espermática

A cinética espermática foi avaliada pelo sistema CASA (programa SCA - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha, Figura 5). O *setup* foi ajustado previamente para análise de espermatozoides ovinos. Para a avaliação, a amostra seminal foi diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER; LORRAINE, 1983), pré-aquecido a 37° C, para uma concentração final de $12,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. A câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) foi utilizada na avaliação. As variáveis consideradas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPROG, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Figura 5 – Avaliação computadorizada do movimento espermático pelo programa SCA (*Sperm Class Analyser*; MICROPTIC, Barcelona, Espanha)

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: O trajeto **vermelho** representa os espermatozoides com motilidade progressiva rápido, em **verde** os espermatozoides com motilidade progressiva lento, em **azul** os espermatozoides sem motilidade progressiva e em **amarelo** os espermatozoides imóveis.

4.2.4.2 Avaliação da morfologia espermática

A amostra espermática foi fixada em formaldeído 4% previamente aquecido a 37° C. Foram avaliadas 200 células pela técnica da câmara úmida por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, modelo 80i, Nikon, Tokio, Japão) com aumento de 1.000 x e classificadas de acordo com Barth e Oko (1989) em defeitos maiores e menores.

4.2.4.3 Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, uma amostra de 150 µL de sêmen diluído em TALP a 25×10^6 espermatozoides/mL foi adicionada às sondas fluorescentes: 2 µL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular Probes), 3 µL de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Andrich), 50 µL de lecitina obtida de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionado de fluoresceína (FITC-PSA, 100 µg/mL, Sigma-Andrich) e 2 µL de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 µM, Sigma-Andrich) preparadas conforme descrito por Celeghini et al. (2010) e anexo C. Após a adição das sondas fluorescentes, a amostra foi incubada por 8 minutos a 37° C. A leitura foi feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000 x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm).

Foram avaliadas 200 células por amostra, sendo classificadas de acordo com Celeghini et al. (2010) em: PIAIA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial), PIAIB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial), PIALA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial), PIALB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial), PLAIA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial), PLAIB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial), PLALA

(membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial), PLALB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial). Foram consideradas nos resultados o percentual de células PIAIA, e os percentuais de membrana plasmática íntegra (PI), acrossomal íntegra (AI) e alto potencial de membrana mitocondrial (AP).

4.2.5 Laserterapia de baixa intensidade

Para a realização da LTBI foi utilizado o aparelho de laser modelo Thera Laser[®] (DMC Equipamentos Médicos e Odontológicos, São Carlos, Brasil). Para o tratamento foi utilizado o comprimento de onda infravermelho de 808 nm. O meio ativo para este comprimento de onda neste aparelho é o AsGaAl. O aparelho foi ajustado para a potência de 30 mW.

Dois grupos de tratamento utilizando a laserterapia de potência de 30 mW (TAHA; VALOJERDI, 2004) com diferentes densidades de energia totais foram instituídos. O grupo G28 foi tratado com 28 J/cm² (TAHA; VALOJERDI, 2004) e o grupo G56 foi tratado com o dobro, 56 J/cm². O protocolo utilizado para o grupo G28 iniciou o tratamento com 5 J/cm² nas duas primeiras aplicações, seguiu para 4 J/cm² nas duas segundas, 3 J/cm² nas duas terceiras e 2 J/cm² nas duas últimas. O grupo G56 seguiu o mesmo protocolo, porém em cada aplicação foi feito o dobro da dose de energia. O período de tratamento foi de 15 dias sendo realizado a cada 48 horas. O tratamento teve início três dias após a retirada das bolsas insuladoras sendo realizado em ambos os testículos. A probe do laser foi mantida em contato direto com a superfície escrotal durante a terapia, de modo que formasse um ângulo de 90° com a mesma. O tempo de tratamento foi de uma hora para cada animal (Figura 6).

Figura 6 – Aplicação da LTBI em testículos de carneiro utilizando o aparelho de laser modelo Thera Laser® (DMC Equipamentos Médicos e Odontológicos, São Carlos, Brasil)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

4.2.6 Avaliação histopatológica

Após 35 dias do término da insulação escrotal, foi realizada a orquiectomia bilateral dos animais. Para isso, os animais foram anestesiados seguindo o protocolo proposto por Massone (2011) e a técnica cirúrgica foi realizada seguindo o protocolo proposto por Hendrickson (2010). Os testículos foram fixados em solução comercial de Bouin® (HT10132, Sigma-Aldrich) por 24 horas e em seguida mantidos em álcool 70 % até o momento do processamento. Foram processados três fragmentos de cada testículo, correspondente às regiões cranial, medial e caudal. Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização, emblocamento em parafina, corte em micrótomo, laminação e coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para posterior leitura. O processamento das amostras foi feito no Laboratório de Patologia Veterinária da UNIFEOB.

Posteriormente, as análises foram feitas em microscopia de luz (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) e foi utilizado o programa NIS-Elements AR® (Nikon, Tóquio, Japão) para a mensuração das áreas de lúmen e áreas totais dos túbulos seminíferos. Para a mensuração dos túbulos, foram analisadas dez áreas de cada segmento testicular, e, em cada área, dois túbulos foram escolhidos aleatoriamente. A porcentagem da área de lúmen em relação à área total do túbulo seminífero (lúmen/lúmen+epitélio seminífero) foi determinada (Figura 7). Em paralelo, o grau de degeneração foi classificado como leve, moderado e grave em cada

segmento de acordo com Jubb et al. (1993), sendo que o testículo sem alteração degenerativa foi classificado como grau 0, o testículo com grau leve foi determinado como grau 1, o testículo com grau moderado como grau 2 e o testículo com grau severo como grau 3 (Figura 8).

Figura 7 – Detalhe do corte histopatológico do parênquima testicular de carneiro mostrando como as áreas do túbulo seminífero e do lúmen foram delimitadas (HE, 100 x) feitas no programa NIS-Elements AR® (Nikon, Tóquio, Japão)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Figura 8 – Cortes histopatológicos do parênquima testicular de carneiros diferentes (HE, 100x). Em **A**: Grau 3 (severo) de degeneração testicular. Em **B**: Epitélio seminífero normal (Grau 0)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

4.2.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2004). Os dados foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). As análises por tempo somente foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos foram significativas. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi de 5%.

4.3 RESULTADOS

A temperatura retal (TR) e a temperatura média da superfície escrotal (TMSE) avaliadas ao longo dos tempos experimentais (T1 a T7) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (TR: GC = $39,76 \pm 0,13^\circ \text{C}$; G28 = $39,10 \pm 0,04^\circ \text{C}$; G56 = $39,08 \pm 0,14^\circ \text{C}$; TMSE: GC = $34,48 \pm 0,24^\circ \text{C}$; G28 = $33,50 \pm 0,23^\circ \text{C}$; G56 = $33,55 \pm 0,25^\circ \text{C}$). No entanto, a TMSE foi mais alta ($p < 0,05$) no dia da retirada da bolsa (M3), não diferindo apenas do dia seguinte (M4), sendo normalizada ao longo do tempo (Tabela 3). No gráfico 1 está demonstrada a TMSE de cada grupo ao longo do tempo.

Gráfico 1 – Gráfico das médias da temperatura média da superfície escrotal (TMSE, °C) ao longo de todas as avaliações para cada grupo experimental sendo os grupos controle (GC), grupo LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e grupo LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56). As avaliações foram feitas antes (M-8, M-5, M-1 e M0) e após (M3, M4, M6, M10, M17, M24 e M31) a colocação das bolsas insuladoras. Em M0 o dia da colocação das bolsas insuladoras e em M3 o dia da retirada.

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Tabela 3 – Médias $\pm$ erro padrão da temperatura média da superfície escrotal (TMSE, °C) de todos os grupos sendo os grupos controle (GC), grupo LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e grupo LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56) nos momentos antes (M-8, M-5, M-1 e M0) e após (M3, M4, M6, M10, M17, M24 e M31) a colocação das bolsas insuladoras mostrando diferença ao longo do tempo ($p=0,001$)

Momentos (dias)	TMSE (°C) dos três grupos experimentais
M-8	33,72 $\pm$ 0,27 ^{bc}
M-5	33,70 $\pm$ 0,30 ^{bc}
M-1	33,87 $\pm$ 0,41 ^{bc}
M0	33,49 $\pm$ 0,24 ^{bc}
M3	36,25 $\pm$ 0,49 ^a
M4	34,75 $\pm$ 0,24 ^{ab}
M6	32,95 $\pm$ 0,26 ^c
M10	33,83 $\pm$ 0,24 ^{bc}
M17	33,76 $\pm$ 0,34 ^{bc}
M24	33,17 $\pm$ 0,36 ^{bc}
M31	32,78 $\pm$ 0,53 ^c

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$).

A motilidade total (MT) e a velocidade curvilinear (VCL), avaliadas pelo sistema CASA não apresentaram interação tempo x tratamento, mas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo e não tiveram diferenças entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias $\pm$ erro padrão das características da cinética espermática avaliadas pelo programa *Sperm Class Analyser* (SCA) ao longo dos tempos experimentais (T1 a T7). A média foi feita com os dados de cada grupo avaliados para cada tempo. Sendo os grupos controle (GC), grupo LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e grupo LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56). As características analisadas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPROG, %), velocidade do trajeto (VAP, μ m/s), velocidade progressiva (VSL, μ m/s), velocidade curvilinear (VCL, μ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, μ m), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %)

Tempo	Tratamento	MT (%)	MPROG (%)	VAP (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VCL (μ m/s)	ALH (μ m)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
T1	GC	69,71 $\pm$ 6,29	56,58 $\pm$ 4,23	127,54 $\pm$ 24,14	112,67 $\pm$ 21,24	144,16 $\pm$ 24,90	2,84 $\pm$ 0,16	8,70 $\pm$ 1,61	88,35 $\pm$ 0,06	77,93 $\pm$ 1,27
	G28	77,14 $\pm$ 4,01	62,67 $\pm$ 3,68	121,94 $\pm$ 15,81	109,15 $\pm$ 19,97	132,89 $\pm$ 12,39	2,42 $\pm$ 0,44	9,59 $\pm$ 0,46	88,88 $\pm$ 4,85	81,44 $\pm$ 7,43
	G56	82,24 $\pm$ 1,53	69,82 $\pm$ 5,93	118,13 $\pm$ 1,40	102,35 $\pm$ 8,78	128,28 $\pm$ 4,44	2,50 $\pm$ 0,69	9,86 $\pm$ 0,43	86,59 $\pm$ 4,23	80,05 $\pm$ 7,61
T2	GC	80,50 $\pm$ 11,06	60,74 $\pm$ 13,52	98,64 $\pm$ 33,86	86,83 $\pm$ 29,48	113,33 $\pm$ 35,15	2,45 $\pm$ 0,31	9,02 $\pm$ 0,29	88,16 $\pm$ 0,38	75,84 $\pm$ 2,48
	G28	82,47 $\pm$ 5,63	69,56 $\pm$ 4,65	119,09 $\pm$ 2,93	105,82 $\pm$ 6,58	128,67 $\pm$ 1,77	2,40 $\pm$ 0,12	9,96 $\pm$ 0,11	88,77 $\pm$ 3,34	82,19 $\pm$ 3,99
	G56	85,57 $\pm$ 4,45	72,35 $\pm$ 0,09	123,53 $\pm$ 24,82	107,51 $\pm$ 18,68	133,93 $\pm$ 29,31	2,39 $\pm$ 0,64	9,70 $\pm$ 1,38	87,52 $\pm$ 2,46	81,10 $\pm$ 2,80
T3	GC	73,04 $\pm$ 1,87	54,81 $\pm$ 7,35	98,82 $\pm$ 31,13	86,04 $\pm$ 26,26	126,64 $\pm$ 25,85	4,06 $\pm$ 0,43	10,73 $\pm$ 1,40	87,37 $\pm$ 0,95	66,47 $\pm$ 7,16
	G28	61,71 $\pm$ 0,41	43,47 $\pm$ 1,34	93,15 $\pm$ 3,31	83,39 $\pm$ 2,05	101,18 $\pm$ 3,72	2,62 $\pm$ 0,40	9,03 $\pm$ 0,53	89,55 $\pm$ 0,98	82,45 $\pm$ 1,01
	G56	73,08 $\pm$ 14,34	59,02 $\pm$ 14,18	108,55 $\pm$ 17,93	96,38 $\pm$ 12,91	118,79 $\pm$ 25,85	2,24 $\pm$ 0,04	9,64 $\pm$ 0,81	89,26 $\pm$ 2,85	81,89 $\pm$ 4,14
T4	GC	55,47 $\pm$ 5,58	42,53 $\pm$ 4,34	110,80 $\pm$ 12,75	86,59 $\pm$ 16,66	126,75 $\pm$ 12,20	2,97 $\pm$ 0,04	9,26 $\pm$ 1,74	77,44 $\pm$ 6,12	67,68 $\pm$ 6,63
	G28	68,29 $\pm$ 15,74	59,77 $\pm$ 21,73	130,59 $\pm$ 33,08	110,79 $\pm$ 34,73	152,31 $\pm$ 23,03	3,44 $\pm$ 0,64	11,00 $\pm$ 1,72	83,45 $\pm$ 5,45	70,92 $\pm$ 12,08
	G56	61,78 $\pm$ 4,57	45,74 $\pm$ 13,76	115,52 $\pm$ 15,66	100,18 $\pm$ 16,17	134,81 $\pm$ 7,89	3,31 $\pm$ 0,47	9,89 $\pm$ 1,20	86,41 $\pm$ 2,28	73,86 $\pm$ 7,67
T5	GC	22,46 $\pm$ 21,76	13,63 $\pm$ 13,63	45,21 $\pm$ 39,51	37,53 $\pm$ 33,70	53,98 $\pm$ 48,05	1,37 $\pm$ 1,37	4,12 $\pm$ 4,13	75,98 $\pm$ 2,10	67,21 $\pm$ 2,60
	G28	24,83 $\pm$ 9,28	12,19 $\pm$ 4,21	70,73 $\pm$ 2,82	92,48 $\pm$ 15,67	88,30 $\pm$ 5,48	3,06 $\pm$ 0,24	9,22 $\pm$ 0,11	77,27 $\pm$ 2,10	62,02 $\pm$ 3,06
	G56	52,82 $\pm$ 14,53	38,93 $\pm$ 14,29	112,49 $\pm$ 14,09	54,60 $\pm$ 0,69	124,45 $\pm$ 13,02	2,57 $\pm$ 0,12	9,97 $\pm$ 0,30	81,74 $\pm$ 3,68	73,80 $\pm$ 4,87
T6	GC	39,09 $\pm$ 34,08	29,47 $\pm$ 41,67	51,77 $\pm$ 44,79	45,31 $\pm$ 43,30	64,69 $\pm$ 42,39	0,98 $\pm$ 1,39	4,80 $\pm$ 4,80	60,32 $\pm$ 31,46	45,89 $\pm$ 36,86
	G28	59,71 $\pm$ 5,60	37,57 $\pm$ 13,17	82,07 $\pm$ 37,03	68,07 $\pm$ 18,64	84,92 $\pm$ 22,03	1,99 $\pm$ 0,26	9,91 $\pm$ 1,12	87,78 $\pm$ 1,65	79,84 $\pm$ 1,24
	G56	48,56 $\pm$ 28,50	33,69 $\pm$ 25,55	77,18 $\pm$ 19,79	73,65 $\pm$ 31,98	89,98 $\pm$ 36,21	2,15 $\pm$ 0,04	9,42 $\pm$ 0,48	90,60 $\pm$ 1,90	80,60 $\pm$ 3,10
T7	GC	48,45 $\pm$ 5,17	32,43 $\pm$ 13,39	72,27 $\pm$ 35,61	67,36 $\pm$ 34,49	79,54 $\pm$ 33,37	1,88 $\pm$ 0,16	9,51 $\pm$ 0,34	92,04 $\pm$ 2,36	80,70 $\pm$ 9,50
	G28	88,63 $\pm$ 9,64	72,68 $\pm$ 13,62	95,61 $\pm$ 9,01	81,00 $\pm$ 2,58	108,30 $\pm$ 11,52	2,36 $\pm$ 0,18	9,75 $\pm$ 0,26	85,22 $\pm$ 5,33	75,39 $\pm$ 5,63
	G56	68,97 $\pm$ 13,20	55,97 $\pm$ 9,82	100,22 $\pm$ 7,57	92,24 $\pm$ 0,87	106,76 $\pm$ 10,06	1,93 $\pm$ 0,30	9,66 $\pm$ 0,12	92,49 $\pm$ 2,36	87,09 $\pm$ 7,38
GC		55,53 $\pm$ 6,95	41,45 $\pm$ 6,00	86,43 $\pm$ 12,12	74,62 $\pm$ 10,81	101,30 $\pm$ 12,93	2,36 $\pm$ 0,32	8,02 $\pm$ 0,97	81,38 $\pm$ 4,50	68,92 $\pm$ 5,10
G28		65,97 $\pm$ 5,90	51,13 $\pm$ 6,33	101,18 $\pm$ 7,45	87,54 $\pm$ 7,31	113,79 $\pm$ 7,47	2,56 $\pm$ 0,16	9,78 $\pm$ 0,28	85,84 $\pm$ 1,54	76,32 $\pm$ 2,58
G56		67,57 $\pm$ 5,37	53,64 $\pm$ 5,44	108,64 $\pm$ 6,59	94,97 $\pm$ 5,54	119,57 $\pm$ 7,09	2,49 $\pm$ 0,16	9,73 $\pm$ 0,22	87,80 $\pm$ 1,34	79,77 $\pm$ 2,01
Efeito de tempo		0,02	0,06	0,07	0,08	0,02	0,08	0,40	0,33	0,33
Efeito de tratamento		0,60	0,65	0,74	0,73	0,21	0,11	0,33	0,61	0,88
Interação tempo x tratamento		0,58	0,58	0,55	0,66	0,35	0,25	0,55	0,53	0,55

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Os defeitos espermáticos maiores e menores não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) ao longo do tempo nem entre os grupos experimentais (Tabela 5).

Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão de defeitos espermáticos maiores, menores e totais (%) ao longo de todo o período experimental nos grupos controle (GC), grupo LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e grupo LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56) sem diferença entre os grupos

Tempo	Tratamento	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)
T1	GC	6,75 $\pm$ 3,25	36,00 $\pm$ 11,00	42,75 $\pm$ 14,25
	G28	6,00 $\pm$ 1,50	7,00 $\pm$ 4,00	13,00 $\pm$ 5,50
	G56	13,25 $\pm$ 9,75	7,75 $\pm$ 3,25	21,00 $\pm$ 14,25
T2	GC	5,75 $\pm$ 0,25	34,00 $\pm$ 18,50	39,75 $\pm$ 18,25
	G28	11,50 $\pm$ 0,50	6,00 $\pm$ 1,50	17,50 $\pm$ 2,00
	G56	11,50 $\pm$...	14,00 $\pm$...	25,50 $\pm$...
T3	GC	5,75 $\pm$ 1,25	23,50 $\pm$ 8,00	29,25 $\pm$ 9,25
	G28	24,75 $\pm$ 21,25	1,50 $\pm$ 0	26,25 $\pm$ 21,25
	G56	6,50 $\pm$...	6,50 $\pm$...	13,00 $\pm$...
T4	GC	56,00 $\pm$ 22,00	12,75 $\pm$ 7,75	68,75 $\pm$ 14,25
	G28	27,00 $\pm$ 15,50	4,25 $\pm$ 1,25	31,25 $\pm$ 14,25
	G56	23,75 $\pm$ 3,25	7,25 $\pm$ 1,75	31,00 $\pm$ 1,50
T5	GC	61,75 $\pm$ 0,25	11,00 $\pm$ 5,00	72,75 $\pm$ 4,75
	G28	63,50 $\pm$ 3,00	16,75 $\pm$ 4,25	80,25 $\pm$ 1,25
	G56	49,25 $\pm$ 10,25	10,00 $\pm$ 1,00	59,25 $\pm$ 9,25
T6	GC	63,50 $\pm$ 31,50	14,25 $\pm$ 12,75	77,75 $\pm$ 18,75
	G28	74,00 $\pm$ 11,50	10,00 $\pm$ 1,00	68,50 $\pm$ 22,00
	G56	61,25 $\pm$ 25,75	14,25 $\pm$ 12,75	84,00 $\pm$ 10,50
T7	GC	24,00 $\pm$ 20,50	12,25 $\pm$ 7,25	36,25 $\pm$ 27,75
	G28	33,75 $\pm$ 20,75	3,25 $\pm$ 1,25	37,00 $\pm$ 22,00
	G56	23,50 $\pm$ 5,50	17,25 $\pm$ 0,75	40,75 $\pm$ 4,75
GC		31,92 $\pm$ 8,41	20,53 $\pm$ 4,08	52,46 $\pm$ 6,90
G28		34,35 $\pm$ 7,53	6,96 $\pm$ 1,47	41,32 $\pm$ 8,34
G56		30,00 $\pm$ 6,80	9,95 $\pm$ 1,32	39,95 $\pm$ 6,58
Efeito de tempo		0,15	0,54	0,18
Efeito de tratamento		0,46	0,26	0,17
Interação tempo x tratamento		0,70	0,50	0,69

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

A porcentagem de células PIAIA (espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras e o alto potencial de membrana mitocondrial) teve redução ($p < 0,05$) nos tempos T4, T5 e T6 em relação aos tempos T1, T2, T3 e T7, sendo esta mais pronunciada no T5, que corresponde a 17 dias após a retirada das bolsas insuladoras (Tabela 6). Apesar de a porcentagem de células PIAIA ter apresentado efeito de tempo, mostrando que a insulação foi efetiva, não houve efeito dos tratamentos sobre esta característica espermática ($p = 0,99$).

Tabela 6 - Média $\pm$ erro padrão das células PIAIA (%) (membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial) de acordo com o tempo de avaliação considerando todo o período experimental, antes (T1 a T3) e após (T4 a T7) a indução da degeneração testicular sendo T4 correspondente a 10 dias após a retirada das bolsas insuladoras, T5 a 17 dias após, T6 a 24 dias após e T7 a 31 dias após, desconsiderando o grupo experimental, mostrando diferença ($p=0,01$) ao longo do tempo de avaliação

Tempo Experimental	Tempo em relação à insulação (dias)	Espermatozoides PIAIA (%)
T1	-17 dias	53,75 $\pm$ 5,73 ^{ab}
T2	-8 dias	66,41 $\pm$ 5,6 ^a
T3	-5 dias	42,33 $\pm$ 5,70 ^{ab}
T4	+10 dias	36,33 $\pm$ 5,04 ^{bc}
T5	+17 dias	15,66 $\pm$ 4,82 ^c
T6	+24 dias	30,50 $\pm$ 7,06 ^{bc}
T7	+31 dias	41,50 $\pm$ 4,55 ^b

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Quando feita a avaliação somente nos tempos pós-insulação (T4, T5, T6 e T7) foram observadas diferenças para PIAIA ($p = 0,01$), integridade de membrana plasmática (PI, $p = 0,049$, Gráfico 2), integridade de membrana acrossomal (AI, $p = 0,045$, Gráfico 3) e alto potencial de membrana mitocondrial (AP, $p = 0,012$, Gráfico 4), nas porcentagens de células ao longo do tempo. Entretanto, somente AI apresentou diferença entre os tratamentos, sendo que o grupo GC apresentou maior ($p = 0,01$) porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra do que os grupos G28 e G56. Para as outras características não houve diferença entre os tratamentos nos tempos pós-insulação (Tabela 7).

Gráfico 2 – Média dos espermatozoides que apresentaram membrana plasmática íntegra (PI, %) de acordo com os grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56) ao longo do período pós-insulação (T4, T5, T6 e T7)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Gráfico 3 – Média dos espermatozoides que apresentaram membrana acrossomal íntegra (AI, %) de acordo com os grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56) ao longo do período pós-insulação (T4, T5, T6 e T7)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Gráfico 4 – Média dos espermatozoides que apresentaram alto potencial de membrana mitocondrial (AP, %) de acordo com os grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56) ao longo do período pós-insulação (T4, T5, T6 e T7)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Tabela 7 – Média $\pm$ erro padrão dos espermatozoides que apresentaram membrana plasmática íntegra (PI, %), membrana acrossomal íntegra (AI, %), alto potencial de membrana mitocondrial (AP, %) e espermatozoides com membrana plasmática íntegra, membrana acrossomal íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA, %) de acordo com os grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56) ao longo do período pós-insulação (T4, T5, T6 e T7)

Grupos experimentais	GC	G28	G56	Valor de p
PI (%)	39,31 $\pm$ 9,22	44,68 $\pm$ 7,03	40,25 $\pm$ 5,48	0,94
AI (%)	85,56 $\pm$ 2,08 ^a	74,50 $\pm$ 2,72 ^b	69,43 $\pm$ 3,67 ^b	0,01
AP (%)	31,18 $\pm$ 7,82	34,81 $\pm$ 6,16	35,93 $\pm$ 3,88	0,93
PIAIA (%)	29,50 $\pm$ 7,33	32,56 $\pm$ 5,75	30,93 $\pm$ 4,06	0,97

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

A porcentagem de lúmen/lúmen+epitélio seminífero dos grupos GC e G56 foi maior do que do grupo G28. Na análise descritiva, os carneiros do GC e G56 tiveram grau de

degeneração de moderado (2) a severo (3) e os carneiros do grupo G28 grau leve (1) (Tabela 8).

