



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

LUIZ CARLOS GONÇALVES DOS SANTOS

**Análise das alterações moleculares em testículos submetidos à
fotohipertermia mediada por nanopartículas como método de indução
de infertilidade.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Brasília
2023

LUIZ CARLOS GONÇALVES DOS SANTOS

**Análise das alterações moleculares em testículos submetidos à
fotohipertermia mediada por nanopartículas como método de indução
de infertilidade.**

Dissertação de mestrado apresentado ao
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM
NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA, da Universidade
de Brasília, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
nanociência e nanobiotecnologia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Carolina Madeira Lucci

Dedico este trabalho a minha musa inspiradora minha mãe. Sua grande força foi à mola propulsora que permitiu o meu avanço, mesmo durante os momentos mais difíceis. Dedico também a todos os professores e amigos que de alguma forma me influenciaram na minha trajetória acadêmica. Agradeço do fundo do meu coração.

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer à Deus por me permitir estar nessa caminhada e em segundo lugar à minha mãe Marleide Gonçalves dos Santos, que sempre esteve ao meu lado me apoiando ao longo de toda a minha trajetória e sempre sendo um grande exemplo para mim. Sou grato à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha trajetória e sempre me ofereceram amor.

Agradeço a minha orientadora Dr. ^a Carolina Madeiro Lucci, por aceitar minhas ideias e auxiliar na condução do meu trabalho de pesquisa, as suas valiosas dicas e ajudas que fizeram toda a diferença no decorrer do trabalho, grato pela confiança depositada na realização do trabalho, por toda paciência do mundo em me ajudar e partilhar seus conhecimentos, por todos os incentivos a continuar a vida acadêmica e por ser um grande exemplo de educadora e cientista.

Deixo um agradecimento especial ao Dr. Mauricio Machaim Franco, por ter disponibilizado seu laboratório na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, para a realização dos experimentos e análises de genes, e ao Dr. Andris Bakuzis do Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica, Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás pela sintetização da nanopartícula, muito obrigado pela parceria.

Agradeço também a todos do laboratório de reprodução animal e endocrinologia pelo apoio e paciência comigo, Bruna, Juliana, Vanessa, Cecibel, André pelo o auxílio nos experimentos e também pela cordialidade e conselhos em todos os momentos.

A todos os meus professores do curso mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia por compartilharem seus conhecimentos em aulas ou em dicas para a realização do projeto. A todas as pessoas que de uma alguma forma me ajudaram a acreditar em mim eu quero deixar um agradecimento eterno, porque sem elas não teria sido possível.

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi investigar alterações moleculares causadas pelo procedimento de fotohipertermia mediada por nanopartículas (FHT) aplicada a testículos de ratos Wistar. Os animais foram tratados e divididos de acordo com o momento da eutanásia: 24 horas, 72 horas e 7 dias após o procedimento. Os testículos foram medidos, pesados e segmentados, uma parte destinada para avaliação de marcadores moleculares e uma parte para avaliação histopatológica. Para a análise de marcadores moleculares foi realizada a extração do RNA total das amostras e analisada a expressão dos genes *Mtrf1*, *Trf2*, *CLDN11* e *StAR*, normalizados pelos genes *GAPDH* e *B-actin*. Os genes *Mtrf1* e *Trf2* apresentaram uma redução significativa na expressão após o tratamento, principalmente nos grupos de 24h e 72h, mantendo-se baixos no grupo de 7 dias. O gene *CLDN11* não apresentou diferença estatística, porém é possível observar uma tendência de aumento, mais evidente nos animais analisados 7 dias após a FHT. O gene *StAR* teve maior expressão nos testículos dos animais tratados 24h após o tratamento, mesmo com variação entre os animais, e reduziu após 72h e 7 dias. As análises histopatológicas mostraram alterações sutis nos grupos 24h e 72h, porém sendo visível o início de vacuolização e células exfoliadas no lúmen de alguns túbulos. Nas amostras de 7 dias as alterações foram mais pronunciadas, com maior vacuolização, redução do tamanho dos túbulos e necrose coagulativa extensa. O trabalho mostrou que o tratamento de FHT testicular afeta a expressão de genes que podem estar envolvidos em vias de produção de ROS ou proteção antioxidante, e as análises histopatológicas mostram os danos causados pelo tratamento, corroborando que o procedimento causa danos irreversíveis à função testicular precocemente. Ainda é necessário analisar a expressão de outros genes para identificar melhor a via de regulação.

Palavras-chaves: Hipertermia testicular, Expressão gênica, Túbulos seminíferos.

Abstract

The objective of the present work was to investigate molecular alterations caused by the procedure of photohyperthermia mediated by nanoparticles (FHT) applied to testicles of Wistar rats. The animals were treated and divided according to the moment of euthanasia: 24 hours, 72 hours and 7 days after the procedure. The testicles were measured, weighed and segmented, one part destined for the evaluation of molecular markers and one part for histopathological evaluation. For the analysis of molecular markers, the extraction of total RNA from the samples was performed and the expression of the genes *Mtrf1*, *Trf2*, CLDN11 and StAR was analyzed, normalized by the GAPDH and B-actin genes. The *Mtrf1* and *Trf2* genes showed a significant reduction in expression after treatment, mainly in the 24h and 72h groups, remaining low in the 7-day group. The CLDN11 gene did not show statistical difference, however it is possible to observe an increasing tendency, more evident in the animals analyzed 7 days after FHT. The StAR gene had higher expression in the testes of treated animals 24h after treatment, even with variation between animals, and reduced after 72h and 7 days. Histopathological analyzes showed slight alterations in the 24h and 72h groups, however, the beginning of vacuolation and exfoliated cells in the lumen of some tubules were already visible. In the 7-day samples, the alterations were more pronounced, with greater vacuolization, reduction in the size of the tubules and extensive coagulative necrosis. The work showed that testicular FHT treatment affects the expression of genes that may be involved in ROS production or antioxidant protection pathways, and histopathological analyzes showed the damage caused by the treatment, corroborating that the procedure causes irreversible damage to testicular function. It is still necessary to analyze the expression of other genes to better identify the regulatory pathways.

Keywords: Testicular hyperthermia, Gene expression, Seminiferous tubules.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Concentrações cDNA o Kit: GoScript Reverse Transcriptase (Promega®).

Lista de quadros

- Quadro 1 – Nomenclatura dos genes, número de acesso no GenBank, sequência dos primer e tamanho do amplicon dos genes selecionados para análise de qPCR.
- Quadro 2 – Identificação das amostras e seus pesos, utilizadas para síntese do cDNA e quantificações de RNA total extraído e purificado.
- Quadro 3 – Eficiência e temperatura de melt.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Espermatogênese. Adaptado de: Mäkelä, JA., Toppari, J. (2017), Endocrinology. Springer, Cham.
- Figura 2 – Mapa de expressão gênica. Adaptado de: Alzforum, Jessica Shugart, Uc Santa Cruz – 23 outubro, 2017.
- Figura 3 