Tabela 8 – Média $\pm$ erro padrão da relação lúmen/lúmen + epitélio seminífero (%) feita no exame histopatológico dos testículos ($p < 0,001$) dos animais dos grupos controle (GC), LTBI tratado com 28 J/cm² de energia (G28) e LTBI tratado com 56 J/cm² de energia (G56) e análise descritiva do grau de degeneração destes testículos

Grupos experimentais	Lúmen/lúmen + epitélio seminífero (%)	Grau de degeneração (0-3)
GC	36,78 $\pm$ 3,00 ^a	2,50
G28	14,55 $\pm$ 2,08 ^b	1,00
G56	30,98 $\pm$ 2,24 ^a	2,00

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Os resultados da consistência testicular, circunferência escrotal, concentração espermática, volume do ejaculado e frequências respiratória e cardíaca, também avaliados neste experimento, estão expostos nos apêndices C e D.

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi testada a eficiência do tratamento da degeneração testicular com a LTBI com duas doses de energia diferentes. Uma preocupação inicial era se a LTBI poderia provocar aumento de temperatura na área tratada, uma vez que um possível aumento de temperatura na região escrotal poderia ser prejudicial para a espermatogênese e, consequentemente, para o tratamento da degeneração testicular. Visto que, para a espermatogênese ocorrer perfeitamente, se faz necessário que os testículos estejam com a temperatura abaixo da temperatura corporal (SETCHELL, 1998; HANSEN, 2009). Não foi detectado aumento na TMSE dos animais tratados (G28 e G56) em relação aos animais do grupo não tratado (GC), mostrando que a LTBI não foi capaz de causar aumento na TMSE dos animais tratados. Este achado corrobora a afirmação de Halcin e Uito (1997), que consideram a LTBI como uma terapia não térmica, ou seja, incapaz de causar aumento da temperatura da área tratada e, se causar, este seria de no máximo 0,5° C.

A termografia testicular foi capaz, ainda, de detectar o aumento da TMSE em todos os grupos insulados no dia e um dia após a retirada das bolsas insuladoras, mostrando que a insulação foi efetiva para causar aumento da TMSE. Embora a termografia detecte somente a

temperatura da superfície, a TMSE pode ser correlacionada com a temperatura testicular, sendo a diferença entre estas de 4,8° C em temperatura ambiente de 24 a 26,6° C (COULTER et al., 1988). Dessa forma, os animais insulados tiveram aumento da temperatura interna testicular e consequente indução da degeneração testicular como foi objetivado pela colocação das bolsas insuladoras, de acordo com Setchell (1998). Estudos feitos por Brito et al. (2003), Rahman et al. (2001) e Love e Kenney (1999) mostraram que as bolsas insuladoras foram capazes de induzir a degeneração testicular em touros e garanhões, concordando com os resultados encontrados no presente estudo com carneiros.

A irradiação dos testículos dos carneiros previamente insulados com uma potência de 30 mW não resultou em diferenças entre os grupos tratados e controle nas características da motilidade espermática. Contrariamente, diversos estudos mostram aumento das características da motilidade provocados pela irradiação de espermatozoides com LTBI (LENZI et al., 1989; SINGER et al., 1991; ZAN-BAR et al., 2005; CORRAL-BAQUÉS et al., 2009; ABDEL-SALAM et al., 2011; FIRESTONE et al., 2012). No entanto, os estudos que constataram alterações nas características da motilidade realizaram a irradiação diretamente sobre os espermatozoides.

No presente estudo, a irradiação foi feita somente nos testículos dos carneiros, não sendo realizada na cauda do epidídimo, onde estão os espermatozoides maduros, que seriam mais suscetíveis a apresentar mudanças na motilidade. Entretanto é sabido que a laserterapia tem poder de difusão nos tecidos, ou seja, além da luz ser absorvida pelo tecido, ela também é espalhada, devido a propriedades do próprio tecido irradiado (TUCHIN et al., 1995). Dessa forma, por mais que a LTBI tenha sido realizada nos testículos, ela poderia ter afetado as células armazenadas no epidídimo o que não foi observado com os dados da motilidade espermática encontrados no presente estudo. Sabe-se, ainda, que, quando utilizado laser de comprimento de onda de 750 a 1300 nm, há perda de 50% da potência com 4 mm de profundidade no tecido irradiado (MESTER, 2013). Dessa forma, a potência mais alta que a terapia conseguiria atingir não seria compatível com a potência que provocou aumento da motilidade verificado por Corral-Baqués et al. (2009), mesmo se tivesse ação sobre os espermatozoides armazenados no epidídimo.

A redução da integridade de membrana acrossomal, constatada no presente estudo para os dois grupos tratados (G28 e G56) em relação ao grupo controle (GC), poderia indicar uma possível indução de reação acrossomal provocada pela LTBI. Uma explicação para esta indicação é baseada nos achados de Wu et al. (2013), que afirmaram que a LTBI leva a mudanças na concentração intracelular de cálcio e AMP cíclico e pelos achados de Lubart et

al. (1992) que verificaram que a LTBI é capaz de aumentar a entrada de cálcio intracelular em espermatozoides bovinos. Sabe-se que a capacitação e a reação acrossomal dependem de uma cascata de eventos para ocorrerem, dentre estes está o aumento das concentrações de cálcio e AMP cíclico intracelulares (BREITBART, 2002). Dessa forma, a LTBI, por induzir a entrada de cálcio intracelular, poderia provocar a indução da capacitação e da reação acrossomal. Neste sentido, espermatozoides bovinos irradiados com as doses de 2 a 16 J/cm² apresentaram aumento das taxas de reação acrossomal (OCAÑA-QUERO et al., 1997) concordando com os achados deste estudo. A ação da LTBI sobre os espermatozoides maduros induzindo uma reação acrossomal, pode ser explicada pelo poder de difusão do laser (TUCHIN et al., 1995). Essa irradiação, portanto, mimetizaria o efluxo de cálcio e a ligação da zona pelúcida com receptores específicos da membrana plasmática induzindo as cascatas que levam a capacitação e reação acrossomal, respectivamente (BREITBART, 2002). Contudo, vale destacar que neste estudo não foram utilizadas técnicas para mensuração de cálcio intracelular, nem dos eventos específicos causados pela capacitação espermática.

Durante o período experimental não foi observada diferença em defeitos espermáticos maiores, menores e totais, mostrando que os grupos experimentais responderam igualmente à insulação escrotal. Vogler et al. (1993) notaram maior porcentagem de defeitos no ejaculado de touros Holandeses insulados por 48 h após 18 dias da retiradas das bolsas escrotais, sendo os defeitos maiores os mais frequentes (VOGLER et al., 1993). No presente estudo, a porcentagem de defeitos maiores foi maior em relação à quantidade de defeitos menores, concordando com o observado por Vogler et al. (1993). A LTBI, no entanto, não apresentou efeito positivo sobre a quantidade de células com defeito. Isto pode ter acontecido devido ao fato de a laserterapia ter durado 15 dias e a orquiectomia dos animais ter sido feita após 20 dias desta, não sendo possível notar o efeito desta terapia sobre a espermatogênese, o que refletiria na alteração dos defeitos nos grupos tratados. Entretanto, aparentemente a LTBI teve efeito positivo sobre a quantidade de células com defeitos menores. A característica de difusão do laser, agindo no epidídimo, poderia levar a uma organização das células epididimárias e espermáticas, estimulando que a maturação epididimária ocorresse mais rapidamente nestes grupos e que o pH epididimário fosse ajustado, permitindo um correto armazenamento destas células e diminuição da quantidade de defeitos menores (BARTH; OKO, 1989). Entretanto, não é possível concluir que a LTBI apresentou efeito benéfico sobre os defeitos espermáticos menores.

Além de promover alterações nas concentrações plasmáticas de cálcio e AMP cíclico (WU et al., 2013), a LTBI promove aumento da síntese de adenosina-trifosfato (ATP) levando

a efeitos bioestimulatórios (MESTER, 2013). A bioestimulação já foi verificada em diversas estruturas tais como tecidos ósseos (HUERTAS et al., 2014), melanócitos (AVCI et al., 2013) e vasos sanguíneos (COLOMBO et al., 2013). No presente estudo, o exame histopatológico dos testículos revelou efeito proliferativo somente no grupo G28, que foi classificado, na análise descritiva, como grau 1 de degeneração testicular e teve a sua relação lúmen/lúmen+túbulo seminífero menor do que nos grupos GC e G56. Essa relação é capaz de mostrar a quantidade de lúmen presente no túbulo. Portanto, quanto maior for o lúmen maior será a relação e maior o grau de perda celular esse túbulo terá. Os resultados foram similares com os de Taha e Valojerdi (2004), que verificaram efeito bioestimulatório em testículos de ratos com a dose de energia de $28,05 \text{ J/cm}^2$, mesma utilizada no grupo G28, observando aumento nas taxas de mitose e meiose da espermatogênese e aumento na população de espermatócitos primários e espermátides alongadas. Porras et al. (1986) também constatarem efeito positivo da LTBI sobre a quantidade de espermatogônias do epitélio seminífero. Taha e Valojerdi (2004), no entanto, verificaram efeito destrutivo da dose de energia de $48,8 \text{ J/cm}^2$. No grupo G56 foi utilizada a dose de 56 J/cm^2 e não foi observado efeito destrutivo. Entretanto, os animais deste trabalho foram previamente insulados, enquanto os ratos não tinham injúrias sobre o epitélio seminífero, e é sabido que a ação da LTBI ocorre, principalmente, quando a célula está sob algum estresse ou injúria (KARU, 1988), podendo não ocorrer ou ter efeito contrário em células que não sofreram estresse ou injúria.

4.5 CONCLUSÕES

A LBTI não incrementa a temperatura da superfície escrotal e é capaz de provocar efeito bioestimulatório em testículos degenerados de carneiros quando utilizada com dose de energia total de 28 J/cm^2 e potência de 30 mW. Entretanto, a LTBI não é capaz de melhorar a qualidade espermática e reduz a quantidade espermatozoides com acrossoma íntegro.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Média da temperatura ambiental (° C) nos meses do período do experimento 1

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

APÊNDICE B – Média da umidade relativa do ar (%) nos meses do período do experimento 1

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

APÊNDICE C – Média $\pm$ erro padrão da consistência testicular (escala 1 a 5, sendo 1 os testículos de consistência flácida e 5 de consistência firme), circunferência escrotal (cm), volume do ejaculado (mL) e frequência respiratória (movimentos respiratórios por minuto, mrm) dos dados referentes ao experimento1

Tempo	Tratamento	Consistência testicular (1-5)	Circunferência escrotal (cm)	Volume do ejaculado (mL)	Frequência respiratória (mrm)
T1	GC	3,00 $\pm$ 0,50	27,00 $\pm$ 2,12	0,35 $\pm$ 0,05	72,00 $\pm$ 28,00
	G28	2,75 $\pm$ 0,25	27,75 $\pm$ 0,35	0,75 $\pm$ 0,25	32,00 $\pm$ 4,00
	G56	2,50 $\pm$ 0,00	27,50 $\pm$ 2,12	0,65 $\pm$ 0,15	35,00 $\pm$ 5,00
T2	GC	2,75 $\pm$ 0,25	27,00 $\pm$ 1,50	0,45 $\pm$ 0,07	...
	G28	3,00 $\pm$ 0,00	28,00 $\pm$ 0,50	0,60 $\pm$ 0,10	82,00 $\pm$ 38,00
	G56	2,50 $\pm$ 0,00	27,75 $\pm$ 0,25	0,85 $\pm$ 0,15	33,00 $\pm$ 15,00
T3	GC	3,00 $\pm$ 0,50	27,25 $\pm$ 2,25	0,35 $\pm$ 0,05	90,00 $\pm$ 10,00
	G28	2,75 $\pm$ 0,25	28,25 $\pm$ 0,25	0,65 $\pm$ 0,25	61,00 $\pm$ 11,00
	G56	3,00 $\pm$ 0,00	27,50 $\pm$ 0,50	0,95 $\pm$ 0,55	60,00 $\pm$ 12,00
T4	GC	3,25 $\pm$ 0,75	24,75 $\pm$ 4,59	0,20 $\pm$ 0,00	43,00 $\pm$ 7,07
	G28	2,50 $\pm$ 0,00	28,50 $\pm$ 0,50	0,60 $\pm$ 0,00	65,00 $\pm$ 29,69
	G56	2,50 $\pm$ 0,50	27,25 $\pm$ 0,25	1,00 $\pm$ 0,50	44,00 $\pm$ 14,14
T5	GC	2,25 $\pm$ 0,25	25,00 $\pm$ 4,00	0,25 $\pm$ 0,05	58,00 $\pm$ 10,00
	G28	3,00 $\pm$ 0,00	29,25 $\pm$ 0,25	0,30 $\pm$ 0,10	71,00 $\pm$ 15,00
	G56	2,50 $\pm$ 0,50	27,75 $\pm$ 0,25	0,90 $\pm$ 0,10	50,00 $\pm$ 10,00
T6	GC	2,75 $\pm$ 0,25	24,75 $\pm$ 3,25	0,75 $\pm$ 0,35	26,00 $\pm$ 8,00
	G28	3,50 $\pm$ 0,00	28,50 $\pm$ 1,00	0,65 $\pm$ 0,15	37,50 $\pm$ 7,50
	G56	3,00 $\pm$ 0,00	28,00 $\pm$ 3,25	0,75 $\pm$ 0,25	43,00 $\pm$ 5,00
T7	GC	2,50 $\pm$ 0,00	24,75 $\pm$ 3,25	0,40 $\pm$ 0,10	76,00 $\pm$ 14,00
	G28	3,00 $\pm$ 0,00	29,00 $\pm$ 0,50	0,50 $\pm$ 0,10	38,00 $\pm$ 8,00
	G56	2,65 $\pm$ 0,35	27,75 $\pm$ 0,25	0,65 $\pm$ 0,15	36,00 $\pm$ 10,00
Efeito de tratamento		0,51	0,55	0,21	0,46
Efeito de tempo		0,44	0,49	0,68	0,29
Tempo x trat		0,43	0,24	0,46	0,36

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: GC: grupo controle; G28: grupo tratado com 28 J/cm² de energia da LTBI; G56: grupo tratado com 56 J/cm² de energia da LTBI. T1 a T7 representam os tempos experimentais.

APÊNDICE D – Média $\pm$ erro padrão da concentração espermática (10^9 spz/mL) e da frequência cardíaca (batimentos por minuto, bpm) nos grupos controle (GC), grupo LTBI tratado com 28 J/cm^2 de energia (G28) e grupo LTBI tratado com 56 J/cm^2 de energia (G56) do experimento 1. Houve efeito de tratamento para a concentração espermática ($p=0,01$) e para a frequência cardíaca ($p=0,02$)

Grupos Experimentais	GC	G28	G56
Concentração espermática (10^9 spz/mL)	$1,68 \pm 0,36^a$	$5,72 \pm 0,81^b$	$7,10 \pm 0,87^b$
Frequência cardíaca (bpm)	$114,53 \pm 2,98^b$	$97,07 \pm 3,09^a$	$105,57 \pm 4,85^{ab}$

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

CAPÍTULO 3

USO DE CELLROX DEEP RED® PARA A DETECÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM ESPERMATOZOIDE OVINO POR MEIO DE INDUÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*

*“A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos pensar e aprender ainda mais” -
Aristóteles*

5 USO DE CELLROX DEEP RED® PARA A DETECÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZOIDE OVINO POR MEIO DE INDUÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*

5.1 INTRODUÇÃO

A célula espermática é altamente susceptível aos danos causados pelo estresse oxidativo. Isso ocorre pelo fato destas células possuírem pouco citoplasma, o que diminui a quantidade de enzimas capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a menor proteção celular (AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012; WALCZAK–JEDRZEJOWSKA et al., 2013). Além disso, os espermatozoides possuem grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, de proteínas e de DNA, que agem como substrato para a ação das ROS (AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012; WALCZAK–JEDRZEJOWSKA et al., 2013).

A mitocôndria espermática representa a maior fonte geradora de ROS desta célula (KOPPERS et al., 2010) e a geração destas resulta na peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática (AITKEN et al., 2013; WALCZAK–JEDRZEJOWSKA et al., 2013). A peroxidação lipídica, por sua vez, gera metabólitos que agem sobre a cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias fazendo com que mais ROS sejam produzidas e mais peroxidação lipídica ocorra (AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012; KOPPERS et al., 2010). Por fim, a peroxidação lipídica leva a perda de fluidez da membrana plasmática e como resultado há perda da função espermática levando a uma série de eventos que culminam com a queda da motilidade espermática (AITKEN et al., 1993; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012), aumento das taxas de fragmentação de DNA espermático (PAUL et al., 2008), aumento das taxas de apoptose celular (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; PAUL et al., 2009; AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012; GUTHRIE; WELCH, 2012) e aumento da quantidade de espermatozoides morfollogicamente anormais (AITKEN et al., 1993; AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012).

Diversas sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação de ROS, entre elas a C11-BODIPY (COLLODEL et al., 2011), a MitoSOX Red® (AITKEN et al., 2013) e a H₂DCF (GUTHRIE; WELCH, 2006). A C11-BODIPY possui afinidade pela membrana plasmática espermática e é um análogo dos ácidos graxos poli-insaturados, sendo peroxidada

pelas ROS e alterando a fluorescência emitida; dessa forma, os valores de peroxidação obtidos por esta técnica são indiretos visto que expressam a susceptibilidade da célula a um estresse oxidativo. Esta sonda se reverte do vermelho para o verde quando há oxidação (PAP et al., 1999; GUTHRIE; WELCH, 2007). A análise da C11-BODIPY só é possível por citometria de fluxo e, por corar de vermelho ou verde, não permite correções e compartimentalizações nas análises (PAP et al., 1999). A MitoSOX Red[®] e a H₂DCF detectam somente uma das espécies reativas, sendo, respectivamente, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (GUTHRIE; WELCH, 2006; KOPPERS et al., 2008).

Diante disso, é de grande relevância a busca por outros métodos que possam realizar a análise do estresse oxidativo nos espermatozoides e que sejam de fácil execução e leitura. A sonda CellROX Deep Red Reagent[®] (CAT 10422, Molecular Probes) é uma alternativa por poder ser analisada por espectrofotometria, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, além de poder ser executada com amostras conservadas em formaldeído (GRINBERG et al., 2013) para posterior análise. Ademais, o CellROX[®] pode ser associado com outras sondas (AHN et al., 2012) possibilitando a realização de diversas análises concomitantemente. Esta sonda é capaz de mensurar a quantidade de ROS celular sinalizando no citoplasma, sendo que ela é capaz de detectar o radical hidroxila com mais intensidade do que o superóxido (GRINBERG, 2013). Frente a um estresse oxidativo celular, esta sonda é oxidada (GRINBERG et al., 2012) e possui excitação/emissão máxima de 640/655 nm. Caso não tenha ROS na amostra, ela fica em seu estado reduzido e não emite fluorescência. A sonda ainda é pouco utilizada na biologia celular e não há estudos publicados que a utilizem em espermatozoides.

Dessa forma, o presente trabalho foi dividido em dois experimentos: o primeiro experimento teve como objetivo validar a utilização da sonda CellROX[®] para a análise de estresse oxidativo espermático induzido *in vitro*; e o segundo experimento teve como objetivo detectar o estresse oxidativo espermático induzido *in vivo*, utilizando animais submetidos à degeneração testicular.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Experimento 1: Validação da técnica de avaliação de estresse oxidativo por CellROX Deep Red Reagent[®] em espermatozoide

5.2.1.1 Colheita e preparo do sêmen

Utilizou-se para este experimento quatro repetições de colheitas de sêmen de três carneiros da raça White Dorper ($n = 12$) com $15,33 \pm 2,33$ meses de idade. A colheita do sêmen foi feita por vagina artificial e foram utilizados somente ejaculados que apresentavam motilidade subjetiva $\geq 70\%$ e defeitos totais $\leq 10\%$. Para cada repetição foram utilizados dois ejaculados de cada carneiro, colhidos com intervalo de 90 minutos.

O primeiro ejaculado foi diluído em meio TALP *sperm* (BAVISTER; LORRAINE, 1983) para o preparo de duas amostras, sendo a primeira mantida como controle, ou seja, sem indução do estresse oxidativo (T0) e a segunda induzida ao estresse oxidativo (T100). A indução do estresse oxidativo foi realizada pela adição de 50 μL de sulfato de ferro (4 mM) e 50 μL de ácido ascórbico (20 mM) em 100 μL da amostra de sêmen diluída em TALP *sperm*, incubada a 37° C durante 90 minutos.

O segundo ejaculado, colhido após incubação da amostra T100, foi utilizado para o preparo de uma terceira amostra, contendo 50% do sêmen do segundo ejaculado diluído em TALP *sperm* (sem indução do estresse oxidativo) e 50% do sêmen da amostra T100 (após indução do estresse oxidativo).

5.2.1.2 Técnica para análise do estresse oxidativo

Foi utilizada a sonda fluorescente CellROX Deep Red Reagent[®] 2,5 mM (Invitrogen), diluída em dimetil sulfóxido (DMSO, código 472301, Sigma-Aldrich) para a concentração final de 1 mM (solução trabalho). Após o preparo a solução trabalho foi armazenada a -20° C, protegida da luz. No momento da utilização, a solução trabalho contendo CellROX Deep Red Reagent[®] era mantida no escuro a 37° C.

Para o preparo da técnica foram utilizados 200 μL (25×10^6 espermatozoides/mL) de cada amostra do sêmen (T0, T50 e T100) e adicionados 0,5 μL de CellROX[®] (1 mM, Invitrogen) e 2 μL de Hoescht 33342 (2,5 mg/mL, Molecular Probes), sendo a amostra incubada a 37° C por 30 minutos para posterior leitura. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2.000xg, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 μL de TALP.

5.2.1.3 Avaliação do estresse oxidativo

Uma amostra de 5 μL da solução corada com CellROX[®] foi colocada entre lâmina e lamínula e procedeu-se a leitura sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm).

Foram avaliadas 300 células e as células foram classificadas em: espermatozoides sem ou sob leve estresse oxidativo (peça intermediária não corada), espermatozoides sob moderado estresse oxidativo (peça intermediária fracamente corada em vermelho) e espermatozoides sob intenso estresse oxidativo (peça intermediária fortemente corada em vermelho).

5.2.1.4 Análise estatística

O experimento foi delineado com três tratamentos: T0 (sem indução do estresse oxidativo), T50 (50% de amostra não induzida e 50% de amostra induzida ao estresse oxidativo) e T100 (com indução do estresse oxidativo) e duas variáveis: espermatozoides sem ou sob leve estresse oxidativo, espermatozoides sob moderado ou intenso estresse oxidativo.

Os dados obtidos dos tratamentos T0, T50 e T100 foram analisados pela análise de variância (ANOVA). As médias dos valores de cada tratamento foram comparadas pelo teste LSD de Fisher. Os dados do estresse oxidativo nos tratamentos T0, T50 e T100 foram

submetidos a uma análise de regressão linear simples pelo software Statview (Stat view 1998, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). O modelo experimental seguido foi: $Y=a + bX$, na qual Y é a observação do tratamento, a é o coeficiente linear da regressão, correspondendo ao valor de Y quando X for igual a 0, b é o coeficiente de regressão do percentual de X sobre a resposta Y e X são os tratamentos.

5.2.2 Experimento 2: Indução do estresse oxidativo em espermatozoide ovino por meio da degeneração testicular

5.2.2.1 Animais

Foram utilizados 16 carneiros da raça White Dorper ($n = 16$) com idade média de $17,62 \pm 2,65$ meses. Os animais apresentavam anteriormente ao início do experimento motilidade $\geq 60\%$ e defeitos totais $\leq 20\%$. Os carneiros foram submetidos à insulação testicular pela colocação de bolsas por 72 horas para indução da perda de termorregulação testicular e degeneração testicular. Foram realizadas quatro colheitas de sêmen com intervalos quinzenais, sendo duas realizadas antes do período de insulação e duas realizadas após o período de insulação. A primeira colheita de sêmen após o período insulação foi realizada 18 dias após a remoção da bolsa. O sêmen foi colhido pela técnica de vagina artificial.

5.2.2.2 Preparo do sêmen e avaliação do estresse oxidativo

Após a colheita e determinação da concentração, o sêmen foi diluído em meio TALP *sperm* (BAVISTER; LORRAINE, 1983) (25×10^6 espermatozoides/mL) e adicionados 0,5 μ L de CellROX (1 mM, em DMSO) e 2 μ L de Hoescht 33342 (2,5 mg/mL) e incubados por 30 minutos a 37° C. O Hoescht 33342 foi adicionado com o objetivo de tornar possível a visualização das células que não tiveram a peça intermediária corada com o CellROX. Procedido ao tempo de incubação, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 2.000xg. Ao fim da centrifugação, foi retirado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 200 μ L de

TALP. Em seguida, uma gota de 5 μ L da solução foi colocada entre lâmina e lamínula. A leitura foi feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóqui, Japão) em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 e emissão 605-655).

Foram avaliadas 300 células e estas foram classificadas em: espermatozoides sem ou sob leve estresse oxidativo (peça intermediária não corada), espermatozoides sob moderado estresse oxidativo (peça intermediária fracamente corada em vermelho) e espermatozoides sob intenso estresse oxidativo (peça intermediária fortemente corada em vermelho) (Figura 9).

Figura 9 – Espermatozoides ovinos corados pela sonda CellROX[®] e Hoescht 33342. Em **A**: espermatozoide sem ou com leve estresse oxidativo. Em **B**: espermatozoide com estresse oxidativo moderado. Em **C**: espermatozoide com estresse oxidativo intenso

Fonte: (ALVES, M.B.R, 2014)

5.2.2.3 Análise estatística

O experimento foi analisado em dois momentos (antes e após a insulação) e três variáveis: espermatozoides sem ou sob leve estresse oxidativo, espermatozoides sob moderado estresse oxidativo e espermatozoides sob intenso estresse oxidativo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias dos valores de cada tratamento foram comparadas pelo teste LSD de Fisher. O nível de significância considerado para ter diferença entre os momentos foi de 5% (Stat view 1998, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Experimento 1: Validação da técnica de avaliação de estresse oxidativo por CellROX Deep Red Reagent® em espermatozoide

O tratamento T0 apresentou $0,25 \pm 0,11\%$ dos espermatozoides com estresse oxidativo moderado ou intenso. Os tratamentos T50 e T100 apresentaram, respectivamente, $16,37 \pm 1,75\%$ e $30,83 \pm 3,57\%$ dos espermatozoides com estresse oxidativo moderado e intenso. Diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos (Teste de Fisher; $p < 0,0001$) para o estresse oxidativo como mostrado no gráfico 5. Como houve diferença entre os tratamentos, os resultados foram submetidos à análise de regressão linear. O resultado da regressão linear ($R^2 = 0,728$) está no gráfico 6.

Gráfico 5 – Média $\pm$ erro padrão da média do estresse oxidativo espermático (%) obtida nos tratamentos T0 (sem indução de estresse oxidativo), T50 (50% de indução de estresse oxidativo) e T100 (100% de indução de estresse oxidativo)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). Em T0 $0,25 \pm 0,11^a\%$ das células apresentaram estresse oxidativo; em T50 $16,37 \pm 1,75^b\%$ das células apresentaram estresse oxidativo; e em T100 $30,83 \pm 3,57^c\%$.

Gráfico 6 – Regressão linear do estresse oxidativo em espermatozoides ovinos detectados por CellROX Deep Red Reagent® submetidos aos tratamentos T0 (sem indução de estresse oxidativo), T50 (50% de indução de estresse oxidativo) e T100 (100% de indução de estresse oxidativo)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

5.3.2 Experimento 2: Indução do estresse oxidativo em espermatozoide ovino por meio da degeneração testicular

A degeneração testicular provocou redução ($p < 0,05$) no percentual de espermatozoides que não apresentaram estresse oxidativo ou apresentaram este de forma leve, com consequente aumento ($p < 0,05$) de espermatozoides com moderado e intenso estresse oxidativo (Tabela 9).

Tabela 9 – Média $\pm$ erro padrão do estresse oxidativo espermático (%) antes (controle) e após a degeneração testicular em ovinos

Grau de Estresse Oxidativo	Controle	Degeneração testicular	Valor de p
Estresse oxidativo ausente ou leve	84,10 $\pm$ 2,94 ^b	73,75 $\pm$ 3,56 ^a	0,0287
Estresse oxidativo moderado	15,68 $\pm$ 2,92 ^a	25,43 $\pm$ 3,41 ^b	0,0339
Estresse oxidativo intenso	0,20 $\pm$ 0,13 ^a	0,81 $\pm$ 0,24 ^b	0,0343

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística considerando nível de significância de 5%.

5.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi testada a sonda CellROX Deep Red[®] para a análise do estresse oxidativo em espermatozoides, sendo utilizada a espécie ovina como modelo experimental. Embora esta sonda fluorescente não tenha sido utilizada em células espermáticas antes, os resultados do experimento 1 validam esta técnica como eficiente para a detecção do estresse oxidativo em espermatozoides induzidos *in vitro*.

Foram utilizados sulfato ferroso (FeSO₄) e ácido ascórbico para indução do estresse oxidativo *in vitro*, pois em teste preliminar notou-se que a menadiona, citada como indutor de estresse oxidativo em células endoteliais de pulmão bovino (JOHNSON. SPENCE, 2010), não induziu este efetivamente em espermatozoides ovinos. Em espermatozoides suínos, a indução do estresse oxidativo com FeSO₄ e ascorbato de sódio foi mais eficiente do que a indução com menadiona e com peróxido de hidrogênio (GUTHRIE; WELCH, 2007). Após 30 minutos de incubação com o FeSO₄ e ascorbato de sódio, a amostra apresentava $92,9 \pm 5,9\%$ de espermatozoides oxidados avaliados pelo BODIPY, havendo diferença estatística significativa com a amostra não induzida ($p < 0,05$), enquanto que após 30 minutos de incubação com a menadiona e com o peróxido de hidrogênio, as taxas de peroxidação foram $0,3 \pm 0,1\%$ e $1,1 \pm 0,3\%$ respectivamente, não havendo diferença significativa com a amostra não induzida (GUTHRIE; WELCH, 2007). Como a menadiona induz a geração de ROS extracelulares, a técnica de quimioluminescência e a espectrofotometria seriam mais eficientes na análise das ROS geradas por esta indução do que a citometria de fluxo e a sonda diclodihidrofluoresceína (H₂DCF) (AITKEN et al., 2013). Consequentemente a indução com a menadiona para a quantificação de espermatozoides estressados com a sonda CellROX[®] também não seria eficiente, visto que esta realiza a leitura da quantidade de ROS celular sinalizando-as no citoplasma.

No presente estudo, as taxas de espermatozoides positivos para o CellROX[®] observadas no grupo T100 não apresentaram valores tão altos quanto o encontrado por Guthrie e Welch (2007). Os diferentes métodos de análise do CellROX[®] e do BODIPY podem justificar a diferença nos valores encontrados. Enquanto o CellROX[®] avalia a quantidade de ROS presentes na amostra, a técnica do BODIPY, utilizada por Guthrie e Welch (2007), avalia a peroxidação lipídica causada por qualquer ROS (PAP et al., 1999). Ademais, há ação de agentes antioxidantes presentes no plasma seminal (LI, 1975; POTTS et al., 2000) que realizam a neutralização das ROS presentes (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA

et al., 1995). Entretanto, por mais que exista a ação do plasma seminal sobre as ROS induzidas em T50 e T100, os níveis de ROS gerados e não neutralizados foram suficientes para resultarem em diferença entre os grupos.

Esperava-se que no T0 e no T50 do experimento 1 as taxas de ROS fossem menores do que no T100. O mesmo era esperado para os carneiros do experimento 2 nos dois momentos anteriores à colocação das bolsas. Isso porque os carneiros utilizados no experimento 1 e 2 eram saudáveis e não apresentarem sinais de degeneração testicular, além de apresentarem motilidade espermática $\geq 70\%$ e defeitos espermáticos $\leq 20\%$. Corroborando os resultados, a avaliação pelo BODIPY de amostras de espermatozoides de cachacos saudáveis resultou em taxas de peroxidação lipídica de $0,1 \pm 0,1\%$ (GUTHRIE; WELCH, 2007) e em biópsias testiculares de homens diagnosticados como férteis e saudáveis não houve aumento da expressão proteica de 4-HNE modificada, agente oxidante, quando comparados com homens diagnosticados com varicocele (SHIRAISHI et al., 2010).

No experimento 2 foi feita a indução da perda de termorregulação testicular com a colocação de bolsas insuladoras nos testículos dos animais. A perda da termorregulação testicular leva ao aumento do metabolismo celular, hipóxia e consequente aumento das ROS levando ao estresse oxidativo (SETCHELL, 1998; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009; PAUL et al., 2009). Em camundongos submetidos ao estresse térmico de 42°C por 30 minutos houve aumento da expressão da heme-oxigenase 1 após 24 h e 48 h do estresse e aumento da glutadiona peroxidase 1 e glutadiona-S-transferase alfa como resposta ao estresse térmico após 3 horas (PAUL et al., 2009). Em homens diagnosticados com diferentes graus de varicocele houve aumento significativo da expressão proteica de 4-HNE em relação ao grupo controle. Nos grupos com varicocele houve correlação significativa positiva ($p=0,0036$; $r=0,4997$) entre o aumento de temperatura e a expressão proteica de 4-HNE (SHIRAISHI et al., 2010). Dessa forma, após o período de insulação era esperado que aumentasse a produção de ROS pelas células espermáticas conforme visto nos dois últimos momentos do experimento 2.

Os animais apresentam mecanismos antioxidantes próprios divididos em enzimáticos, compostos principalmente pela tríade enzimática superóxido dismutase, catalase e glutadiona peroxidase, e não enzimáticos, exemplificados pela glutadiona, carnitina, selênio, zinco, vitaminas A, E e C (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA et al., 1995). Entretanto, apesar de existirem mecanismos antioxidantes, estes devem interagir perfeitamente para que se tornem capazes de cumprir plenamente a sua função sendo que qualquer desequilíbrio nestes agentes leva a falhas na ação dos mesmos (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA et al., 1995). Dessa

forma, pelo fato de no experimento 2 não terem sido feitas administrações de agentes antioxidantes durante o período de insulto para os animais, o aumento das ROS era esperado. Portanto, no experimento 2, foi feita a indução de estresse oxidativo *in vivo*, visto que não foram oferecidos mecanismos antioxidantes para que os animais pudessem combater o estresse oxidativo induzido pelo estresse térmico testicular.

5.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, é possível concluir que a sonda CellROX Deep Red[®] é capaz de detectar a produção de ROS induzida *in vitro* e *in vivo* em espermatozoides, utilizando como modelo experimental a espécie ovina.

CAPÍTULO 4

TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM CARNEIROS COM SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A OU LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE

“Ela acreditava em anjo e, porque acreditava, eles existiam” - Clarice Lispector

6 TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM CARNEIROS COM SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A OU LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE

6.1 INTRODUÇÃO

A degeneração testicular ocorre em consequência ao aumento do metabolismo celular, que não é acompanhado concomitantemente pelo aumento da perfusão sanguínea testicular, levando, portanto, a uma condição de hipóxia celular (SETCHELL, 1998; PAUL et al., 2009). As células em hipóxia, então, sofrem um desbalanço na quantidade de espécies reativas de oxigênio resultando no estresse oxidativo (SETCHELL, 1998; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009; PAUL et al., 2009). O estresse oxidativo, por sua vez, pode levar a diminuição da motilidade espermática, além de aumentar a quantidade de espermatozoides com alterações morfológicas (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009). Ademais, no processo, há, ainda, alterações na integridade das membranas plasmática e acrossomal, no potencial de membrana mitocondrial (GARCIA, 2004) e alterações nucleares, como a descondensação da cromatina, a fragmentação de DNA e a apoptose celular (PAUL et al., 2008, 2009; RAHMAN et al., 2011 GUTHRIE; WELCH, 2012).

O comprometimento da qualidade espermática, no entanto, não ocorre concomitante à diminuição de libido, caracterizando uma impotência do tipo *generandi* (LAGERLOF, 1938) o que leva a baixas taxas de fecundação oocitária (PAUL et al., 2008; PÉREZ-CRESPO et al., 2008). Dessa forma, é de grande importância o diagnóstico e o tratamento desta afecção. O tratamento atual da degeneração testicular consiste em retirar o agente causador e administrar terapia suporte com antioxidantes. Entretanto, nem sempre este tratamento é eficiente, pois a recuperação plena da capacidade espermática dependerá de respostas individuais e principalmente do grau do dano causado (ALVARENGA; PAPA, 2009).

A vitamina A, por ter poder proliferativo, seria uma grande alternativa no tratamento dos casos de degeneração em que o agente causador não está mais presente. A deficiência de vitamina A é conhecida por provocar a degeneração testicular em carneiros (ZERVOS et al., 2005) e atrofia dos órgãos sexuais acessórios em ratos (LIVERA et al., 2002).

Outra possibilidade de tratamento para a degeneração testicular seria a estimulação proliferativa das células de Leydig, Sertoli e espermatogônias com a laserterapia de baixa

intensidade (LTBI). Esta é caracterizada por ser uma terapia não térmica pelo fato de emitir densidades energéticas muito baixas e assim não causar o aumento da temperatura da área tratada ou aumentá-la em até 0,5° C (HALCIN; UITO, 1997). A densidade de energia de 28,05 J/cm² foi eficaz para promover aumento da quantidade de espermátócitos e espermátides no epitélio seminífero em ratos (TAHA; VALOJERDI, 2004).

Tendo em vista que a suplementação com vitamina A foi pouco estudada na degeneração testicular e que a ação do laser de baixa intensidade no tratamento da degeneração testicular de carneiros ainda não foi testada, o presente estudo teve como objetivo preconizar o tratamento com a vitamina A e com a laserterapia de baixa intensidade em carneiros previamente induzidos à degeneração testicular.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Local e período do experimento

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES), no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) do CBRA e no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Laboratório de Neuroendocrinologia e Reprodução do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Patologia Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB). O período do experimento estendeu-se de julho de 2013 a fevereiro de 2014.

6.2.2 Animais e instalações

Foram utilizados 33 carneiros da raça White Dorper, com idade de $17,64 \pm 2,87$ meses no início do experimento. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em dois piquetes adjacentes, de mesma área (área total de 1.650 m²) localizado no Centro de

Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - *Campus* de Pirassununga (21°56'13" Sul/47°28'24" Oeste) (Figura 10). Os piquetes foram planejados de forma que fossem iguais, desta forma cada piquete tinha área coberta de 36 m², comprimento de cocho de 7 m, um cocho de água (Figura 11) e dois fenis (Figura 12).

Figura 10 – Fotografia dos piquetes em que ficaram alojados os carneiros do experimento 2 no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga - 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Figura 11 – Fotografia do cocho de água de um dos piquetes em que ficaram alojados os carneiros do experimento 2 no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga - 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Figura 12 – Fotografia da área coberta com fenil e cocho de um dos piquetes em que os carneiros do experimento 2 ficaram alojados no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Pirassununga - 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

A nutrição dos carneiros consistiu no fornecimento durante todo o período experimental de volumoso (feno) e concentrado suplementado com minerais (Ovicorte[®], Guabi, Brasil). O manejo alimentar foi realizado para atender às exigências para a categoria animal de acordo com as recomendações do NRC (1996) para ovinos em manutenção, suprindo os nutrientes a fim de garantir dieta com no mínimo 9,4% de proteína; 2,4 Mcal/kg de energia digestível; 0,20% de cálcio; 0,20% de fósforo; 2.742 UI/kg de vitamina A; 15 UI/kg de vitamina E; 20 ppm de zinco; 0,1 ppm de selênio. A água ficou disponível permitindo a ingestão *ad libitum*.

Durante o período experimental, a temperatura ambiental (° C) e a umidade relativa do ar (%) do local onde os animais ficaram alojados foram monitoradas diariamente através de aparelho *datalogger* de temperatura e umidade (OPUS 20 THI - 8120.00, Lufft, Alemanha). A temperatura média foi de 22,93° C, sendo a máxima de 38,5° C (11/11/2013) e a mínima de 4,6° C (28/08/2013). A média da umidade relativa do ar foi de 69,58% durante todo o período experimental (Apêndices E e F).

6.2.3 Delineamento experimental

Os carneiros foram distribuídos de forma aleatória em seis grupos experimentais: CC) grupo não insulado e não tratado (n=5); CA) grupo não insulado e tratado com vitamina A IM 120.000 UI/animal, duas vezes por semana durante três semanas (n=6); CL) grupo não insulado e tratado com LTBI com 808 nm de comprimento de onda, 30 mW de potência e 28 J/cm² de densidade de energia por 15 dias a cada 48 horas (n=5); IC) grupo insulado e não tratado (n=5); IA) grupo insulado e tratado com vitamina A IM 120.000 UI/animal, duas vezes por semana durante três semanas (n=6); IL) grupo insulado e tratado com LTBI com 808 nm de comprimento de onda, 30 mW de potência e 28 J/cm² de densidade de energia por 15 dias a cada 48 horas (n=6). O período de insulação foi de 72 horas, utilizando-se bolsa insuladora confeccionada baseada em Garcia (2004) (Figuras 13 e 14).

O exame clínico e a colheita e avaliação do sêmen foram realizados quinzenalmente, sendo feitas três avaliações anteriores à insulação escrotal (T1, T2 e T3) e seis após este período (T4, T5, T6, T7, T8 e T9), totalizando nove durante o período experimental (momento PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO, Figura 15). O exame clínico consistiu na avaliação da consistência testicular, na ultrassonografia modo-B e modo color-Doppler dos testículos e na avaliação termográfica da superfície escrotal. A avaliação do sêmen consistiu nas avaliações das características da motilidade espermática; da morfologia espermática; da integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial; do estresse oxidativo; e da integridade de DNA espermático. Concomitantemente a estes procedimentos, foi realizada a colheita de sangue para a dosagem sérica de testosterona. A colheita de sangue para dosagem de testosterona sérica assim como os exames termográficos, além de terem sido realizados nos momentos PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO, também foram realizados durante o período em que os animais ficaram com as bolsas de insulação (momento INSULAÇÃO) (Figura 16).

Figura 13 – Fotografia da bolsa utilizada na insulação dos animais do experimento 2 adaptada para carneiros baseada no modelo proposto por Garcia (2004) para bovinos. Em **A**: vista da posição caudal da bolsa insuladora onde localiza-se o sistema de fechamento em velcro. Externamente, a bolsa foi feita com tecido impermeável. Em **B**: bolsa aberta para visualização do velcro e da camada interna em tecido antiabrasivo – Pirassununga – 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Figura 14 – Fotografia dos carneiros do experimento 2 com a bolsa insuladora. Em **A**: animal com bolsa insuladora logo após a colocação. Em **B**: a esquerda animal com a bolsa insuladora colocada há 24 horas e a direita animal do grupo controle sem a bolsa insuladora – Pirassununga - 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Figura 15 – Esquema experimental das avaliações clínicas e reprodutivas realizadas nos momentos PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: O período experimental totalizou 19 semanas, sendo que antes do período de insulação escrotal de 72 horas foram feitos três exames clínicos e reprodutivos (T1, T2 e T3). Após o período de insulação foram feitos seis exames clínicos e reprodutivos (T4, T5, T6, T7, T8 e T9), sendo o primeiro após 18 dias da retirada das bolsas de insulação (momentos PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO). Os exames clínicos e reprodutivos foram: análise da consistência testicular, avaliações ultrassonográficas e termográficas, dosagem sérica de testosterona e avaliações espermáticas. Os exames clínicos e reprodutivos foram feitos quinzenalmente. Após os exames da semana oito (T4), iniciou-se o tratamento com a laserterapia de baixa intensidade (LTBI) e com a vitamina A. Ao término do experimento, foi feita a orquiectomia bilateral dos carneiros.

Figura 16 – Esquema experimental das colheitas de sangue e exames termográficos dos carneiros durante o período de insulação escrotal (momento INSULAÇÃO)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: O período de insulação durou 72 horas e foi dividido em In0 (0 a 24h após a colocação das bolsas insuladoras), In1 (24h a 48h após a colocação das bolsas insuladoras) e In2 (48h a 72h após a colocação das bolsas insuladoras). In-1 corresponde a um dia antes da colocação das bolsas

insuladoras nos carneiros. In 3 corresponde ao dia da retirada da bolsa. In4, In5, In6, In7 e In8 correspondem respectivamente a um, dois, três, quatro e cinco dias após a retirada das bolsas dos carneiros. As colheitas de sangue para a dosagem de testosterona foram feitas nos dias In-1, In1 e In4 sendo que em cada dia as colheitas iniciaram no momento 0 (M0) e seguiram por mais quatro momentos que tiveram intervalo de quatro horas entre eles. Os exames termográficos foram feitos nos dias In-1, In0, In3, In4, In5, In6, In7 e In8.

6.2.4 Avaliações ultrassonográficas

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas nos tempos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T6, T8 e T9, imediatamente antes da colheita de sêmen sendo feita sempre na mesma ordem para cada carneiro. O exame ultrassonográfico dos testículos e plexo pampiniforme foi feito utilizando-se os modos Color e Espectral do Ultrassom Doppler modelo M5Vet® (Mindray, China) realizando a gravação de vídeos durante o exame para posterior análise. O parênquima testicular foi avaliado, por ultrassonografia modo-B, quanto à homogeneidade (HoP, Figura 17), sendo esta classificação subjetiva feita por três avaliadores em 0 para parênquima homogêneo (sem presença de pontos anecoicos patológicos), 1 para pouco heterogêneo (com presença de poucos pontos anecoicos patológicos) e 2 para muito heterogêneo (com presença de muitos pontos anecoicos patológicos).

Figura 17 – Imagens ultrassonográficas (M5Vet®, Mindray) de corte longitudinal do parênquima testicular de carneiros, probe convexa, 7,5 MHz, em modo-B, evidenciando os escores de homogeneidade dos parênquimas testiculares (0-2)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Escore 0: sem presença de pontos anecoicos patológicos; escore 1: com presença de pontos anecoicos patológicos; escore 2: com presença de muitos pontos anecoicos patológicos.

Além da avaliação da homogeneidade do parênquima, foi realizada a avaliação quanto à presença de pontos hiperecoicos (HiP, Figura 18) em escala de 0 a 3, sendo 0: ausência de pontos hiperecoicos no parênquima; 1: presença de até cinco pontos hiperecoicos; 2: presença

de mais de cinco pontos hiperecoicos próximos ao mediastino e distanciados; e 3: presença de mais de cinco pontos hiperecoicos difusos no parênquima testicular.

Figura 18 – Imagens ultrassonográficas (M5Vet®, Mindray) de corte longitudinal do parênquima testicular de carneiros, probe convexa, 7,5 MHz, em modo-B, evidenciando os escores de hiperecogeneidade dos parênquimas testiculares (0-3)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Escore **0**: ausência de pontos hiperecoicos no parênquima; escore **1**: presença de até cinco pontos hiperecoicos; escore **2**: presença de mais de cinco pontos hiperecoicos próximos ao mediastino e distanciados; escore **3**: presença de mais de cinco pontos hiperecoicos difusos no parênquima testicular.

O índice de resistência vascular (RI) do plexo pampiniforme foi avaliado pelo modo espectral. Para isso foram feitas imagens de três secções de ondas com pelo menos três picos de velocidade sistólica (PSV) e a velocidade diastólica final (EDV), sendo considerado o valor do RI de cada onda intermediária de cada secção (Figura 19).

Figura 19 – Imagens ultrassonográficas (M5Vet®, Mindray) de corte transversal do plexo pampiniforme de ovino, probe convexa, 7,5 MHz, em modo espectral para determinação do índice de resistência (RI) das artérias suprategesticulares

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Foram gravados vídeos de três secções de ondas para posteriormente ser feita a média de três valores de RI de ondas intermediária a ondas uniformes que formavam linhas de velocidade homogêneas apresentando pico de velocidade sistólica (PSV) e a velocidade diastólica final (EDV) característicos.

As imagens coloridas em modo color-Doppler do fluxo sanguíneo do plexo pampiniforme e do parênquima testicular foram avaliadas em escores por três avaliadores. O

plexo pampiniforme (PP) foi avaliado em escores de 1 a 5, sendo 1: 0 a 20% do plexo preenchido por vascularização; 2: 21 a 40% do plexo preenchido por vascularização; 3: 41 a 60% do plexo preenchido por vascularização; 4: 61 a 80% do plexo preenchido por vascularização; e 5: 81 a 100% do plexo preenchido por vascularização e parênquima testicular (Figura 20).

Figura 20 – Imagens ultrassonográficas (M5Vet®, Mindray) de corte transversal do plexo pampiniforme de ovino, probe convexa, 7,5 MHz, em modo color-Doppler para determinação do escore de vascularização do plexo pampiniforme (1-5)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Escore **1**: 0 a 20% do plexo preenchido por vascularização; escore **2**: 21 a 40% do plexo preenchido por vascularização; escore **3**: 41 a 60% do plexo preenchido por vascularização; escore **4**: 61 a 80% do plexo preenchido por vascularização; e escore **5**: 81 a 100% do plexo preenchido por vascularização e parênquima testicular.

A vascularização do parênquima testicular (VP) foi avaliada em escores de 0 a 4, sendo 0: ausência de vascularização; 1: presença de 1 a 2 pontos de vascularização de pequeno calibre; 2: presença de 2 a 4 pontos de vascularização de pequeno calibre; 3: mais de 2 pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos 1/3 do vídeo; 4: mais de 2 pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos 2/3 do vídeo (Figura 21).

Figura 21 – Imagem ultrassonográfica em modo color Doppler (M5Vet®, Mindray) de corte longitudinal, probe convexa, 7,5 MHz, do parênquima testicular ovino evidenciando a classificação do escore de vascularização. Os pontos de vascularização estão indicados por setas

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Escore **0**: ausência de vascularização; escore **1**: presença de 1 a 2 pontos de vascularização de pequeno calibre; escore **2**: presença de 2 a 4 pontos de vascularização de pequeno calibre; escore **3**: mais de 2 pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos 1/3 do vídeo; escore **4**: mais de 2 pontos de vascularização de maior calibre que aparecem em pelo menos 2/3 do vídeo.

6.2.5 Avaliações termográficas

Para os exames termográficos foi utilizado o aparelho de termografia T640 (FLIR Systems, EUA) e as imagens foram analisadas no programa FLIR Quick Report® (FLIR Systems, EUA). Para o procedimento, os carneiros foram mantidos numa câmara climática com temperatura fixa em 20° C por 12 horas antes do exame. As imagens foram todas captadas a mesma distância (0,9 m) e a mesma temperatura ambiente (20° C) (Figura 22). Os testículos foram tricotomizados com aparelho para tosa (SMALLCLIP30, Walmur, Brasil) 72 horas antes do exame. Por pelo menos 24 horas antes do exame, a superfície testicular não foi tocada nem foi aplicada nenhuma substância tópica nesta.

Figura 22 – Fotografia da execução do exame termográfico em câmara climática com temperatura controlada a 20° C. A distância em que o animal foi mantido da câmera termográfica foi de 0,9 m – Pirassununga - 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

A avaliação termográfica foi realizada em dois momentos durante o período experimental. No primeiro momento, que corresponde ao momento PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO, as avaliações de temperatura da superfície escrotal (TMSE) foram realizadas quinzenalmente, sendo feitas três avaliações (T1, T2 e T3) anteriores à insulação escrotal e seis após este período (T4, T5, T6, T7, T8 e T9), totalizando nove durante o período experimental (Figura 15). No segundo momento, as avaliações da TMSE foram feitas durante o período em que os animais ficaram com as bolsas de insulação (momento INSULAÇÃO)

sendo feitas duas avaliações antes de colocar a bolsa e sete após, sendo um dia antes da colocação das bolsas insuladoras (In-1), no dia da colocação das bolsas (In0), no dia de retirada das bolsas (In3), um dia após (In4), dois dias após (In5), três dias após (In6), quatro dias após (In7) e cinco dias após (In8) a retirada das bolsas (Figura 16).

6.2.6. Dosagem sérica de testosterona

A dosagem de testosterona foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia e Reprodução da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo método de radioimunoensaio (RIA) por meio de kit comercial (Testosterone DA Kit, MP, EUA), armazenados até o momento do uso entre 2 e 8° C. Todas quantidades dos reagentes foram ajustadas à metade das quantidades sugeridas pelo fabricante. A leitura do radioimunoensaio foi feita em cintilador de radiação gama (Perkin Elmer –Wozard - 2470 automatic Gamma Counter). Os resultados foram expressos em ng/mL. Para a dosagem foram colhidas amostras de sangue por punção da veia jugular, utilizando-se o sistema de Vacutainer® (BD, EUA), centrifugadas a 2.100g por 15 minutos e o soro foi armazenado à - 80° C em triplicatas (Figura 23).

Figura 23 – Colheita de sangue da veia jugular direita em carneiro do experimento 2 com tubo com acelerador de coagulação para obtenção do soro para dosagem de testosterona – Pirassununga - 2013

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

A colheita de sangue para a dosagem de testosterona foi feita em dois momentos diferentes. O primeiro em que esteve relacionada com os períodos de exames clínicos e avaliações seminais (momento PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO) e o segundo relacionado ao período de insulação escrotal dos animais (momento INSULAÇÃO).

No momento PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO foi realizada a colheita de sangue dos animais no mesmo dia em que foram feitos os exames ultrassonográficos e as colheitas de sêmen (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, e T9). Foram tomadas duas amostras de sangue diárias, às 7h (M7H) e às 15h (M15H), para minimizar as oscilações diárias da testosterona (Figura 15).

No momento INSULAÇÃO, as amostras foram colhidas no período de insulação dos animais. Para essa dosagem, foi feita a colheita de sangue um dia antes da colocação das bolsas insuladoras, no segundo dia em que os animais estavam com as bolsas e dois dias após a retirada das bolsas dos animais; em cada dia foram feitas cinco colheitas de sangue com intervalo de 4 horas, iniciando às 7h (momentos 1, 2, 3, 4 e 5) (Figura 16).

6.2.7 Avaliações reprodutivas

As colheitas e as avaliações seminais foram feitas nos tempos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T7, T8 e T9 e consistiram na análise da consistência testicular, das características da motilidade espermática, avaliação da morfologia espermática, da integridade das membranas plasmática e acrossomal, do potencial de membrana mitocondrial, da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da fragmentação de DNA.

6.2.7.1 Consistência testicular

Para a avaliação da consistência testicular foram considerados os escores de 1 a 5, sendo 1 o mais flácido, aumentando gradativamente até o 5 sendo o mais firme.

6.2.7.2 Características da cinética espermática

A cinética espermática foi avaliada pelo sistema CASA (programa SCA - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha). O *setup* foi ajustado previamente para análise de espermatozoides ovinos. Para a avaliação, a amostra espermática foi diluída ($12,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL) em meio TALP *sperm* (BAVISTER; LORRAINE, 1983), pré-aquecido a 37° C. A câmara de Makler[®] (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) foi utilizada na avaliação. As variáveis consideradas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPROG, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

6.2.7.3 Avaliação da morfologia espermática

A amostra espermática foi fixada em formaldeído 4% previamente aquecido a 37° C. Foram avaliadas 200 células pela técnica da câmara úmida sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 1.000x e classificadas de acordo com Barth e Oko (1989) em defeitos maiores e menores.

6.2.7.4 Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial espermática foram utilizados 150 μL de sêmen diluído em TALP (25×10^6 espermatozoides/mL) adicionando-se a este sondas fluorescentes: 2 μL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular Probes), 3 μL de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Andrich), 50 μL de aglutinina obtida de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Andrich) e 2 μL de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μM , Sigma-Andrich) preparadas conforme descrito por Celeghini et al. (2010) (Anexo C). Após a adição das sondas fluorescentes, a amostra foi incubada por 8 minutos a 37° C. A leitura foi feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 1.000 x,

utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm). Foram avaliadas 200 células por amostra, sendo classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda em: PIAIA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial), PIAIB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial), PIALA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial), PIALB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial), PLAIA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial), PLAIB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial), PLALA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial), PLALB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial). Foram considerados nos resultados os percentuais de células PIAIA, membrana plasmática íntegra (PI), membrana acrossomal íntegra (AI) e alto potencial de membrana mitocondrial (AP) (Figura 24).

Figura 24 – Espermatozoides ovinos corados segundo Celeghini et al. (2010) pela técnica da tripla coloração de avaliação das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Em **A**: PIAIA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial); em **B**: PIAIB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial); em **C**: PIALA (membrana plasmática intacta, membrana

acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial) em **D**: PIALB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial); em **E**: PLAIA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial); em **F**: PLAIB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial); em **G**: PLALA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial); e em **H**: PLALB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial)

6.2.7.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para a avaliação da produção de ROS foram feitos dois testes: produção das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e verificação da produção de ROS pela sonda CellROX Deep Red[®] (Invitrogen).

Para a avaliação pelo TBARS, foram feitas análises de acordo com Ohkawa et al. (1979). Por esse método, as moléculas de malondialdeído reagem com o ácido tiobarbitúrico e geram cromóforos, que podem ser quantificados por espectrofotometria. Para a técnica, foi realizada a diluição de 100 µL de sêmen em TALP *sperm*, sendo adicionado 50 µL de sulfato de ferro (4 mM) e 50 µL de ácido ascórbico (20 mM) à amostra induzida (Anexos D e F). Nas amostras induzidas, as células espermáticas são desafiadas a produzir ROS que irá levar a peroxidação lipídica da membrana plasmática destas. A indução ocorre a 37° C por 90 minutos. Em seguida à diluição e incubação, adicionou-se o ácido tricloroacético 10% (TCA 10%, Sigma-Aldrich) na proporção 2:1 à amostra para precipitação das proteínas. As amostras foram centrifugas por 10 minutos a 14.100g. Após a centrifugação, 800 µL do sobrenadante e 800 µL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%, J.T. Baker) diluído em 0,05 N hidróxido de sódio foram colocados em banho-maria (100° C) por 10 minutos e após colocados em gelo (0° C) para parar a reação química. Os TBARS foram então quantificados usando o espectrofotômetro (Ultrospec@ 3300 pro, GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Os resultados foram comparados com uma curva preparada com solução padrão de malondialdeído. A peroxidação lipídica foi expressa em ng de TBARS/mL de sêmen. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para a avaliação com o CellROX[®] (Anexo C), foi adicionado a 200 µL de sêmen diluído em TALP (25×10^6 espermatozoides/mL), 0,5 µL de CellROX[®] (1 mM) e 2 µL de Hoescht 33342 (2,5 mg/mL) e incubado por 30 minutos a 37° C. Procedido ao tempo de incubação, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 2.000xg. Ao fim da centrifugação, foi

retirado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 200 μ L de TALP. Em seguida, uma gota de 5 μ L da solução foi colocada entre lâmina e lamínula. A leitura foi feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm). As células foram classificadas em: espermatozoides sem estresse oxidativo (peça intermediária não corada), espermatozoides com leve estresse oxidativo (peça intermediária fracamente corada em vermelho) e espermatozoides com estresse oxidativo severo (peça intermediária fortemente corada em vermelho).

6.2.7.6 Avaliação da fragmentação de DNA da amostra espermática

Para a avaliação da fragmentação de DNA foi utilizado o kit comercial Halomax[®] (Halotech[®] DNA, Madri, Espanha). Foram seguidas as especificações do produto (Anexo E) e a leitura foi feita posteriormente analisando 500 células, sendo as células coradas com 1 μ L de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Andrich) incubado por 8 minutos. Os espermatozoides foram classificados em DNA íntegro (sem halo em torno da cabeça do espermatozoide) e DNA fragmentado (com halo em torno da cabeça do espermatozoide) (Figura 25).

Figura 25 – Espermatozoides ovinos corados com iodeto de propídio para a detecção de fragmentação de DNA pelo kit comercial HALOMAX[®] (Halotech[®] DNA, Madri, Espanha). As setas indicam os espermatozoides que apresentaram fragmentação de DNA e formação de halo em torno da cabeça

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

6.2.8 Avaliação histopatológica

A orquiectomia bilateral de todos os animais foi realizada ao final do período experimental. As amostras foram fixadas em solução comercial de Bouin[®] (HT10132, Sigma-Aldrich) por 24 horas e em seguida mantidas em álcool 70% até o momento do processamento. Foram processados três fragmentos de cada testículo, correspondente às regiões cranial, medial e caudal. Os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização, emblocamento em parafina, corte em micrótomo, laminação e coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para posterior leitura. O processamento das amostras foi feito no Laboratório de Patologia Veterinária da UNIFEOD.

As análises foram feitas em microscopia de luz (Leica DM 2.000, Leica Microsystems, Alemanha) e as mensurações da área do epitélio e da área do lúmen (Figura 26) foram feitas no programa Leica QWin D3.5.1 (Leica Microsystems, Alemanha, 2006). A partir desta análise, foi realizada a soma destas áreas com o objetivo de encontrar a área total do túbulo seminífero. Após, foi feita a relação da área do epitélio com a área do túbulo seminífero (epitélio/lúmen+epitélio).

Figuras 26 – Cortes histológicos de testículos de carneiros processados e aferidas pelo programa Leica QWin D3.5.1 (Leica Microsystems, Alemanha, 2006) para mensuração das áreas do lúmen e do epitélio seminífero (HE, 100 x)

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: Em **A**: seleção da área do lúmen dos túbulos seminíferos; em **B**: seleção da área do epitélio seminífero.

6.2.8 Análise estatística

A análise estatística foi dividida em duas fases. Na primeira fase foi avaliado o efeito da insulação. O objetivo desta foi verificar a eficiência da insulação escrotal em promover danos ao epitélio seminífero e diminuir a qualidade espermática. A segunda teve por objetivo verificar a eficiência dos tratamentos preconizados para o distúrbio induzido.

6.2.8.1 Efeito da insulação

Para a análise do efeito da insulação foram considerados dois momentos (antes e após insulação, sendo T1+T2+T3 o período anterior e T4+T5+T6 o período posterior) e dois grupos (CC e IC). Os dados da dosagem de testosterona no momento PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO, da consistência testicular, da motilidade total, da motilidade progressiva, dos defeitos maiores, menores e totais e da porcentagem de células PIAIA, PI, AI e AP foram submetidos à análise de variância considerando como fatores tempo e tratamento. Para o tratamento foram considerados somente os grupos CC e IC; para o fator tempo foram considerados o período de antes da insulação e após a insulação. O efeito do tratamento e do tempo só foram considerados quando não houve interação tempo x tratamento. Quando não houve interação, as médias dos valores de cada tratamento foram comparadas pelo teste LSD de Fisher. O nível de significância considerado para ter diferença foi de 5% (Stat view 1998, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Para o efeito da insulação sobre a temperatura média da superfície escrotal e sobre a dosagem de testosterona no momento INSULAÇÃO, os dados foram submetidos à análise de variância considerando como fatores tempo e tratamento. Para o tratamento foram considerados os grupos controle (CC, CA e CL) e insulado (IC, IA e IL); para o fator tempo foram considerados os dias In-1, In0, In3, In4, In5, In6, In7 e In8. Os efeitos de tratamento e de tempo só foram considerados quando não houve interação tempo x tratamento. Quando não houve interação, as médias dos valores de cada tratamento foram comparadas pelo teste LSD de Fisher. O nível de significância considerado foi de 5% (Stat view 1998, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

6.2.8.2 Efeito dos tratamentos

Para verificar a efetividade dos tratamentos, os dados foram analisados usando o procedimento MIXED do software SAS (Statistical Analysis System, 2002) de acordo com o delineamento inteiramente casualizado utilizado. Cada animal foi considerado uma unidade experimental. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados utilizando contrastes ortogonais; sendo, contraste 1) EI (Efeito da insulação nos tratamentos): a comparação entre CC, CA e CL x IC, IA e IL; contraste 2) ET (Efeito dos tratamentos): a comparação entre CC x IA e IL; contraste 3) VL (Diferença entre a vitamina A e a LTBI): a comparação entre CA e IA x CL e IL; contraste 4) ETI (Efeito dos tratamentos nos insulados): a comparação entre IC x IA e IL; contraste 5) ETN (Efeito dos tratamentos nos não insulados): a comparação entre CC x CA e CL. Foram considerados os efeitos de tempo, tratamento e interação tempo x tratamento. O nível de significância considerado foi de 5%.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Efeito da insulação

6.3.1.1 Efeito da insulação sobre as características reprodutivas

A consistência testicular apresentou interação tempo x insulação ($p = 0,05$). Os testículos dos animais do grupo IC ficaram mais flácidos após a insulação, ou seja, tiveram diminuição na consistência testicular (Tabela 10).

As motilidades total e progressiva foram menores no grupo insulado (IC) do que no grupo controle (CC). Entretanto, somente a motilidade total apresentou diferença estatística significativa ($p = 0,01$) entre os dois grupos, sendo que a média do grupo CC ($77,68 \pm 2,73\%^a$) foi maior do que do grupo IC ($69,13 \pm 4,59\%^b$). Ao longo dos dois períodos,

as duas motilidades foram menores significativamente após a insulação escrotal, sendo os valores de p respectivamente $< 0,0001$ e $0,0002$ (Tabela 10).

A quantidade de células com defeitos maiores e totais apresentou interação tempo x tratamento. No período anterior à insulação, os grupos não diferiram. Entretanto, após a insulação, o grupo insulado apresentou maior quantidade de defeitos maiores e totais do que o grupo não insulado. As células com defeitos menores não apresentaram diferenças entre os grupos (Tabela 10).

Houve interação tempo x tratamento para a porcentagem de células PIAIA e AP, sendo que no período anterior a insulação os dois grupos foram semelhantes quanto às porcentagens de células PIAIA e AP. Após a insulação, os grupos foram diferentes, sendo que o grupo IC apresentou menor quantidade de células PIAIA e AP do que o grupo CC (Tabela 10).

Contrariamente, a porcentagem de espermatozoides PI e AI não apresentaram interação tempo x tratamento (Tabela 10). Houve efeito de tratamento ($p = 0,005$) para PI, sendo que CC ($63,89 \pm 2,70\%^a$) apresentou maior quantidade de células com a membrana plasmática íntegra do que o grupo IC ($49,79 \pm 4,29\%^b$). A porcentagem de células AI não diferiu ($p = 0,21$) entre os grupos insulado e não insulado.

Tabela 10 – Média $\pm$ erro padrão da consistência testicular (CT; 1 a 5), da motilidade total (MT, %), da motilidade progressiva (MPROG, %), dos defeitos espermáticos maiores (%), menores (%) e totais (%), das células com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA, %), das células com membrana plasmática íntegra (PI, %), das células com membrana acrossomal íntegra (AI, %) e das células com alto potencial de membrana mitocondrial (AP, %) dos grupos CC e IC, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T6)

Características reprodutivas	Antes da insulação		Após a insulação		Efeito de tempo	Efeito da insulação	Interação tempo x insulação
	CC	IC	CC	IC			
Consistência testicular	3,31 $\pm$ 0,08	3,36 $\pm$ 0,10	3,19 $\pm$ 0,07	2,90 $\pm$ 0,08	0,0012	0,16	0,05
MT (%)	90,31 $\pm$ 1,36	85,07 $\pm$ 2,67	67,15 $\pm$ 3,19	53,18 $\pm$ 6,62	< 0,0001	0,01	0,27
MPROG (%)	60,60 $\pm$ 2,52	57,87 $\pm$ 3,19	47,96 $\pm$ 3,21	39,17 $\pm$ 5,71	0,0002	0,12	0,46
Def Maiores (%)	10,67 $\pm$ 2,01	7,78 $\pm$ 0,96	19,33 $\pm$ 2,85	25,21 $\pm$ 6,50	< 0,0001	0,0004	< 0,0001
Def. Menores (%)	12,42 $\pm$ 2,77	12,46 $\pm$ 3,12	12,02 $\pm$ 2,12	12,78 $\pm$ 3,35	0,98	0,89	0,89
Def. Totais (%)	23,10 $\pm$ 3,89	20,24 $\pm$ 3,40	31,36 $\pm$ 3,43	62,62 $\pm$ 5,52	< 0,0001	0,001	0,0001
PIAIA (%)	49,00 $\pm$ 5,07	49,12 $\pm$ 5,34	55,83 $\pm$ 2,46	35,16 $\pm$ 5,57	0,44	0,03	0,02
PI (%)	63,00 $\pm$ 5,14	57,32 $\pm$ 5,31	64,63 $\pm$ 2,63	42,26 $\pm$ 6,32	0,17	0,005	0,09
AI (%)	87,36 $\pm$ 2,36	85,12 $\pm$ 3,01	70,19 $\pm$ 2,70	64,26 $\pm$ 4,74	< 0,0001	0,21	0,57
AP (%)	51,70 $\pm$ 4,78	53,19 $\pm$ 5,45	59,05 $\pm$ 2,52	38,53 $\pm$ 5,80	0,43	0,04	0,02

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014).

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; IC: grupo insulado e não tratado. O nível de significância foi de 0,05.

6.3.1.2 Efeito da insulação sobre a temperatura média da superfície escrotal (TMSE)

Ao comparar ao longo do tempo a TMSE dos grupos não submetidos à insulação (CC, CA e CL) e insulados (IC, IA e IL) pode-se notar que houve aumento ($p < 0,05$) da TMSE nos animais insulados somente no dia da retirada da bolsa. Nos outros dias, a TMSE dos dois grupos foi semelhante ($p > 0,05$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Média da temperatura média da superfície escrotal (TMSE, ° C) de carneiros submetidos (insulados) ou não (controle) à insulação testicular um dia antes da colocação das bolsas insuladoras (In-1), no dia da colocação das bolsas (In0), no dia de retirada das bolsas (In3), um dia após (In4), dois dias após (In5), três dias após (In6), quatro dias após (In7) e cinco dias após (In8) a retirada das bolsas

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014).

Legenda: Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$). Houve interação tempo x tratamento ($p < 0,0001$) e diferença entre os tratamentos no D3 ($p < 0,0001$)

6.3.1.3 Efeito da insulação sobre a concentração sérica de testosterona

Não houve interação tempo x tratamento ($p = 0,67$) nem efeito de tratamento ($p = 0,40$) e tempo ($p = 0,97$) para a concentração sérica de testosterona comparada entre CC e IC no período antes (T1, T2 e T3) e após (T4, T5 e T6) a insulação escrotal (momento PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO).

Em relação às dosagens de testosterona feitas durante o período em que os animais estavam com as bolsas insuladoras (momento INSULAÇÃO), não houve diferença na concentração sérica de testosterona ($p = 0,97$) entre os grupos controle (CC, CA e CL) e insulado (IC, IA e IL). Os momentos de colheitas de sangue, feito a cada 4h ao longo do dia, e

o dia em que a amostra foi colhida (um dia antes de colocar a bolsa – In-1, durante o período com a bolsa – In1 ou um dia após a retirada da bolsa – In4) não influenciaram ($p = 0,06$) a concentração sérica de testosterona (Gráficos 8, 9, 10 e 11).

Gráfico 8 – Média da concentração sérica de testosterona (ng/mL) de carneiros submetidos (insulados) ou não (controle) à insulação testicular um dia antes (In-1) da colocação das bolsas insuladoras

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014).

Gráfico 9 – Média da concentração sérica de testosterona (ng/mL) de carneiros submetidos ou não à insulação testicular 48h (In1) após a colocação das bolsas insuladoras

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014).

Gráfico 10 – Média da concentração sérica de testosterona (ng/mL) de carneiros submetidos ou não à insulação testicular após 48h (In4) da retirada das bolsas insuladoras

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014).

Gráfico 11 – Média $\pm$ erro padrão da concentração sérica de testosterona (ng/mL) de carneiros submetidos ou não à insulação testicular antes (In-1); durante (In1) e depois (In4) da insulação testicular

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014).

6.3.2 Efeito dos tratamentos

O efeito dos tratamentos foi testado através do teste de contrastes. Para a avaliação do efeito dos tratamentos, foram considerados os dados ultrassonográficos, termográficos, avaliação espermática e histopatológica. Além dos dados abordados nos resultados, foram colhidos também dados referentes à frequência respiratória e circunferência escrotal dos animais; temperatura de um ponto do escroto por termografia, temperatura média do plexo pampiniforme por termografia; volume, aspecto e turbilhonamento do ejaculado, sendo todos esses resultados expostos nos apêndices G, H, I, J, L, M e N.

6.3.2.1 Efeito dos tratamentos sobre as características ultrassonográficas

Não houve efeito da insulação nos tratamentos para as características avaliadas pela ultrassonografia modo-B e modo Doppler colorido (Tabela 11). Somente a homogeneidade do parênquima direito (HoPD) avaliada pela ultrassonografia modo-B apresentou interação tempo x tratamento ($p = 0,01$) sendo as diferenças nos tempos T1, T2, T5 e T7 (Tabela 12). Nos tempos T1 e T2, as diferenças ocorreram antes dos animais serem submetidos à insulação e aos tratamentos. Nos tempos T5 e T7, houve diferença entre os tratamentos com vitamina A (CA e IA) e LTBI (CL e IL), sendo que a vitamina A nesses tempos resultou em maior homogeneidade do parênquima direito, com presença de poucos pontos anecóicos patológicos, do que a LTBI.

Houve diferença entre os tratamentos com vitamina A e LTBI também para o escore de vascularização do parênquima testicular direito, sendo maior para a vitamina A (CA, IA) do que para a LTBI (CL, IL). Além dessa diferença, houve efeito dos tratamentos nos insulados da vascularização do parênquima testicular direito, sendo em IA e IL maior que em IC; para o parênquima esquerdo houve tendência para o mesmo efeito ($p = 0,0505$). Houve, ainda, efeito dos tratamentos nos não insulados para esse escore, sendo maior no CC do que em CA e CL. Para todas as outras características não foram encontrados outros efeitos nos contrastes (Tabela 11).

Tabela 11 – Média $\pm$ erro padrão das características ultrassonográficas avaliadas durante o período experimental nos tempos T1 a T9. As características avaliadas foram: HoPD: escore de homogeneidade do parênquima testicular direito; HoPE: escore de homogeneidade do parênquima testicular esquerdo; HiPD: presença de pontos hiperecoicos do parênquima testicular direito; HiPE: presença de pontos hiperecoicos do parênquima testicular esquerdo; RID: índice de resistência das artérias suprategiculares direitas; RIE: índice de resistência das artérias suprategiculares esquerdas; PPD: escore de vascularização do plexo pampiniforme direito; PPE: escore de vascularização do plexo pampiniforme esquerdo; VPD: escore de vascularização do parênquima testicular direito; VPE: escore de vascularização do parênquima testicular esquerdo; e TMSE: temperatura média da superfície escrotal

Características ultrassonográficas e termográficas	Tratamentos						Probabilidades							Tempo x Trat
	CC	CA	CL	IC	IA	IL	EI	ET	VL	ETI	ETN	Trat	Tempo	
HoPD	0,71 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,05	0,46	0,36	0,17	0,12	0,89	0,41	<0,0001	0,01
HoPE	0,87 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,05	0,76	0,81	0,14	0,57	0,82	0,64	<0,0001	0,31
HiPD	1,01 $\pm$ 0,11	1,17 $\pm$ 0,09	1,46 $\pm$ 0,14	1,53 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,11	1,84 $\pm$ 0,11	0,40	0,33	0,10	0,85	0,47	0,47	0,007	0,99
HiPE	0,89 $\pm$ 0,10	1,16 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,15	1,59 $\pm$ 0,13	1,09 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,10	0,48	0,34	0,24	0,52	0,30	0,64	0,005	0,73
RID	0,56 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,01	0,20	0,70	0,26	0,61	0,35	0,26	0,02	0,55
RIE	0,53 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,01	0,78	0,87	0,15	0,61	0,45	0,20	0,14	0,97
PPD	3,06 $\pm$ 0,10	3,30 $\pm$ 0,09	3,29 $\pm$ 0,10	3,13 $\pm$ 0,10	2,89 $\pm$ 0,11	3,03 $\pm$ 0,08	0,20	0,68	0,73	0,51	0,32	0,60	<0,0001	0,46
PPE	3,22 $\pm$ 0,10	3,46 $\pm$ 0,11	3,09 $\pm$ 0,13	3,30 $\pm$ 0,13	3,00 $\pm$ 0,11	2,98 $\pm$ 0,10	0,34	0,40	0,46	0,27	0,82	0,59	0,0003	0,75
VPD	1,62 $\pm$ 0,14	1,24 $\pm$ 0,14	1,11 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,15	1,61 $\pm$ 0,13	1,10 $\pm$ 0,09	0,51	0,14	0,01	0,04	0,01	0,007	<0,0001	0,05
VPE	1,12 $\pm$ 0,15	1,39 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,10	0,88 $\pm$ 0,14	1,40 $\pm$ 0,12	1,27 $\pm$ 0,11	0,78	0,29	0,11	0,05	0,76	0,20	<0,0001	0,83
TMSE (° C)	30,57 $\pm$ 0,12	30,80 $\pm$ 0,09	30,52 $\pm$ 0,10	30,24 $\pm$ 0,10	30,33 $\pm$ 0,10	30,20 $\pm$ 0,10	0,04	0,27	0,35	0,93	0,76	0,37	<0,0001	0,23

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014).

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI; EI (contraste 1, efeito da insulação nos tratamentos): a comparação entre CC, CA e CL x IC, IA e IL; ET (contraste 2, efeito dos tratamentos): a comparação entre CC x IA e IL; VL (contraste 3, diferença entre a vitamina A e a LTBI): a comparação entre CA e IA x CL e IL; ETI (contraste 4, efeito dos tratamentos nos insulados): a comparação entre IC x IA e IL; ETN (contraste 5, efeito dos tratamentos nos não insulados): a comparação entre CC x CA e CL. Trat: efeito de tratamento; Trat x tem: interação tempo x tratamento. O nível de significância foi de 0,05.

Tabela 12 – Média $\pm$ erro padrão do escore de homogeneidade do parênquima testicular direito (HoPD) nos tempos T1 a T9

HoPD	Tratamentos						Probabilidades					Trat
	CC	CA	CL	IC	IA	IL	EI	ET	VL	ETI	ETN	
T1	0,26 $\pm$ 0,11	0,64 $\pm$ 0,15	0,20 $\pm$ 0,12	0,41 $\pm$ 0,14	0,80 $\pm$ 0,12	0,58 $\pm$ 0,09	0,84	0,01	0,01	0,11	0,33	0,02
T2	1,06 $\pm$ 0,24	0,58 $\pm$ 0,15	0,53 $\pm$ 0,22	0,33 $\pm$ 0,14	0,60 $\pm$ 0,19	0,66 $\pm$ 0,16	0,64	0,08	0,96	0,21	0,04	0,22
T3	0,59 $\pm$ 0,19	0,66 $\pm$ 0,12	0,73 $\pm$ 0,28	0,60 $\pm$ 0,28	0,61 $\pm$ 0,15	0,61 $\pm$ 0,13	0,67	0,95	0,86	0,96	0,68	0,99
T4	0,86 $\pm$ 0,13	0,69 $\pm$ 0,13	0,73 $\pm$ 0,16	0,73 $\pm$ 0,26	0,83 $\pm$ 0,16	1,13 $\pm$ 0,19	0,76	0,60	0,34	0,27	0,50	0,51
T5	0,86 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,15	1,06 $\pm$ 0,26	0,66 $\pm$ 0,27	0,94 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,10	0,89	0,56	0,04	0,15	0,58	0,11
T6	0,86 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,14	0,93 $\pm$ 0,19	0,86 $\pm$ 0,16	0,94 $\pm$ 0,10	1,19 $\pm$ 0,15	0,59	0,28	0,15	0,28	0,88	0,40
T7	0,53 $\pm$ 0,20	0,47 $\pm$ 0,13	0,72 $\pm$ 0,10	0,93 $\pm$ 0,26	0,53 $\pm$ 0,17	1,05 $\pm$ 0,14	0,12	0,10	0,02	0,10	0,43	0,10
T8	0,73 $\pm$ 0,19	0,61 $\pm$ 0,13	0,86 $\pm$ 0,24	0,86 $\pm$ 0,16	0,72 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,12	0,92	0,87	0,29	0,61	0,97	0,86
T9	0,60 $\pm$ 0,18	0,69 $\pm$ 0,10	0,93 $\pm$ 0,22	0,63 $\pm$ 0,18	0,66 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,12	0,06	0,23	0,07	0,31	0,28	0,34

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014).

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI; EI (contraste 1, efeito da insulação nos tratamentos): a comparação entre CC, CA e CL x IC, IA e IL; ET (contraste 2, efeito dos tratamentos): a comparação entre CC x IA e IL; VL (contraste 3, diferença entre a vitamina A e a LTBI): a comparação entre CA e IA x CL e IL; ETI (contraste 4, efeito dos tratamentos nos insulados): a comparação entre IC x IA e IL; ETN (contraste 5, efeito dos tratamentos nos não insulados): a comparação entre CC x CA e CL. Trat: efeito de tratamento; Trat x tem: interação tempo x tratamento. O nível de significância foi de 0,05.

6.3.2.2 Efeito dos tratamentos sobre a termografia

A temperatura média da superfície escrotal (TMSE) somente apresentou efeito da insulação nos tratamentos ($p < 0,05$), sendo que a TMSE dos animais dos grupos insulados foi menor que a TMSE dos animais dos grupos que não foram submetidos à insulação escrotal. Apesar de haver este efeito, não houve diferença entre os tratamentos com vitamina A e LTBI (Tabela 11).

6.3.2.3 Efeito dos tratamentos sobre as características espermáticas

Para a cinética espermática, somente a frequência de batimento (BCF, Hz) e a retilinearidade (STR, %) tiveram efeito da insulação nos tratamentos, sendo maior nos grupos não insulados do que nos grupos insulados (Tabela 13). Para o resto das características, somente a motilidade total (MT, %) apresentou tendência ($p = 0,07$) a apresentar este efeito (Gráfico 12 e Tabela 13). Houve efeito da eficiência dos tratamentos para a MT, a motilidade progressiva (MPROG, %), BCF e STR, sendo que CC foi maior do que IA e IL.

Somente MPROG e STR apresentaram efeito dos tratamentos nos insulados, sendo que IC apresentou maior MPROG e STR que IA e IL. Para as outras características, não foram encontrados outros efeitos (Tabela 13).

Tabela 13 – Média ± erro padrão das características espermáticas avaliadas durante o período experimental nos tempos T1 a T9. As características avaliadas foram: MT (%): motilidade total; MPROG (%): motilidade progressiva; VAP (µm/s): velocidade do trajeto; VSL (µm/s): velocidade progressiva; VCL (µm/s): velocidade curvilinear; ALH (µm): deslocamento lateral da cabeça; BCF (Hz): frequência de batimento; STR (%): retilinearidade; LIN (%): linearidade; PIAIA (%): membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de mitocôndria; PI (%): membrana plasmática íntegra; AI (%): membrana acrossomal íntegra; AP (%): alto potencial de membrana mitocondrial (%); TB E (ng/mL): TBARS espontâneo; TB I (ng/mL): TBARS induzido; sem/leve EO (%): sem a leve estresse oxidativo; EO mod (%): estresse oxidativo moderado; EO intenso (%): estresse oxidativo intenso; DNA íntegro (%); Def. menores (%): defeitos menores; Def. maiores (%): defeitos maiores; Def. totais (%): defeitos totais

Características espermáticas	Tratamentos						Probabilidades							Tempo x trat
	CC	CA	CL	IC	IA	IL	EI	ET	VL	ETI	ETN	Trat	Tempo	
MT (%)	76,25±2,21	67,36±2,68	71,16±2,37	71,28±3,22	64,24±3,52	64,79±3,42	0,07	0,007	0,49	0,10	0,09	0,11	< 0,0001	0,11
MPROG (%)	54,44±1,93	46,87±2,26	50,54±1,83	52,14±2,69	46,14±2,85	40,97±2,60	0,10	0,008	0,80	0,03	0,15	0,05	< 0,0001	0,15
VAP (µm/s)	112,46±3,41	102,24±3,33	112,28±3,11	108,49±4,79	107,42±4,55	101,45±4,03	0,55	0,33	0,75	0,62	0,53	0,75	< 0,0001	0,46
VSL (µm/s)	99,26±3,09	90,12±3,04	99,45±2,82	95,77±4,18	94,04±4,06	85,46±3,44	0,32	0,17	0,94	0,39	0,52	0,44	< 0,0001	0,35
VCL (µm/s)	125,54±3,42	113,95±3,68	124,18±3,49	119,00±5,17	117,00±4,84	113,74±4,33	0,42	0,25	0,61	0,68	0,47	0,76	< 0,0001	0,45
ALH (µm)	2,52±0,10	2,37±0,10	2,45±0,09	2,20±0,11	2,18±0,09	2,35±0,10	0,12	0,20	0,43	0,73	0,57	0,62	< 0,0001	0,71
BCF (Hz)	9,56±0,17	9,10±0,15	9,51±0,18	8,67±0,25	8,83±0,28	9,00±0,25	0,004	0,02	0,19	0,37	0,37	0,05	0,01	0,44
STR (%)	88,29±0,76	89,09±0,74	88,68±0,81	87,79±1,05	84,26±2,37	84,52±0,89	0,007	0,01	0,71	0,03	0,94	0,03	< 0,0001	0,81
LIN (%)	79,20±1,25	79,23±1,21	80,47±1,16	79,63±1,69	77,21±2,28	75,16±1,20	0,21	0,28	0,85	0,22	0,81	0,56	< 0,0001	0,89
PIAIA (%)	54,47±2,21	43,97±2,70	50,26±2,63	47,65±3,06	42,29±2,72	41,01±2,54	0,03	0,003	0,43	0,14	0,08	0,05	< 0,0001	0,08
PI (%)	64,54±2,20	52,85±2,67	60,73±2,41	54,69±3,19	50,92±2,94	52,17±2,69	0,02	0,005	0,18	0,47	0,08	0,06	0,004	0,05
AI (%)	75,01±2,10	65,82±2,80	72,32±2,36	71,68±2,50	66,42±2,96	63,57±2,68	0,13	0,01	0,54	0,08	0,13	0,08	< 0,0001	0,46
AP (%)	58,50±2,25	47,77±2,85	54,47±2,78	52,22±3,22	46,22±2,86	44,96±2,65	0,054	0,006	0,43	0,14	0,10	0,08	< 0,0001	0,08
TB E (ng/mL)	256,92±70,39	150,62±24,36	194,09±50,98	296,81±73,52	286,62±66,17	258,56±53,23	0,36	0,95	0,86	0,92	0,35	0,85	0,01	0,23
TB I (ng/mL)	5449,06±573,170	4882,54±486,23	5079,48±421,45	7323,02±913,65	5877,67±549,63	6051,97±848,13	0,14	0,68	0,85	0,35	0,71	0,67	0,64	0,06
Sem/leve EO (%)	82,68±2,63	87,29±1,59	82,11±2,98	86,69±2,44	85,25±2,26	83,81±2,70	0,65	0,65	0,31	0,60	0,63	0,84	< 0,0001	0,15
EO mod (%)	16,98±2,63	11,40±1,59	14,90±2,70	12,69±2,34	14,29±2,24	15,44±2,50	0,89	0,55	0,40	0,53	0,28	0,76	< 0,0001	0,74
EO intenso (%)	0,94±0,45	1,29±0,53	2,68±1,28	0,61±0,20	0,45±0,12	0,73±0,42	0,03	0,61	0,13	0,96	0,15	0,10	0,0004	0,06
DNA íntegro (%)	99,25±0,29	98,68±0,65	98,79±0,47	98,17±0,77	98,21±0,55	96,30±1,29	0,06	0,07	0,30	0,40	0,66	0,23	0,001	0,57
Def. menores (%)	10,68±1,35	9,75±1,23	10,22±1,35	11,11±1,60	6,82±0,75	9,64±1,31	0,48	0,27	0,34	0,19	0,75	0,57	< 0,0001	0,22
Def.maiores (%)	13,95±1,50	15,16±1,52	12,65±1,06	25,20±3,56	33,16±3,64	28,06±3,08	< 0,0001	0,0008	0,28	0,23	0,99	0,0008	< 0,0001	< 0,0001
Def. totais (%)	24,64±2,1	24,92±2,02	22,87±1,85	36,31±3,68	39,98±3,68	37,71±3,33	0,0011	0,02	0,63	0,66	0,89	0,003	< 0,0001	< 0,0001

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014).

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI; EI (contraste 1, efeito da insulação nos tratamentos): a comparação entre CC, CA e CL x IC, IA e IL; ET (contraste 2, efeito dos tratamentos): a comparação entre CC x IA e IL; VL (contraste 3, diferença entre a vitamina A e a LTBI): a comparação entre CA e IA x CL e IL; ETI (contraste 4, efeito dos tratamentos nos insulados): a comparação entre IC x IA e IL; ETN (contraste 5, efeito dos tratamentos nos não insulados): a comparação entre CC x CA e CL. Trat: efeito de tratamento; Trat x tem: interação tempo x tratamento. O nível de significância foi de 0,05.

Gráfico 12 – Média da motilidade total (%) de espermatozoides ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Os defeitos maiores e totais apresentaram interação tempo x tratamento (Tabela 14 e Gráficos 13 e 14). Nos tempos T4 e T5, houve efeito da insulação nos tratamentos sendo que os grupos não insulados apresentaram menos células com defeitos maiores e totais do que os grupos insulados. Houve efeito dos tratamentos, sendo que CC apresentou menos defeitos maiores e totais do que os grupos IA e IL no T4, T5, T6, T7 e T8. No T8, houve diferença entre os tratamentos com vitamina A e LTBI, sendo que a vitamina A resultou em espermatozoides com mais defeitos maiores do que os grupos tratados com LTBI. Neste mesmo tempo experimental, houve efeito dos tratamentos nos insulados, sendo que IC teve menos defeitos espermáticos maiores que IA e IL.

Gráfico 13 – Média de defeitos espermáticos maiores (%) de espermatozoides ovinos nos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Gráfico 14– Média de defeitos espermáticos totais (%) de espermatozoides ovinos nos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Tabela 14 – Média $\pm$ erro padrão dos defeitos espermáticos maiores e totais (%) nos tempos T1 a T9

Defeitos maiores (%)	Tratamentos							Probabilidades				
	CC	CA	CL	IC	IA	IL	EI	ET	VL	ETI	ETN	Trat
T1	15,00 $\pm$ 3,94	5,75 $\pm$ 0,49	12,70 $\pm$ 3,23	6,80 $\pm$ 1,83	4,33 $\pm$ 2,05	9,83 $\pm$ 3,19	0,74	0,02	0,02	0,93	0,09	0,05
T2	7,20 $\pm$ 1,99	10,75 $\pm$ 3,14	10,10 $\pm$ 2,63	8,60 $\pm$ 1,39	15,00 $\pm$ 4,22	8,50 $\pm$ 2,58	0,84	0,22	0,22	0,39	0,39	0,49
T3	9,82 $\pm$ 3,92	11,66 $\pm$ 6,25	11,00 $\pm$ 4,37	7,95 $\pm$ 2,02	10,08 $\pm$ 4,58	12,95 $\pm$ 6,74	0,54	0,79	0,82	0,58	0,81	0,98
T4	23,40 $\pm$ 4,96	18,56 $\pm$ 3,86	14,30 $\pm$ 4,53	44,04 $\pm$ 6,81	51,95 $\pm$ 7,69	46,25 $\pm$ 4,31	0,006	0,001	0,37	0,47	0,33	<0,0001
T5	22,20 $\pm$ 6,45	18,81 $\pm$ 5,67	17,80 $\pm$ 4,51	67,00 $\pm$ 12,09	70,16 $\pm$ 7,38	46,83 $\pm$ 11,14	0,001	0,001	0,15	0,42	0,71	<0,0001
T6	13,60 $\pm$ 6,02	10,53 $\pm$ 2,27	13,60 $\pm$ 1,65	38,50 $\pm$ 11,75	42,46 $\pm$ 9,83	43,75 $\pm$ 10,08	0,18	0,006	0,78	0,65	0,88	0,007
T7	8,80 $\pm$ 1,82	14,75 $\pm$ 1,85	12,30 $\pm$ 1,93	24,90 $\pm$ 5,49	35,58 $\pm$ 7,89	38,66 $\pm$ 11,99	0,83	0,002	0,96	0,16	0,59	0,01
T8	14,30 $\pm$ 3,12	25,75 $\pm$ 3,77	10,20 $\pm$ 2,73	15,10 $\pm$ 4,73	41,16 $\pm$ 11,06	26,83 $\pm$ 5,39	0,61	0,01	0,02	0,02	0,64	0,01
T9	11,30 $\pm$ 3,31	19,91 $\pm$ 6,57	11,90 $\pm$ 2,97	13,92 $\pm$ 2,96	27,75 $\pm$ 10,52	19,00 $\pm$ 3,67	0,88	0,12	0,17	0,22	0,55	0,40
Defeitos totais (%)												
T1	22,50 $\pm$ 3,86	17,58 $\pm$ 4,65	21,70 $\pm$ 5,22	16,20 $\pm$ 2,64	10,08 $\pm$ 2,83	16,00 $\pm$ 3,19	0,49	0,05	0,19	0,51	0,56	0,26
T2	21,40 $\pm$ 4,40	22,83 $\pm$ 4,65	21,90 $\pm$ 7,40	19,70 $\pm$ 2,65	25,75 $\pm$ 6,43	16,16 $\pm$ 3,08	0,63	0,94	0,29	0,84	0,88	0,82
T3	25,40 $\pm$ 11,08	18,50 $\pm$ 5,92	23,90 $\pm$ 8,28	24,83 $\pm$ 9,91	16,75 $\pm$ 5,33	20,40 $\pm$ 7,12	0,83	0,49	0,56	0,53	0,67	0,95
T4	31,70 $\pm$ 5,02	30,30 $\pm$ 7,07	21,80 $\pm$ 5,38	66,18 $\pm$ 6,23	60,38 $\pm$ 7,37	65,91 $\pm$ 6,57	0,01	0,0006	0,81	0,71	0,49	<0,0001
T5	33,00 $\pm$ 6,07	24,73 $\pm$ 6,81	29,20 $\pm$ 5,12	69,00 $\pm$ 11,66	72,58 $\pm$ 7,39	50,30 $\pm$ 10,28	0,001	0,01	0,28	0,47	0,57	0,0005
T6	26,70 $\pm$ 10,06	18,45 $\pm$ 4,71	18,40 $\pm$ 2,65	52,70 $\pm$ 10,36	51,35 $\pm$ 10,08	55,91 $\pm$ 7,70	0,06	0,01	0,77	0,92	0,42	0,002
T7	24,30 $\pm$ 7,17	28,50 $\pm$ 5,69	28,10 $\pm$ 6,69	35,60 $\pm$ 5,32	44,66 $\pm$ 8,56	51,16 $\pm$ 10,86	0,87	0,02	0,69	0,22	0,69	0,13
T8	22,30 $\pm$ 5,20	37,41 $\pm$ 4,34	20,30 $\pm$ 5,23	19,80 $\pm$ 5,66	46,83 $\pm$ 11,50	38,08 $\pm$ 7,62	0,70	0,03	0,08	0,02	0,48	0,06
T9	14,50 $\pm$ 3,73	25,98 $\pm$ 8,55	20,60 $\pm$ 5,48	22,82 $\pm$ 3,74	31,50 $\pm$ 11,08	25,50 $\pm$ 5,72	0,85	0,13	0,43	0,54	0,35	0,70

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014).

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI; EI (contraste 1, efeito da insulação nos tratamentos): a comparação entre CC, CA e CL x IC, IA e IL; ET (contraste 2, efeito dos tratamentos): a comparação entre CC x IA e IL; VL (contraste 3, diferença entre a vitamina A e a LTBI): a comparação entre CA e IA x CL e IL; ETI (contraste 4, efeito dos tratamentos nos insulados): a comparação entre IC x IA e IL; ETN (contraste 5, efeito dos tratamentos nos não insulados): a comparação entre CC x CA e CL. Trat: efeito de tratamento; Trat x tem: interação tempo x tratamento. O nível de significância foi de 0,05.

A integridade de membrana plasmática (PI) e acrossomal (AI) e o alto potencial de membrana mitocondrial (AP) foram analisados separadamente, PI, AI e AP e conjuntamente, PIAIA. Houve efeito da insulação nos tratamentos para PIAIA, sendo que os grupos não insulados apresentaram maior porcentagem de células PIAIA do que os grupos insulados (Gráfico 15). O mesmo efeito foi observado para PI. Houve efeito dos tratamentos para PIAIA, PI, AI e AP sendo que as porcentagens foram maiores no grupo CC do que nos grupos IA e IL. Para os outros contrastes não foram observados efeitos (Tabela 13).

Gráfico 15 – Média das células com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA, %) no sêmen de ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Não houve efeito dos contrastes para a avaliação do estresse oxidativo pelo TBARS espontâneo e TBARS induzido. Entretanto, houve efeito da insulação nos tratamentos, sendo a porcentagem de células com alta taxa de ROS maior nos grupos ($p < 0,05$) não insulados do que nos grupos insulados (Tabela 13 e Gráfico 16). Para os outros contrastes não foram observados efeitos.

Gráfico 16 – Média de espermatozoides ovinos sem ou com leve estresse oxidativo (%) nos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Houve tendência a ter efeito da insulação nos tratamentos na taxa de espermatozoides com integridade de DNA apresentou tendência ($p = 0,08$). Tendência estatística também foi observada para o efeito dos tratamentos (Tabela 13 e Gráfico 17). Para os outros contrastes não houve diferença.

Gráfico 17 – Média de DNA íntegro (%) de espermatozoides ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

6.3.2.4 Efeito dos tratamentos sobre a concentração sérica de testosterona

A concentração sérica de testosterona, apesar de não apresentar diferença ($p = 0,62$) em relação ao período em que o sangue foi colhido (M7H: $9,63 \pm 0,43\text{ng/mL}$ x M15H: $9,32 \pm 0,42\text{ng/mL}$), apresentou efeito da insulação nos tratamentos, sendo menor ($p = 0,01$) nos grupos insulados do que nos grupos não insulados (Tabela 15 e Gráfico 18).

Gráfico 18 – Média da concentração sérica de testosterona (ng/dL) de ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, nos períodos antes (T1 a T3) e após a insulação testicular (T4 a T9)

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

6.3.2.5. Efeito dos tratamentos sobre os túbulos seminíferos

Não houve efeito da insulação nos tratamentos ($p = 0,28$) na relação epitélio/túbulo seminífero em nenhum dos contrastes avaliados. Entretanto, houve tendência ($p = 0,08$) a ter efeito dos tratamentos nos insulados (Tabela 15 e Gráfico 19).

Tabela 15 – Média $\pm$ erro padrão da concentração sérica de testosterona (ng/mL) e da relação epitélio seminífero/túbulo seminífero (%) de testículos de ovinos dos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI

Testosterona e histopatológico	Tratamentos							Probabilidades						
	CC	CA	CL	IC	IA	IL	EI	ET	VL	ETI	ETN	Trat	Tempo	Tempo x trat
Testosterona (ng/mL)	10,11 $\pm$ 0,89	11,05 $\pm$ 0,83	10,29 $\pm$ 0,70	9,34 $\pm$ 0,71	7,46 $\pm$ 0,79	8,71 $\pm$ 0,80	0,01	0,07	0,84	0,34	0,69	0,09	0,59	0,18
Relação epitélio seminífero/túbulo (%)	72,66 $\pm$ 1,10	74,52 $\pm$ 1,08	71,69 $\pm$ 1,59	74,44 $\pm$ 1,22	69,52 $\pm$ 1,41	73,83 $\pm$ 1,26	0,28	0,54	0,56	0,08	0,78	0,03	-	-

Fonte: (ALVES, M. B. R., 2014)

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI; EI (contraste 1, efeito da insulação nos tratamentos): a comparação entre CC, CA e CL x IC, IA e IL; ET (contraste 2, efeito dos tratamentos): a comparação entre CC x IA e IL; VL (contraste 3, diferença entre a vitamina A e a LTBI): a comparação entre CA e IA x CL e IL; ETI (contraste 4, efeito dos tratamentos nos insulados): a comparação entre IC x IA e IL; ETN (contraste 5, efeito dos tratamentos nos não insulados): a comparação entre CC x CA e CL. Trat: efeito de tratamento; Trat x tem: interação tempo x tratamento. O nível de significância foi de 0,05.

Gráfico 19 – Média $\pm$ erro padrão da relação epitélio/túbulo seminífero (%) de testículos ovinos nos grupos CC: não insulado e não tratado; CA: não insulado e tratado com vitamina A; CL: não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: insulado e tratado com vitamina A; IL: insulado e tratado com LTBI, 145 dias após a insulação testicular

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

6.4 DISCUSSÃO

Para estudar o tratamento da degeneração testicular em carneiros por suplementação com vitamina A ou LTBI foi feita indução experimental desta alteração por insulação testicular, como citado previamente por outros autores (SETCHELL, 1998; LOVE; KENNEY, 1999; BRITO et al., 2003). Assim será discutido inicialmente a eficácia da metodologia utilizada para a indução da degeneração e em seguida sobre a eficiência dos tratamentos após a certificação da indução da afecção.

6.4.1 Efeito da insulação

A insulação escrotal foi feita nos carneiros para indução da degeneração testicular pelo aumento de temperatura provocado pela colocação das bolsas insuladoras conforme preconizado por SETCHELL (1998) e estudado por Arman et al. (2006), Brito et al. (2003), Rahman et al. (2001), Vogler et al. (1993) e Love e Kenney (1999), que mostraram que as bolsas insuladoras foram capazes de induzir a degeneração testicular em carneiros, touros e

ganhos. Esses autores evidenciam que há queda da motilidade entre 12 a 42 dias após a insulação escrotal, indo de acordo com os resultados obtidos neste experimento, que mostraram que a motilidade total do grupo IC foi menor do que no grupo CC. Além disso, houve aumento dos defeitos maiores e totais no período pós-insulação no grupo IC em relação ao grupo CC. O aumento dos defeitos maiores foi constatado por outros autores após a insulação escrotal de touros (VOGLER et al., 1993; GARCIA, 2004) e carneiros (MOULE; WAITES, 1963). Ademais, as porcentagens de células PIAIA e AP diminuíram no período pós-insulação para o grupo IC, mostrando que houve efeito da insulação sobre as características espermáticas. Garcia (2004) também observou queda das taxas de células PIAIA no período pós-insulação em touros. Portanto, a colocação das bolsas de insulação foi suficiente para induzir a degeneração testicular conforme preconizado por Setchell (1998).

A colocação das bolsas insuladoras tem por objetivo impedir a troca de temperatura da superfície escrotal com o ambiente. Sendo assim, há perda da termorregulação e consequente aumento de temperatura desta superfície. A termografia escrotal foi eficiente em detectar o aumento de temperatura provocado pelas bolsas insuladoras no dia da retirada das mesmas. O aumento da TMSE pode ser correlacionado com o aumento da temperatura testicular, uma vez que Coulter et al. (1988) constataram que há diferença de 4,8° C entre a TMSE e a temperatura interna testicular em uma temperatura ambiente de 24 a 26,6° C. Dessa forma, pode-se constatar que a insulação aumentou a TMSE e consequentemente a temperatura testicular dos carneiros. Entretanto, a TMSE dos carneiros volta a ser igual ao período de antes da colocação das bolsas insuladoras no dia seguinte à retirada das bolsas. Dessa forma, a colocação das bolsas insuladoras somente induz aumento de temperatura durante o período com o insulto. Após o período, os carneiros conseguiram reestabelecer a termorregulação testicular conforme observado por Barros et al. (2011) que mostraram que o escroto possui grande capacidade termorregulatória e consegue reestabelecer rapidamente a temperatura testicular após a diminuição do fluxo sanguíneo.

A concentração sérica de testosterona de CC e IC avaliada nos tempos T1 a T6 (momentos PRÉ E PÓS-INSULAÇÃO) e a concentração avaliada no período em que foram colocadas as bolsas de insulação (momento INSULAÇÃO) não apresentou queda significativa nos grupos insulados como era esperado, uma vez que a produção deste hormônio dentre outros fatores pode diminuir em decorrência da perda das células de Leydig

(ODEH et al., 2014 no prelo)³. Sabe-se que a degeneração testicular, dependendo do grau, pode acometer estas células. Entretanto, é relatado que estas possuem resistência relativa e conseguem proliferar após serem acometidas por danos (LAGERLOF, 1938; MORRIS et al., 1986; BICUDO et al., 2007; ODEH et al., 2014 no prelo)³. Corroborando os achados do presente estudo, trabalhos feitos em bodes e em carneiros mantidos em condições de estresse calórico mostraram que não houve diminuição das concentrações séricas da testosterona (COELHO et al., 2008; RASOOLI et al., 2010). Contrariamente, Souza (2004) observou diminuição da concentração de testosterona dosada no plasma seminal. Dessa forma, o estresse promovido pela colocação das bolsas insuladoras provavelmente não foi suficiente para causar a degeneração das células de Leydig presentes nos testículos dos carneiros insulados de forma significativa ou a recuperação destas células foi extremamente rápida conforme descrito por diversos autores (LAGERLOF, 1938; MORRIS et al., 1986; BICUDO et al., 2007; ODEH et al., 2014 no prelo)³. Não houve ainda variação circadiana da testosterona nos animais insulados e não insulados. Estes dados estão de acordo com os achados de Souza et al. (2006) e de D'Occhio e Brooks (1983) que não observaram ritmo circadiano da testosterona em carneiros.

Quanto ao grau de comprometimento dos túbulos seminíferos, devido ao fato de que a insulação não modificou a concentração sérica de testosterona, mas foi capaz de alterar as características espermáticas, pode-se inferir que o grau da degeneração induzido foi de leve a moderado; sendo o estresse induzido pela colocação das bolsas, portanto, diferente do estresse induzido pela injeção de substâncias intratesticulares, que induzem um grau severo, como em estudo realizado por Morris et al. (1986) em ratos que mostrou que após 12 horas da injeção de metano sulfonato de etila nos testículos há alterações degenerativas nas células de Leydig, sendo que 4 dias não foram observadas células de Leydig intactas no espaço intersticial.

³ ODEH, H. M.; KLEINGUETL, C. E.; GE, R.; ZIRKIN, B. R.; CHEN, H. Regulation of the Proliferation and Differentiation of Leydig Stem Cells in the Adult Testis. **Biology of Reproduction**, 16 abr. 2014.

6.4.2 Efeito dos tratamentos

Para a verificação da efetividade dos tratamentos foram avaliadas características ultrassonográficas, termográficas, espermáticas e a concentração sérica de testosterona.

No tocante às características ultrassonográficas color-Doppler, não houve efeito da insulação nos tratamentos para o índice de resistência e para a vascularização do plexo pampiniforme; os dados condizem com as informações de Setchell (1998) que afirma não haver aumento do fluxo sanguíneo testicular durante o aumento de temperatura que ocorre na degeneração testicular. Os dados estão de acordo com outros autores que também não observaram aumento do fluxo sanguíneo testicular em carneiros (WAITES; SETCHELL, 1964) e em ratos (WAITES et al., 1973) frente ao aumento de temperatura testicular.

Houve efeito dos tratamentos, diferença entre os tratamentos com vitamina A e LTBI e efeito dos tratamentos nos não insulados, sendo que os dados indicam que os tratamentos aumentam a vascularização nos animais insulados e diminuem nos animais não insulados. Além disso, os grupos tratados com a vitamina A tiveram maior vascularização do que os tratados com a LTBI. Segundo Mester (2013) a LTBI tem o poder de aumentar a vascularização do local em que é aplicada, entretanto no estudo, apesar de ter sido observada maior vascularização dos grupos IL e IA em relação a IC, a vitamina A foi mais eficiente em aumentar a vascularização do que a LTBI. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que durante o período de tratamento com a vitamina A, esta provocou reação inflamatória no local da aplicação conforme relatado como uma possível causa de reação inflamatória por Duque e Chagas (2009). A reação inflamatória pode ser local ou sistêmica e isso dependerá, segundo Voltarelli (1994), da capacidade homeostática local, que pode ser superada pela magnitude do estímulo agressor ou pela insuficiência dos mecanismos reguladores desta. A reação inflamatória sistêmica pode elevar a quantidade de proteínas de fase aguda e de agentes pirogênicos, como as interleucinas, provocando a febre (VOLTARELLI, 1994). A febre, por sua vez, pode elevar a vascularização periférica com o objetivo de manter a temperatura corporal normal. Dessa forma, o tratamento com a vitamina A pode ter aumentado a vascularização do testículo direito por esta razão. Entretanto, não foram feitas quantificações das proteínas de fase aguda, somente sendo constatada a reação inflamatória local e febre nos animais tratados com a vitamina A.

A termografia mostrou que os grupos IC, IA e IL apresentaram menores médias da TMSE em relação aos grupos CC, CA e CL. Ainda, não houve diferença entre a vitamina A e a LTBI, corroborando com achados anteriores do grupo que verificaram que a LTBI não causa aumento de temperatura local, conforme descrito por Mester (2013) e Halcin e Uito (1997). A diferença entre os insulados e os não insulados, no entanto, não era esperada. Entretanto, estudos feitos por Dutt et al. (1977) mostraram que o fluxo sanguíneo testicular de carneiros previamente submetidos ao aumento de temperatura ambiental (32° C) por sete dias, aumenta após 24h do final do insulto, normaliza durante três dias e reduz pela metade após esse período. A diminuição do fluxo sanguíneo testicular, provocado pelo aumento de temperatura, portanto, faz com que menos sangue chegue aos testículos, e com que este fique, consequentemente, com uma menor temperatura testicular (BARROS et al., 2011). Como a temperatura testicular está relacionada com a temperatura escrotal (COULTER et al., 1988), a TMSE dos grupos insulados irá, consequentemente, diminuir. Entretanto, no estudo não foi encontrada diferença entre as vascularizações dos grupos IC, IA e IL com os grupos CC, CA e CL.

Quanto às características espermáticas, os resultados mostraram que, de modo geral, o grupo CC e o grupo IC apresentaram melhores características espermáticas do que os grupos submetidos à degeneração testicular e tratados (IA e IL). Dessa forma, os grupos tratados não resultaram em melhora na qualidade espermática.

No presente trabalho somente foi feita a aplicação testicular da irradiação, acreditamos que esta pode ter alcançado o epidídimo e atingido as células maduras, aumentando a síntese de ATP e a atividade destas células, fazendo com que elas entrassem em exaustão. Esta proposta tem por base a propriedade de difusão tecidual (TUCHIN et al., 1995) da laserterapia e o fato de que a LTBI promove aumento da síntese ATP o que levaria, segundo Mester (2013), a efeitos bioestimulatórios. A produção de ATP no espermatozoide é feita a partir da cascata de fosforilação oxidativa (LUO et al., 2013) e a estimulação da síntese de ATP e da fosforilação oxidativa podem levar ao aumento de agentes oxidantes na amostra espermática. Dessa forma, a LTBI pode aumentar a quantidade de agentes oxidantes e resultar no estresse oxidativo, o que levaria à diminuição da motilidade, aumento dos defeitos espermáticos e diminuição de células PIAIA. Ocaña-Quero et al. (1997) em estudos com a aplicação da terapia diretamente sobre espermatozoides bovinos mostrou que a motilidade caiu conforme o aumento da dose de energia irradiada diretamente sobre estes. Além disso, a aplicação da LTBI nos testículos foi muito longa e exige que os testículos sejam manipulados durante o

tempo de aplicação, o que pode eventualmente causar um dano local, provocando prejuízos à qualidade espermática.

A vitamina A, por sua vez, era bastante promissora. Entretanto, como abordado anteriormente, a aplicação desta induziu um processo inflamatório local que pode ter se tornado sistêmico, uma vez que os animais que a receberam apresentaram febre. Caso isso seja verdade, sabe-se que o processo inflamatório é um fator desencadeante para a degeneração testicular e prejuízos espermáticos, por levar ao aumento de temperatura corporal (AITKEN et al., 1994; WALCZAK–JEDRZEJOWSKA et al., 1995). Foi evidente que no tempo T8 os grupos tratados com vitamina A (CA, IA) apresentaram maior porcentagem de defeitos maiores do que os grupos tratados com LTBI (CL, IL), mostrando que possivelmente houve o processo inflamatório sistêmico levando à queda da qualidade espermática. Entretanto, como dito anteriormente, são necessárias outras provas que mostrem que realmente o processo inflamatório sistêmico ocorreu nestes animais.

Apesar de ter havido aumento das lesões das membranas espermáticas, o estresse oxidativo não foi maior nos grupos IC, IA e IL. Entretanto, as análises foram iniciadas após 18 dias de término do estresse térmico testicular, ou seja, quando as análises foram iniciadas os animais já não estavam mais apresentando aumento da temperatura testicular, por isso não expressavam a cascata de eventos que inclui por consequência: aumento do metabolismo celular: hipóxia: aumento do estresse térmico. Os dados estão de acordo com os resultados encontrados por Paul et al. (2009) que verificaram aumento de agentes antioxidantes, que aumentam em resposta aos oxidantes, somente após 24h e 48h do aumento da temperatura em testículos de camundongos, após este período não houve mais aumento destes agentes.

As taxas de espermatozoides com integridade de DNA tiveram tendência a serem maiores nos grupos não insulados do que nos insulados. A fragmentação de DNA ocorre em decorrência do estresse oxidativo (PAUL et al., 2008, 2009) e dessa forma, há aumento das taxas de fragmentação de DNA posteriores ao estresse oxidativo. No experimento foi notado aumento da fragmentação de DNA após 18 a 45 dias do final do estresse térmico testicular, porém este não foi significativo. Corroborando os achados, em garanhões foi verificado aumento da fragmentação de DNA espermático pela técnica do SCSA após 24 a 33 dias e 38 a 46 dias da insulação escrotal. Entretanto, Paul et al. (2008) trabalhando com testículos de camundongos submetidos ao estresse térmico testicular de 40° C por 30 minutos, notaram aumento significativo da fragmentação de DNA, analisada pelo método SCSA, após sete dias do estresse; com 14 e 28 dias não foram observados aumentos significativos.

Por fim, a concentração sérica de testosterona foi maior nos grupos CC, CA e CL do que nos grupos IC, IA e IL. Quando comparados somente CC e IC, não foi constatada essa diferença. Dessa forma, a insulação pode ter sido capaz de promover a perda das células de Leydig nos animais insulados, os tratamentos podem não ter sido capazes de recuperar perfeitamente, levando a queda da testosterona sérica (ODEH et al., 2014 no prelo)⁴ e, ainda, os tratamentos podem ter tido efeito deletério sobre a população de células de Leydig, visto que, conforme discutido anteriormente, os dois tratamentos podem ter resultado em uma nova indução da degeneração testicular. Corroborando este fato, os resultados do histopatológico mostram que não há diferença entre os tratamentos e que, portanto, a vitamina A e a LTBI não foram capazes de promover a bioestimulação das células da linhagem espermática diferentemente do observado por Taha e Valojerdi com testículos de ratos (2004) e do observado no experimento 1.

6.5 CONCLUSÃO

As terapias com a vitamina A e com a laserterapia de baixa intensidade não são eficientes para o tratamento da degeneração testicular em carneiros, pois não contribuem para melhorar a qualidade espermática nem promoverem a proliferação celular.

⁴ ODEH, H. M.; KLEINGUETL, C. E.; GE, R.; ZIRKIN, B. R.; CHEN, H. Regulation of the Proliferation and Differentiation of Leydig Stem Cells in the Adult Testis. **Biology of Reproduction**, 16 abr. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE E – Temperaturas ambientais média, máxima e mínima (°C) durante o período de 13/08 a 10/12/2013 aferidas diretamente dos piquetes em que os animais ficaram alojados durante o período do experimento 2 – Pirassununga, SP, 2014

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

APÊNDICE F – Umidade relativa do ar média (%) durante o período de 13/08 a 10/12/2013 aferida diretamente dos piquetes em que os animais ficaram alojados durante o período do experimento 2 – Pirassununga, SP, 2014

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

APÊNDICE G – Média $\pm$ erro padrão do volume do ejaculado (mL) ao longo do período do experimento 2 (efeito de tempo - $p=0,0131$; sem efeito de tratamento - $p=0,18$; sem interação tempo x tratamento - $p=0,60$) – Pirassununga, SP, 2014

Tempo experimental de colheita de sêmen	Volume do ejaculado (mL)
T1	$1,05 \pm 0,07^{ab}$
T2	$1,04 \pm 0,05^{ab}$
T3	$0,91 \pm 0,07^{ab}$
T4	$0,77 \pm 0,06^a$
T5	$0,85 \pm 0,05^{ab}$
T6	$0,93 \pm 0,07^{ab}$
T7	$0,94 \pm 0,06^{ab}$
T8	$0,93 \pm 0,08^{ab}$
T9	$1,10 \pm 0,05^b$

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

APÊNDICE H – Média $\pm$ erro padrão do aspecto do ejaculado (1: aquoso; 1,5: aquoso/leitoso; 2: leitoso; 2,5: leitoso/cremoso; 3: cremoso) ao longo do tempo e dos tratamentos CC, CA, CL, IC, IA e IL do experimento 2 (efeito de tempo - $p=0,002$; efeito de tratamento - $p=0,005$; sem interação tempo x tratamento - $p=0,20$) – Pirassununga, SP, 2014

Tempo	CC	CA	CL	IC	IA	IL	Média
T1	3,00 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,12	2,87 $\pm$ 0,12	2,66 $\pm$ 0,16	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	2,91 $\pm$ 0,04 ^{ab}
T2	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,12	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	2,97 $\pm$ 0,02 ^b
T3	2,75 $\pm$ 0,25	3,00 $\pm$ 0,00	2,62 $\pm$ 0,37	2,50 $\pm$ 0,50	3,00 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,12	2,80 $\pm$ 0,09 ^{ab}
T4	3,00 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,12	2,87 $\pm$ 0,12	2,16 $\pm$ 0,44	2,12 $\pm$ 0,24	2,50 $\pm$ 0,50	2,60 $\pm$ 0,12 ^a
T5	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,12	3,00 $\pm$ 0,00	2,62 $\pm$ 0,12	2,37 $\pm$ 0,37	2,80 $\pm$ 0,08 ^{ab}
T6	2,50 $\pm$ 0,50	2,75 $\pm$ 0,25	3,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,29	2,37 $\pm$ 0,47	2,50 $\pm$ 0,50	2,63 $\pm$ 0,12 ^{ab}
T7	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,12	2,66 $\pm$ 0,33	3,00 $\pm$ 0,00	2,75 $\pm$ 0,25	2,89 $\pm$ 0,06 ^{ab}
T8	3,00 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,12	2,50 $\pm$ 0,35	2,83 $\pm$ 0,16	3,00 $\pm$ 0,00	2,37 $\pm$ 0,37	2,76 $\pm$ 0,09 ^{ab}
T9	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	2,87 $\pm$ 0,12	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	2,97 $\pm$ 0,02 ^b
Média	2,97 $\pm$ 0,02 ^B	2,93 $\pm$ 0,03 ^B	2,81 $\pm$ 0,06 ^A	2,64 $\pm$ 0,10 ^A	2,79 $\pm$ 0,07 ^A	2,70 $\pm$ 0,09 ^A	

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas representam diferenças nos tratamentos e minúsculas diferenças no tempo experimental.

APÊNDICE I – Média $\pm$ erro padrão do turbilhonamento nos tratamentos CC, CA, CL, IC, IA e IL ao longo do período do experimento 2 (efeito de tempo – $p < 0,0001$; efeito de tratamento – $p < 0,0001$; interação tempo x tratamento – $p = 0,003$) – Pirassununga, SP, 2014

Tempo	CC	CA	CL	IC	IA	IL	Média
T1	4,87 $\pm$ 0,12	3,37 $\pm$ 0,85	4,12 $\pm$ 0,42	4,16 $\pm$ 0,60	4,87 $\pm$ 0,12	4,62 $\pm$ 0,24	4,34 $\pm$ 0,20 ^b
T2	5,00 $\pm$ 0,00	4,25 $\pm$ 0,43	4,37 $\pm$ 0,31	4,66 $\pm$ 0,33	5,00 $\pm$ 0,00	4,50 $\pm$ 0,20	4,63 $\pm$ 0,11 ^b
T3	4,12 $\pm$ 0,71	4,50 $\pm$ 0,50	3,75 $\pm$ 0,48	3,33 $\pm$ 0,93	4,35 $\pm$ 0,32	4,33 $\pm$ 0,16	4,06 $\pm$ 0,20 ^b
T4	4,75 $\pm$ 0,14	3,12 $\pm$ 0,51	4,25 $\pm$ 0,48	1,33 $\pm$ 0,33	1,12 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,00	2,65 $\pm$ 0,34 ^a
T5	4,62 $\pm$ 0,37	4,37 $\pm$ 0,24	3,62 $\pm$ 0,68	2,50 $\pm$ 0,50	1,62 $\pm$ 0,99	1,87 $\pm$ 0,72	3,13 $\pm$ 0,34 ^{ab}
T6	4,75 $\pm$ 0,25	3,75 $\pm$ 0,48	4,50 $\pm$ 0,29	2,66 $\pm$ 0,88	2,37 $\pm$ 0,94	2,37 $\pm$ 0,74	3,43 $\pm$ 0,31 ^{ab}
T7	4,87 $\pm$ 0,12	3,87 $\pm$ 0,66	4,12 $\pm$ 0,24	3,50 $\pm$ 0,29	3,50 $\pm$ 0,90	3,25 $\pm$ 0,88	3,87 $\pm$ 0,25 ^b
T8	4,50 $\pm$ 0,29	4,50 $\pm$ 0,41	3,62 $\pm$ 0,65	4,50 $\pm$ 0,29	3,12 $\pm$ 1,12	3,12 $\pm$ 0,82	3,87 $\pm$ 0,28 ^b
T9	5,00 $\pm$ 0,00	4,37 $\pm$ 0,24	4,62 $\pm$ 0,37	5,00 $\pm$ 0,00	3,50 $\pm$ 1,19	4,62 $\pm$ 0,24	4,50 $\pm$ 0,22 ^b
Média	4,72 $\pm$ 0,10 ^C	4,01 $\pm$ 0,16 ^{BC}	4,11 $\pm$ 0,15 ^{BC}	3,51 $\pm$ 0,26 ^{AB}	3,26 $\pm$ 0,31 ^A	3,27 $\pm$ 0,27 ^A	

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas representam diferenças nos tratamentos e minúsculas diferenças no tempo experimental.

APÊNDICE J – Média $\pm$ erro padrão da frequência respiratória (movimentos por minuto) ao longo do tempo e dos tratamentos CC, CA, CL, IC, IA e IL do experimento 2 (efeito de tempo – $p < 0,0001$; efeito de tratamento – $p = 0,02$; sem interação tempo x tratamento – $p = 0,75$) – Pirassununga, SP, 2014

Tempo	CC	CA	CL	IC	IA	IL	Média
T1	31,60 $\pm$ 2,56	24,80 $\pm$ 2,57	32,33 $\pm$ 2,70	24,20 $\pm$ 1,80	26,00 $\pm$ 2,83	36,66 $\pm$ 5,62	29,48 $\pm$ 1,52 ^a
T2	49,60 $\pm$ 9,26	42,66 $\pm$ 5,88	35,66 $\pm$ 7,20	42,40 $\pm$ 7,46	27,66 $\pm$ 1,74	34,66 $\pm$ 5,00	38,35 $\pm$ 2,65 ^b
T3	32,20 $\pm$ 4,17	28,66 $\pm$ 3,88	34,00 $\pm$ 4,35	37,60 $\pm$ 8,98	28,33 $\pm$ 3,48	34,33 $\pm$ 6,18	32,52 $\pm$ 2,07 ^{ab}
T4	29,20 $\pm$ 4,96	29,66 $\pm$ 2,39	27,00 $\pm$ 2,46	25,60 $\pm$ 2,48	22,33 $\pm$ 1,50	26,00 $\pm$ 3,18	26,58 $\pm$ 1,17 ^a
T5	30,80 $\pm$ 2,24	33,33 $\pm$ 2,81	33,33 $\pm$ 3,92	28,40 $\pm$ 6,52	26,66 $\pm$ 3,64	26,66 $\pm$ 4,78	29,88 $\pm$ 1,63 ^a
T6	34,80 $\pm$ 5,57	26,00 $\pm$ 2,36	27,00 $\pm$ 2,40	28,60 $\pm$ 3,62	30,00 $\pm$ 3,83	26,66 $\pm$ 4,43	28,67 $\pm$ 1,50 ^a
T7	33,20 $\pm$ 4,88	32,00 $\pm$ 5,93	37,33 $\pm$ 9,05	23,60 $\pm$ 2,13	30,66 $\pm$ 3,75	26,00 $\pm$ 2,53	30,58 $\pm$ 2,19 ^{ab}
T8	31,20 $\pm$ 4,67	24,33 $\pm$ 1,31	32,00 $\pm$ 2,47	28,40 $\pm$ 2,56	29,33 $\pm$ 5,13	21,66 $\pm$ 1,82	27,70 $\pm$ 1,39 ^a
T9	30,40 $\pm$ 4,53	25,66 $\pm$ 1,40	31,00 $\pm$ 3,30	26,80 $\pm$ 4,58	27,00 $\pm$ 1,77	22,33 $\pm$ 2,85	27,11 $\pm$ 1,28 ^a
Média	33,77 $\pm$ 1,49 ^B	29,77 $\pm$ 1,05 ^{AB}	32,18 $\pm$ 1,53 ^{AB}	29,51 $\pm$ 1,78 ^{AB}	27,55 $\pm$ 1,05 ^A	28,33 $\pm$ 1,49 ^{AB}	

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas representam diferenças nos tratamentos e minúsculas diferenças no tempo experimental.

APÊNDICE L – Média $\pm$ erro padrão da temperatura do ponto médio do testículo direito aferida pela função de pirômetro do aparelho de termografia (FLYR, T620) ao longo do tempo e dos tratamentos CC, CA, CL, IC, IA e IL do experimento 2 (efeito de tempo – $p < 0,0001$; efeito de tratamento – $p = 0,01$; sem interação tempo x tratamento – $p = 0,29$) – Pirassununga, SP, 2014

Tempo	CC	CA	CL	IC	IA	IL	Média
T1	31,53 $\pm$ 0,48	31,14 $\pm$ 0,34	30,76 $\pm$ 0,55	30,65 $\pm$ 0,19	30,81 $\pm$ 0,52	30,05 $\pm$ 0,41	30,81 $\pm$ 0,18 ^c
T2	30,75 $\pm$ 0,13	31,16 $\pm$ 0,46	30,71 $\pm$ 0,40	30,70 $\pm$ 0,42	30,59 $\pm$ 0,21	30,29 $\pm$ 0,27	30,70 $\pm$ 0,13 ^c
T3	30,33 $\pm$ 0,30	31,22 $\pm$ 0,51	30,78 $\pm$ 0,23	30,20 $\pm$ 0,30	30,23 $\pm$ 0,24	30,41 $\pm$ 0,08	30,54 $\pm$ 0,13 ^{bc}
T4	30,66 $\pm$ 0,33	29,81 $\pm$ 0,30	30,36 $\pm$ 0,27	29,94 $\pm$ 0,54	30,65 $\pm$ 0,16	29,48 $\pm$ 0,51	30,13 $\pm$ 0,16 ^{bc}
T5	29,72 $\pm$ 0,54	29,63 $\pm$ 0,30	29,86 $\pm$ 0,66	28,74 $\pm$ 0,19	29,80 $\pm$ 0,27	29,33 $\pm$ 0,36	29,52 $\pm$ 0,16 ^{ab}
T6	29,08 $\pm$ 0,30	30,26 $\pm$ 0,39	29,70 $\pm$ 0,42	29,20 $\pm$ 0,37	30,70 $\pm$ 0,34	29,81 $\pm$ 0,39	29,83 $\pm$ 0,17 ^{ab}
T7	30,64 $\pm$ 0,20	30,33 $\pm$ 0,26	31,28 $\pm$ 0,28	30,48 $\pm$ 0,41	30,83 $\pm$ 0,44	30,78 $\pm$ 0,41	30,70 $\pm$ 0,14 ^{bc}
T8	29,24 $\pm$ 0,25	30,01 $\pm$ 0,17	30,36 $\pm$ 0,62	30,34 $\pm$ 0,20	30,05 $\pm$ 0,26	29,86 $\pm$ 0,36	29,97 $\pm$ 0,14 ^{ab}
T9	29,38 $\pm$ 0,50	29,45 $\pm$ 0,29	30,14 $\pm$ 0,48	29,86 $\pm$ 0,48	29,60 $\pm$ 0,28	29,08 $\pm$ 0,47	29,56 $\pm$ 0,16 ^{ab}
Média	30,15 $\pm$ 0,16 ^{AB}	30,34 $\pm$ 0,14 ^{AB}	30,44 $\pm$ 0,15 ^B	30,01 $\pm$ 0,14 ^{AB}	30,36 $\pm$ 0,11 ^{AB}	29,90 $\pm$ 0,13 ^A	

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas representam diferenças nos tratamentos e minúsculas diferenças no tempo experimental.

APÊNDICE M – Média $\pm$ erro padrão da temperatura média do plexo (direito+esquerdo) aferida pelo aparelho de termografia (FLYR, T620) ao longo do período experimental (efeito de tempo – $p < 0,0001$; efeito de tratamento – $p < 0,0001$; sem interação tempo x tratamento – $p = 0,92$) – Pirassununga, SP, 2014

Tempo	CC	CA	CL	IC	IA	IL	Média
T1	32,79 $\pm$ 0,39	32,76 $\pm$ 0,47	31,90 $\pm$ 0,41	32,07 $\pm$ 0,26	31,93 $\pm$ 0,35	31,63 $\pm$ 0,54	32,91 $\pm$ 0,18 ^{abc}
T2	33,97 $\pm$ 0,27	33,68 $\pm$ 0,45	32,71 $\pm$ 0,26	33,17 $\pm$ 0,30	32,23 $\pm$ 0,41	32,24 $\pm$ 0,22	32,97 $\pm$ 0,17 ^{cd}
T3	33,49 $\pm$ 0,29	33,25 $\pm$ 0,51	33,42 $\pm$ 0,28	33,47 $\pm$ 0,28	32,98 $\pm$ 0,33	32,78 $\pm$ 0,30	33,21 $\pm$ 0,13 ^d
T4	32,02 $\pm$ 0,45	31,85 $\pm$ 0,37	31,98 $\pm$ 0,31	31,49 $\pm$ 0,56	30,90 $\pm$ 0,53	31,24 $\pm$ 0,59	31,55 $\pm$ 0,19 ^{ab}
T5	31,94 $\pm$ 0,61	31,81 $\pm$ 0,27	32,11 $\pm$ 0,48	30,93 $\pm$ 0,41	31,16 $\pm$ 0,47	30,51 $\pm$ 0,75	31,39 $\pm$ 0,22 ^{ab}
T6	31,30 $\pm$ 0,45	32,44 $\pm$ 0,48	31,58 $\pm$ 0,51	31,00 $\pm$ 0,36	32,42 $\pm$ 0,13	30,75 $\pm$ 0,73	31,60 $\pm$ 0,22 ^{ab}
T7	32,20 $\pm$ 0,32	32,50 $\pm$ 1,34	32,24 $\pm$ 0,53	31,92 $\pm$ 0,41	32,60 $\pm$ 0,68	31,37 $\pm$ 0,66	32,14 $\pm$ 0,22 ^{abc}
T8	31,34 $\pm$ 0,35	32,05 $\pm$ 0,24	32,06 $\pm$ 0,30	31,51 $\pm$ 0,24	32,20 $\pm$ 0,35	30,72 $\pm$ 0,60	31,65 $\pm$ 0,17 ^{ab}
T9	31,92 $\pm$ 0,61	31,90 $\pm$ 0,63	32,01 $\pm$ 0,56	31,26 $\pm$ 0,36	30,94 $\pm$ 0,55	30,45 $\pm$ 0,90	31,38 $\pm$ 0,26 ^a
Média	32,33 $\pm$ 0,18 ^B	32,47 $\pm$ 0,16 ^B	32,23 $\pm$ 0,14 ^B	31,87 $\pm$ 0,17 ^{AB}	31,93 $\pm$ 0,17 ^B	31,30 $\pm$ 0,22 ^A	

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014)

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes, considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas representam diferenças nos tratamentos e minúsculas diferenças no tempo experimental.

APÊNDICE N – Média $\pm$ erro padrão da circunferência escrotal (cm, CE) ao longo do período experimental

CE (cm)	Tratamentos							Probabilidades						
	CC	CA	CL	IC	IA	IL	EI	ET	VL	ETI	ETN	Trat	Tempo	Tempo x trat
T1 a T9	33,25 $\pm$ 0,46	32,27 $\pm$ 0,23	33,10 $\pm$ 0,43	33,09 $\pm$ 0,32	33,18 $\pm$ 0,27	33,00 $\pm$ 0,35	0,75	0,88	0,69	0,99	0,60	0,96	<0,0001	0,007
T1	31,92 $\pm$ 1,23	31,50 $\pm$ 0,93	32,54 $\pm$ 1,46	33,34 $\pm$ 0,44	32,60 $\pm$ 0,43	32,41 $\pm$ 1,50	0,60	0,66	0,69	0,54	0,94	0,89	-	-
T2	31,18 $\pm$ 1,11	29,71 $\pm$ 0,57	30,70 $\pm$ 1,28	31,28 $\pm$ 0,60	31,88 $\pm$ 0,28	31,58 $\pm$ 1,14	0,29	0,62	0,69	0,68	0,39	0,55	-	-
T3	31,82 $\pm$ 1,14	30,83 $\pm$ 0,27	30,86 $\pm$ 1,14	31,74 $\pm$ 0,78	30,83 $\pm$ 0,27	31,96 $\pm$ 1,05	0,31	0,79	0,88	0,73	0,36	0,77	-	-
T4	33,38 $\pm$ 1,41	32,75 $\pm$ 0,38	33,46 $\pm$ 1,16	32,60 $\pm$ 0,79	32,43 $\pm$ 0,43	32,15 $\pm$ 0,75	0,97	0,31	0,80	0,77	0,80	0,86	-	-
T5	32,58 $\pm$ 1,03	32,73 $\pm$ 0,34	32,06 $\pm$ 1,09	31,58 $\pm$ 0,63	32,73 $\pm$ 0,34	32,05 $\pm$ 0,71	0,82	0,65	0,53	0,53	0,84	0,90	-	-
T6	33,06 $\pm$ 1,50	32,43 $\pm$ 0,40	34,68 $\pm$ 1,53	32,38 $\pm$ 0,74	32,06 $\pm$ 0,51	32,06 $\pm$ 0,59	0,46	0,39	0,22	0,78	0,67	0,38	-	-
T7	34,26 $\pm$ 0,67	34,26 $\pm$ 1,10	33,82 $\pm$ 1,02	34,26 $\pm$ 1,10	34,26 $\pm$ 0,67	34,35 $\pm$ 0,59	0,41	0,85	0,61	0,96	0,35	0,84	-	-
T8	35,28 $\pm$ 1,53	33,73 $\pm$ 0,57	34,86 $\pm$ 1,25	35,16 $\pm$ 0,88	34,80 $\pm$ 0,73	34,95 $\pm$ 1,00	0,49	0,74	0,52	0,82	0,44	0,90	-	-
T9	35,56 $\pm$ 1,32	33,83 $\pm$ 0,62	35,00 $\pm$ 1,00	35,52 $\pm$ 0,78	36,11 $\pm$ 1,21	35,53 $\pm$ 0,85	0,25	0,83	0,76	0,80	0,36	0,64	-	-

Fonte: (ALVES, M.B.R., 2014).

Legenda: CC: grupo não insulado e não tratado; CA: grupo não insulado e tratado com vitamina A; CL: grupo não insulado e tratado com LTBI; IC: grupo insulado e não tratado; IA: grupo insulado e tratado com vitamina A; IL: grupo insulado e tratado com LTBI; EI (contraste 1, efeito da insulação nos tratamentos): a comparação entre CC, CA e CL x IC, IA e IL; ET (contraste 2, efeito dos tratamentos): a comparação entre CC x IA e IL; VL (contraste 3, diferença entre a vitamina A e a LTBI): a comparação entre CA e IA x CL e IL; ETI (contraste 4, efeito dos tratamentos nos insulados): a comparação entre IC x IA e IL; ETN (contraste 5, efeito dos tratamentos nos não insulados): a comparação entre CC x CA e CL. Trat: efeito de tratamento; Trat x tem: interação tempo x tratamento.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

“Mesmo que a rota da minha vida me conduza a uma estrela, nem por isso fui dispensado de percorrer os caminhos do mundo” - José Saramago

7 CONCLUSÕES GERAIS

7.1 EXPERIMENTO 1: “EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE ENERGIA DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NO TRATAMENTO DA DEGENERACÃO TESTICULAR EM OVINOS”

Baseados nos resultados obtidos e dentro das condições de realização do experimento 1, conclui-se que:

- 1) A laserterapia de baixa intensidade é eficiente para a bioestimulação testicular frente a um processo de degeneração testicular induzido em carneiros com idade entre $10 \pm 0,89$ meses de idade;
- 2) A laserterapia de baixa intensidade na dose de 28 J/cm^2 de energia aplicada sobre testículos ovinos é mais eficiente na promoção da proliferação celular do que a dose de 56 J/cm^2 de energia, ambas na mesma potência (30 mW).

7.2 EXPERIMENTO 2: “USO DE CELLROX DEEP RED[®] PARA A DETECÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZOIDE OVINO POR MEIO DE INDUÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*”

Baseados nos resultados obtidos e dentro das condições de realização do experimento 2, conclui-se que:

- 1) A sonda fluorescente CellROX Deep Red[®] é eficiente para detectar a produção de ROS induzida *in vitro*;
- 2) A sonda fluorescente CellROX Deep Red[®] é eficiente para detectar a produção de ROS induzida *in vivo*.

7.3 EXPERIMENTO 3: “TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO TESTICULAR EM CARNEIROS COM SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A OU LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE”

Baseados nos resultados obtidos e dentro das condições de realização do experimento 3, conclui-se que:

- 1) A suplementação com vitamina A IM na dose de 120.000 UI/animal não é eficiente no tratamento da degeneração testicular em ovinos;
- 2) A utilização da terapia com laser de baixa intensidade não auxilia na reversão do quadro de degeneração testicular em ovinos com idade média de $17,64 \pm 2,87$ meses. Não melhora a qualidade espermática, não estimula o aumento das concentrações séricas de testosterona e nem a proliferação celular nos túbulos seminíferos;
- 3) A terapia com laser de baixa intensidade atua de maneira semelhante sobre a degeneração testicular que a suplementação com vitamina A em ovinos. As duas terapias não geram resultados satisfatórios quanto à qualidade seminal, concentração sérica de testosterona e proliferação celular.

REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, Z.; DESSOUKI, S. H. M.; ABDEL-SALAM, S. A. M.; IBRAHIM, M. A. M.; HARITH, M. A. Green laser irradiation effects on buffalo semen. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 988–94, 1 abr. 2011.

ABDULKAREEM, T. A.; AL-HABOBY, A. H.; AL-MJAMEI, S. M.; HOBI, A. A. Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 67–71, fev. 2005.

AHMADI, B.; LAU, C. P.-S.; GIFFIN, J.; SANTOS, N.; HAHNEL, A.; RAESIDE, J.; CHRISTIE, H.; BARTLEWSKI, P. Suitability of epididymal and testicular ultrasonography and computerized image analysis for assessment of current and future semen quality in the ram. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 2, p. 186–193, 1 fev. 2012.

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, jan./fev. 1995.

AHN, H.-Y.; FAIRFULL-SMITH, K. E.; MORROW, B. J.; LUSSINI, V.; KIM, B.; BONDAR, M. V.; BOTTLE, S. E.; BELFIELD, K. D. Two-photon fluorescence microscopy imaging of cellular oxidative stress using profluorescent nitroxides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 10, p. 4721–4730, 14 mar. 2012.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257–265, maio 1993.

AITKEN, R. J.; IULIIS, G. N. de; GIBB, Z.; BAKER, M. A. The Simmet lecture: new horizons on an old landscape--oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 7–14, ago. 2012.

AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1096–106, nov./dez. 2012.

AITKEN, R. J.; SMITH, T. B.; LORD, T.; KUCZERA, L.; KOPPERS, A. J.; NAUMOVSKI, N.; CONNAUGHTON, H.; BAKER, M. A.; DE IULIIS, G. N. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. **Andrology**, v. 1, p. 192–205, mar. 2013.

AITKEN, R. J.; WEST, K.; BUCKINGHAM, D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 4, p. 343–52, jul./ago. 1994.

AITKEN, R. J.; WEST, K. M. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. **International Journal of Andrology**, v. 13, n. 6, p. 433–451, dez. 1990.

ALMASIOVA, V.; HOLOVSKA, K.; TARABOVA, L.; CIGANKOVA, V.; LUKACINOVA, A.; NISTIAR, F. Structural and ultrastructural study of the rabbit testes exposed to carbamate insecticide. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 47, n. 9, p. 1319–28, jan. 2012.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garranhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 204–209, dez. 2009.

ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190–4, abr. 2007.

ARMAN, C.; QUINTANA CASARES, P. I.; SANCHEZ-PARTIDA, L. G.; SETCHELL, B. P. Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 4, p. 411–8, jul. 2006.

ARNDT, K. A.; DOVER, J. S.; OLBRICHIT, S. M. Laser in cutaneous and aesthetic surgery. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 106, n. 5, p. 1209, 1997.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática : momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145–151, abr./jun. 2011.

ARTEAGA, A. A; BARTH, A. D.; BRITO, L. F. C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 64, p. 408–15, 15 jul. 2005.

AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 41–52, mar. 2013.

BARROS, C. M. Q.; OBA, E.; SIQUEIRA, J. B.; LEAL, L. S.; KASTELIC, J. P. Efeitos da diminuição do fluxo sanguíneo testicular nas temperaturas escrotal superficial escrotal subcutânea , intratesticular e intravascular em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 49–54, jan/mar. 2011.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1. ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 1989. p. 3–6.

BASILE, R. C.; ALBERNAZ, R. M.; PEREIRA, M. C.; ARAÚJO, R.; FERRAZ, G. C.; QUEIROZ-NETO, A. de. Guia prático de exames termográficos em equinos. **Revista Brasileira de Medicina Equina**, v. 6, n. 31, p. 24–28, 2010.

BAVISTER, D.; LORRAINE, M. Development of Preimplantation in a Defined Embryos of the Golden Culture Medium. **Biological Trace Element Research**, v. 28, p. 235–247, fev. 1983.

BEHEREGARAY, W. K.; GIANOTTI, G. C.; LEAL, J. D. S.; MONTEIRO, F. M.; SIMAS, S. M.; ELIZEIRE, M.; CONTESINI, E.A. Uso do Laser ALGaInP na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 3, p. 237–243, jan. 2010.

BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 291–297, mar. 1996.

BERMÚDEZ, D.; CARRASCO, F.; DIAZ, F.; PEREZ-DE-VARGAS, I. Germ cell DNA quantification shortly after IR laser radiation. **Andrologia**, v. 23, n. 4, p. 303–307, jul./ago. 1991.

BERMÚDEZ, D.; CARRASCO, F.; PÉREZ DE VARGAS, I. Effect of IR laser radiation on germ cell DNA content after one cycle of the seminiferous epithelium. **Archives of Andrology**, v. 31, n. 3, p. 177–181, nov./dez. 1993.

BICUDO, S. D.; SIQUEIRA, J. B.; MEIRA, C. Patologias do sistema reprodutor de touros. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 43–48, jul/dez. 2007.

BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. J.; WEDD, S. R. Sweet glands of the scrotum of the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 673–677, jul. 1988.

BOLLWEIN, H.; SCHULZE, J. J.; MIYAMOTO, A.; SIEME, H. Testicular blood flow and plasma concentrations of testosterone and total estrogen in the stallion after the administration of human chorionic gonadotropin. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 5, p. 335–339, out. 2008.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos : efeito de metabólitos do oxigênio , antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303–314, jul./set. 2011.

BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 139–44, 22 fev. 2002.

BRENER, E.; RUBINSTEIN, S.; COHEN, G.; COHEN, G.; SHTERNALL, K.; RIVLIN, J.; BREITBART, H. Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 837–845, 23 out. 2002.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, p. 511–528, jan. 2004.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 1–15, nov. 2003.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A. B.; PIETRAS, B.; WIEKZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v. 47, n. 1-3, p. 69–74, jan./mar. 1995.

CAPRARO, G. A.; COUGHLIN, B. F.; MADER, T. J.; SMITHLINE, H. A. Testicular cooling associated with testicular torsion and its detection by infrared thermography: an experimental study in sheep. **The Journal of Urology**, v. 180, n. 6, p. 2688–93, dez. 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. DE; ANDRADE, A. F. C. DE; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479–488, out. 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536–543, jun. 2010.

COELHO, L. A.; SASA, A.; BICUDO, S. D.; BALIEIRO, J. C. C. Concentrações plasmáticas de testosterona, triiodotironina (T 3) e tiroxina (T 4) em bodes submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1338–1345, 2008.

COLLODEL, G.; FEDERICO, M. G.; GEMINIANI, M.; MARTINI, S.; BONECHI, C.; ROSSI, C.; FIGURA, N.; MORETTI, E. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 239–246, fev. 2011.

COLOMBO, F.; NETO, A. D. A. P. V.; SOUSA, A. P. C. DE; et al. Effect of low-level laser therapy (λ660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 4, p. 308–312, jan. 2013.

CORRAL-BAQUÉS, M. I.; RIVERA, M. M.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; RIGAU, J. The effect of low-level laser irradiation on dog spermatozoa motility is dependent on laser output power. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 5, p. 703–13, set. 2009.

COSTARDI, C. H. Z.; TAMACHIRO, C.; JÚNIOR, I. E.; GOMES, A. C. Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. **Fisioterapia em Movimento**, v. 21, n. 2, p. 21–30, abr./jun. 2008.

COULTER, G. H.; SENGHER, P. L.; BAILEY, R. C. 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, p. 417–423, nov. 1988.

D'OCCHIO, M.J.; BROOKS, D.E. Seasonal changes in the plasma testosterone profile in Merino rams. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, v. 23, n. 122, p. 254–258, 1983.

DONNELLY, E. T.; O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 15, n. 7, p. 1552–61, jul. 2000.

DUDEA, S. M.; CIUREA, A.; CHIOREAN, A.; BOTAR-JID, C. Doppler applications in testicular and scrotal disease. **Medical Ultrasonography**, v. 12, n. 1, p. 43–51, mar. 2010.

DUQUE, F. L. V.; CHAGAS, C. A. A. Acidente por injeção medicamentosa no músculo deltoide: lesões locais e à distância, revisão de 32 casos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 8, n. 3, p. 238–246, jul. 2009.

DUTT, R. H.; SAND, R. S.; SINGH, B. Changes in testis blood flow, the spermatid artery and prostaglandin F₂α content in testis tissue of heat-stressed rams. **International Journal of Biometeorology**, v. 21, n. 1, p. 75–84, mar. 1977.

ERICSSON, S. A.; GARNER, D. L.; THGMAS, C. A.; DOWNING, T. W.; MARSHALL, C. E. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, p. 1009–1024, mai. 1993.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; de ANGELIS, P.; CLAUSSEN O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 14, n. 4, p. 1039–49, abr. 1999.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A N.; PEREIRA, D.; SILVA, A E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, p. 1560–1568, dez. 2008.

FIRESTONE, R. S.; ESFANDIARI, N.; MOSKOVITSEV, S. I.; BURSTEIN, E.; VIDENA, G.T.; LIBRACH, C.; BENTOV, Y.; CASPER, R.F. The effects of low-level laser light exposure on sperm motion characteristics and DNA damage. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 3, p. 469–73, mai./jun. 2012.

FORTES, M. R. S.; HOLROYD, R. G.; REVERTER, A; et al. The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 326–33, 333.e1–4, 15 jul. 2012.

FRASER, L.; PARDA, A.; FILIPOWICZ, K.; STRZEŻEK, J. Comparison of post-thaw DNA integrity of boar spermatozoa assessed with the neutral comet assay and Sperm-Sus Halomax test kit. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 155–60, out. 2010.

FREEMAN, S. The evolution of the scrotum: a new hypothesis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 145, n. 4, p. 429–445, ago. 1990.

GAETH, A. P.; SHORT, R. V.; RENFREE, M. B. The developing renal, reproductive, and respiratory systems of the African elephant suggest an aquatic ancestry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5555–5558, maio. 1999.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental**. 2004. 258 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P. DE; MARTINEZ-PASTOR, F.; et al. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology**, v. 30, n. 2, p. 88–98, abr. 2007.

GAZVANI, M. R.; WOOD, S. J.; THOMSON, A. J.; KINGSLAND, C. R.; LEWIS-JONES, D. I. Assessment of testicular core temperatures using microwave thermography. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 15, n. 8, p. 1723–6, ago. 2000.

GEVA, E.; BARTOEV, B.; ZABLUDOVSKY, N.; LESSING, J. B.; LERNER-GEVA, L.; AMIT, A. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an *in vitro* fertilization program. **Fertility and Sterility**, v. 66, n. 3, p. 430–434, set. 1996.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445–57, 15 jan. 2005.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction**. Book 3. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 1998.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography**. Book 4. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing, 2007.

GLOVER, T. D. Aspects of sperm production in some east African mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 45–53, set. 1973.

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 81–94, abr. 1998.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; MILLER, M. G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 5–10, jan./fev. 2001.

GRINBERG, Y. **ROS production measurement using con-focal microscopy?** Disponível em: <http://www.researchgate.net/post/ROS_production_measurement_using_con-focal_microscopy>. Acesso em: 29 mar. 2013.

GRINBERG, Y. Y.; DIBBERN, M. E.; LEVASSEUR, V. A.; KRAIG, R. P. Insulin-like growth factor-1 abrogates microglial oxidative stress and TNF- α responses to spreading depression. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, n. 5, p. 662–72, set 2013.

GRINBERG, Y. Y.; VAN DRONGELEN, W.; KRAIG, R. P. Insulin-like growth factor-1 lowers spreading depression susceptibility and reduces oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, n. 1, p. 221–9, jul. 2012.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 2089–2100, ago. 2006.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1402–1411, jun. 2007.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, 13 jun. 2012.

HALCIN, C. H.; UITO, J. Biologic effects of low-energy lasers. **Lasers in Cutaneous and Aesthetic Surgery**. 1997. p. 303.

HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341–3350, 27 nov. 2009.

HENDRICKSON, D.A. Cirurgia Urogenital em Bovinos. In: HENDRICKSON, D.A. **Técnicas Cirúrgicas Em Grandes Animais**. Guanabara, 2010. cap. 14, p. 239-241.

HSU, P. C.; LIUM, M. Y.; HSU, C. C.; CHEN, L. Y.; GUO, Y. L. 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, jul. 1998.

HUERTAS, R. M.; LUNA-BERTOS, E. de; RAMOS-TORRECILLAS, J.; LEYVA, F. M.; RUIZ, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. **Biological Research for Nursing**, v. 16, n. 2, p. 191–196, abr. 2014.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, n. 6, p. 515–540, não achei mês. 1990.

JOHNSON, L.; SPENCE, S. T. Z. The molecular probes[®] handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. 11. ed. 2010. Disponível em:

<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>. Acesso em: 08 abr. 2013.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. New York: Academic Press, 1993. v. 3, p. 747.

KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. **Lasers Life Science**, v. 2, n. 1, p. 53–74, 1988.

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

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum, testes and testicular artery to scrotal and testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Science**, v. 45, p. 255–261, jan. 1997.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; SAACKE, R. G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, p. 935–942, abr. 1996.

KLEISNER, K.; IVELL, R.; FLEGR, J. The evolutionary history of testicular externalization and the origin of the scrotum. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 1, p. 27–37, 5 fev. 2010.

KOPPERS, A. J.; GARG, M. L.; AITKEN, R. J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 112–119, 1 jan. 2010.

KOPPERS, A. J.; IULIIS, G. N. DE; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 8, 2008.

KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAAN, J. S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **Veterinary Record**, v. 108, n. 1, p. 13–15, 3 jan. 1981.

KUTZLER, M.; TYSON, R.; GRIMES, M.; TIMM, K. Determination of testicular blood flow in camelids using vascular casting and color pulsed-wave Doppler ultrasonography. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 638602, jan. 2011.

LAGERLOF, N. Infertility in male domestic animals. **Veterinary Medicine**, v. 33, p. 550–561, 1938.

LENZI, A.; CLARONI, F.; GANDINI, L.; et al. Laser radiation and motility patterns of human sperm. **Archives of Andrology**, v. 23, n. 3, p. 229–234, 1989.

LI, T. K. The Glutathione and Thiol Content Seminal of Mammalian Spermatozoa and Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**, v. 646, p. 641–646, fev. 1975.

LIVERA, G.; ROUILLER-FABRE, V.; PAIRAULT, C.; LEVACHER, C.; HABERT, R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. **Reproduction**, v. 124, p. 173–180, ago. 2002.

LOPES, A. L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. 1999. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) -Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 3, p. 615–20, mar.1999.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LEVINSHAL, T.; LAVIE, R.; BREITBART, H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 15, n. 4, p. 337–41, set. 1992.

LUO, S.-M.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.-Y. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 11, p. 549–56, 20 nov. 2013.

MALAMA, E.; BOLLWEIN, H.; TAITZOGLU, I. A.; BOSCOS, C. M.; KIOSSIS, E. Chromatin integrity of ram spermatozoa. Relationships to annual fluctuations of scrotal surface temperature and temperature-humidity index. **Theriogenology**, v. 80, n. 5, p. 533–41, set. 2013.

MASSONE, F. Técnicas Anestésicas em Bovinos. In: MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas - textos e atlas**. Guanabara, 2011. cap. 16.

MESTER, A. Laser biostimulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 6, p. 237–239, jun. 2013.

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

MORRIS, I. D.; PHILLIPS, D. M.; BARDIN, C. W. Ethylene Dimethanesulfonate Destroys Leydig Cells in the Rat Testis. **Endocrinology**, v. 118, n. 2, p. 709–719, fev. 1986.

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**, v. 5, p. 433–446, jun. 1963.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologias da Bolsa Escrotal e dos Testículos. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 108 p.

NETO, C. R.; RODELLO, L.; BICUDO, S. D. Termografia escrotal em ovinos pré-púberes submetidos a estresse térmico. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, p. 1271, 2011.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822–828, set. 2006.

NRC. NUTRIENT REQUIREMENT OF BEEF CATTLE. Washington: National Academies Press. 1996. p 1-234.

OCAÑA-QUERO, J. M.; GOMEZ-VILLAMANDOS, R.; MORENO-MILLAN, M.; SANTISTEBAN-VALENZUELA, J. M. Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 40, n. 3, p. 294–8, out. 1997.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, jun. 1979.

OSMANL, R. A.; ANDRIA, M. L.; JONESS, A. D.; MEIZELLS, S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 160, n. 2, p. 828–833, abr. 1989.

PAP, E. H. W.; DRUMMEN, G. P. C.; WINTER, V. J.; WINTER, V. J.; KOOLJ, T. W.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K. W.; OP DEN KAMP, J. A.; HAGE, W. J.; POST, J. A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11--BODIPY. **FEBS Letters**, v. 453, p. 278–282, jun. 1999.

PAUL, C.; MURRAY, A. A.; SPEARS, N.; SAUNDERS, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction**, v. 136, p. 73–84, jul. 2008.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A Single , Mild , Transient Scrotal Heat Stress Causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes , Which Induces Germ Cell Death 1. **Biology of Reproduction**, v. 919, p. 913–919, jan. 2009.

PEARSON, G. J.; SCHUCKERT, K. H. The role of lasers in dentistry: present and future. **Dental Update**, v. 30, n. 2, p. 70–76, mar. 2003.

PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability , sperm DNA integrity , and the offspring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 40–47, jan. 2008.

POTTS, R. J.; NOTARIANNI, L. J.; JEFFERIES, T. M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. **Mutation Research**, v. 447, n. 2, p. 249–256, fev. 2000.

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J. J.; VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1246–57, out. 2011.

RASOOLI, A.; TAHA JALALI, M.; NOURI, M.; MOHAMMADIAN, B.; BARATI, F. Effects of chronic heat stress on testicular structures, serum testosterone and cortisol concentrations in developing lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 55–59, jan. 2010.

RICCI, R. **Biomodulação em células endoteliais com dosimetrias diferentes do laser de baixa potência arsenito de Índio galio**. 2003. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisa e Ciência da Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

SAKR, S. A. R.; MAHRAN, H. A.; NOFAL, A. E. Effect of selenium on carbimazole-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, p. 59–66, jan. 2011.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. USA: Current Conceptions, 2003, 373 p.

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

SHEKARRIZ, M.; SHARMA, R. K.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 12, n. 2, p. 70–74, fev. 1995.

SHIRAISHI, K.; TAKIHARA, H.; MATSUYAMA, H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. **World Journal of Urology**, v. 28, n. 3, p. 359–364, jun. 2010.

SINGER, R.; SAGIV, M.; BARNET, M.; BARNET, M.; LEVINSKY, H.; SEGENREICH, E.; FUCHS, Y.; MENDES, E.; YEHOSHUA, H. Low energy narrow band non-coherent infrared illumination of human semen and isolated sperm. **Andrologia**, v. 23, n. 2, p. 181–184, mar./abr.1991.

SOUZA, L. W. O. **Efeito da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentração de testosterona e IGF-1 no plasma seminal de touros (*Bos taurus taurus*) submetidos à degeneração testicular**. 2004. 184 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

SOUZA, M. I. L.; URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; BICUDO, S. D.; RAMOS, A. A. Determinação dos ritmos circadianos e circanuais nas concentrações plasmáticas de testosterona e androstenediona em machos ovinos. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 9, n. 2, p. 123-127, 2006.

SWIERSTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. **The Anatomical Record**, v. 161, n. 2, p. 171–185, jun. 1968.

TAHA, M. F.; VALOJERDI, M. R. Quantitative and qualitative changes of the seminiferous epithelium induced by Ga. Al. As. (830 nm) laser radiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 352–359, jan. 2004.

THOMÉ, H. E.; SANTIS, G. W.; MOURA, V. M. B. D.; AMORIM, R. L.; BANDARRA, E. P. Avaliação histopatológica testicular e epididimária em cães adultos sem raça definida da região de São João da Boa Vista, SP. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 745–755, out./dez. 2007.

TUCHIN, V. V.; MAKSIMOVA, I. L.; KOCHUBEY, V. I.; SEMYONOVA, T. N.; TATARINTSEV, S. N.; BABKOVA, N. L. Fundamentals of ophthalmic diagnostical methods based on laser light scattering. **SPIE Digital Library**, v. 2393, p. 237–253, maio 1995.

VALE FILHO, V. R.; MEGALE, F.; GARCIA, O. S.; ABREU, J. J.; FONSECA, V. O.; RESENDE, J. Prevalência das causas de baixa fertilidade e infertilidade, em touros criados em diferentes regiões do Brasil; de um levantamento de 9 Estados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1974, São Paulo. São Paulo: SBMV, 1074. p. 179.

VOLTARELLI, J. C. Febre e inflamação. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 27, n. 1/2, p. 7-48, jan./jun. 1994.

VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M.; OJEDA, I.; GUTIERREZ-PÉREZ, O.; CHAVEZ-SALDAÑA, M.; CUEVAS, O.; MARIA, D. S.; ROJAS-CASTAÑEDA, J. C. Protective effect of α -tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92, p. 131–139, abr. 2011.

VOGLER, C. J.; BAME, J. M.; DEJARNETTE, J. M.; MCGILLIARD, M. L.; SAACKE, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, p. 1207–1219, dez. 1993.

WAITES, G. M. H.; SETCHELL, B. P. Effect of local heating on blood flow and metabolism in the testis on the conscious ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 8, p. 339–349, dez. 1963.

WAITES, G. M. H.; SETCHELL, B. P.; QUINLAN, D. Effect of local heating of the scrotum, testes and epididymides of rats on cardiac output and regional blood flow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 41–49, jul. 1973.

WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R.; WOLSKI, J. K.; SLOWIKOWSKA-HILCZER, J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. **Central European Journal of Urology**, v. 66, n. 1, p. 60–67, nov./dez. 1995.

WERDELIN, L.; NILSONNE, A. The evolution of the scrotum and testicular descent in mammals: a phylogenetic view. **Journal of Theoretical Biology**, v. 196, p. 61–72, jan. 1999.

WETTEMANN, R. P.; WELLS, M. E.; OMTVEDT, I. T.; POPE, C. E.; TURMAN, E. J. Influence of Elevated Ambient Temperature on Reproductive Performance of Boars. **Journal of Andrology**, v. 42, p. 664–669, 1976.

WILDEUS, S.; HAMMOND, A. C. Testicular, semen and blood parameters in adapted and nonadapted *Bos taurus* bulls in the semi-arid tropics. **Theriogenology**, v. 40, p. 345–355, abr. 1993.

WU, J.-Y.; CHEN, C.-H.; WANG, Y.-H. Low-power laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via cyclic adenosine monophosphate. **International Journal of Oral Science**, v. 5, n. 2, p. 85–91, jun. 2013.

WU, S. H.; OLDFIELD, J. E.; WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H. Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. **Biology of Reproduction**, v. 8, p. 625–629, 1973.

YUE, D.; YAN, L.; LUO, H.; XU, Z.; JIN, X. Effect of vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 217–222, 2010.

ZAN-BAR, T.; BARTOOV, B.; SEGAL, R.; YEHUDA, R.; LAVI, R.; LUBART, R.; AVTALION, R. R. Influence of visible light and ultraviolet irradiation on motility and fertility of mammalian and fish sperm. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 6, p. 549–55, dez. 2005.

ZERVOS, I. A.; TSANTARLIOTOU, M. P.; VATZIAS, G.; GOULAS, P.; KOKOLIS, N. A.; TAITZOGLOU, I. A. Effects of dietary vitamin A intake on acrosin- and plasminogen-activator activity of ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 129, n. 6, p. 707–715, jul. 2005.

ANEXO A

TALP SPERM (Bavister et al., 1983)

1. Solução de sais de TALP (para preparar 500 mL)

Componentes:

Componentes	Quantidade (g) para preparar 500 mL
NaCl.....	2,1 g
KCl.....	0,935 g
NaHCO₃.....	1,05 g
NaH₂PO₄.....	0,025 g
CaCl₂ H₂O.....	0,145 g
MgCl 6H₂O.....	0,04 g
Hepes.....	3,25 g

Preparo:

- Diluir CaCl₂ 2H₂O e MgCl 6H₂O em 200 mL de água Milli-Q;
- Os demais sais devem ser diluídos em 200 mL de água Milli-Q;
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL;
- Filtrar;
- Manter resfriado.

2. Solução dos metabólitos glicosados

A. Solução estoque (para preparar 500 mL)

Componentes:

Componentes	Quantidade (g) para preparar 500 mL
Glicose.....	2,5 g
Lactato de sódio.....	9,25 mL

Piruvato de sódio.....	70 mg
Pen-Strep.....	12,5 mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes;
- Aliquotar (alíquotas de 5 mL);
- Manter em freezer (-20° C).

B. Solução trabalho

- Pipetar 45 mL da solução de sais de TALP;
- Ajustar pH para 7,4;
- Adicionar 5mL da solução estoque de metabólitos glicosados;
- Filtrar em filtro de 0,45 µm;
- Aliquotar (alíquotas de 300 µL);
- Manter em freezer (-20° C).

3.Preparo no dia

Componentes:

Componente	Quantidade
Solução de sais de TALP	10 mL
Solução trabalho de metabólitos glicosados	200 µL
Albumina sérica bovina (BSA).....	100 mg

Preparo:

- Dissolver BSA e incubar por 10 min;
- Ajustar o pH para 7,4;
- Filtrar em filtro de 0,45 µm.

ANEXO B**FORMOL SALINO 4%**

Componentes:

Componentes	Quantidade para fazer 1.000 mL
Formol 37%	40 mL
DPBS/Solução salina	960 mL

ANEXO C

PREPARO DAS SONDAS FLUOROSCENTES

HOESCHT 33342

Molecular Probes

Solução estoque (25 mg/ml)

- Diluir o Hoescht 100mg em 4mL de DMSO para ficar na concentração de 25mg/mL (solução estoque);
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20° C.

Solução de trabalho (0,5 mg/ml)

- Adicionar a 980 µl de DPBS, 20 µl de H3342 (solução estoque, 25 mg/ml) para ficar a concentração de 0,5 mg/mL (solução trabalho);
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20° C.

IODETO DE PROPÍDEO (PI)

Propidium iodide, 28,707-5- 25 mg, Sigma-Aldrich

Solução estoque 25 mg/mL

- Adicionar 1 mL de DMSO à 25 mg de PI;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20° C.

Solução trabalho 0,5 mg/mL

- Adicionar 20 μ L de PI (solução estoque, 25 mg/mL) a 980 μ L de PBS;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20° C.

FITC-PSA

Lectina obtida de *Pisum sativum*, L0770, Sigma-Aldrich

Solução de trabalho (100 μ g/ml)

- No frasco do FITC-PSA acrescentar 1 ml de DPBS e homogeneizar;
- Em tubo falcon coberto com papel alumínio adicionar 18 mL de DPBS, 1 mL de solução de azida de sódio 1% e 1 mL da solução do FITC-PSA homogeneizada;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20° C.

SOLUÇÃO ESTOQUE AZIDA DE SÓDIO 1%

- Adicionar 0,2 g de azida de sódio (Sigma- Aldrich, S8032) a 20 mL de DPBS.

JC-1

T3168- 5 mg, Molecular Probes

Solução estoque 1 mg/ml (153 mM)

- Adicionar 5 mL de DMSO a 5 mg de JC-1 ficando na concentração de 153 mM.

Solução de trabalho(153 μ M)

- Adicionar 1 mL de JC-1 153 mM (solução estoque) a 9 mL de DMSO para ficar na concentração de 153 μ M;
- Aliquotar em microtubos e armazenar a -20° C.

CellROX[®]

CellROX Deep Red[®] 2,5 mM, Invitrogen

Solução de trabalho (1mM)

- Adicionar 8 µL de CellROX[®] 2,5 mM a 12 µL de DMSO;
- Armazenar a -20° C.

ANEXO D

TBARS espontâneo

- Adicionar o volume de 100 µL de sêmen mais 200 µL de TALP *sperm*;
- Adicionar 600 µL de TCA 10% gelado (ácido tricloroacético) a 300 µL de sêmen diluído em TALP *sperm* (proporção 2:1);
- Centrifugar a 19.700g por 10 min, recuperar 800 µL do sobrenadante e armazenar a -80° C.

TBARS induzido

- Adicionar ao volume de 100µl de sêmen mais 100µl de TALP;
- Adicionar sulfato de ferro (50 µL, 4 mM – 111,204 mg/100mL de água milliQ);
- Adicionar ácido ascórbico (50 µL, 20 mM – 352,269 mg/100mL de água milliQ);
- Incubar a 37° C por 90 min mantendo o tubo aberto;
- Adicionar 600µL de TCA 10% gelado (ácido tricloroacético) a 300 µL de sêmen diluído em TALP *sperm* (proporção 2:1);
- Centrifugar a 19.700 g por 10 min, recuperar 800 µL do sobrenadante e armazenar a -80°C.

ANEXO E

HALOMAX[®]

HALOTECH DNA SL[®]

1. Preparo da solução de lise (LS):

- Adicionar 3,5 µL de RA (agente redutor) a 1 mL de BLS. Deixar a solução BLS a temperatura ambiente (22° C) e ser preparada próximo ao momento em que será utilizada.

2. Inclusão da amostra no microgel de agarose:

- Diluir a amostra espermática em TALP *sperm* para a concentração final de 20×10^6 espermatozoides/mL (pode diluir em TALP/PBS);

- Aliquotar 50 µL de agarose e colocar um tubo com agarose em banho-maria a 95-100° C durante 5 minutos até a agarose ficar derretida;

- Após derretida, transferir para um banho-maria a 37° C e deixar por 5 minutos até a temperatura equilibrar;

- Aliquotar 25 µL da amostra espermática no tubo com 50 µL de agarose a 37° C;

- Pipetar 2 µL da suspensão de células em quatro poços marcadores e cobrir com uma lamínula 24x24 mm (uma lamínula cobre quatro poços). Após pressionar sem formar bolhas;

- Após, colocar as lâminas em uma superfície fria (metal a 4° C) e manter na geladeira a 4° C por 5 minutos para solidificar a agarose.

3. Processamento da amostra espermática:

- Retirar a lâmina da geladeira e remover a lamínula com cuidado. Esta etapa deve ser feita a 22° C;

- Colocar a lâmina imersa horizontalmente na LS por 5 minutos;

- Lavar a lâmina com água destilada por 5 minutos;

- Imergir a lâmina em etanol 70%, incubando por 2 minutos e após com etanol absoluto por 2 minutos;

- Após secar, armazenar as lâminas em local escuro.

ANEXO F

ETANOL 70%

- Adicionar a 703,5 mL de etanol 99,5% a 296,5 mL de água destilada;
- A solução deve ser armazenada em local fresco.

SULFATO DE FERRO 4mM

- Deixar a água MilliQ em banho-maria;
- Pesar 0,111204 g de sulfato de ferro e adicionar 100 mL de água MilliQ para a concentração final de 4 mM.

ÁCIDO ASCÓRBICO 20mM

- Deixar a água MilliQ em banho-maria;
- Pesar 0,352269 g de ácido ascórbico e adicionar 100 mL de água MilliQ para a concentração final de 20 mM.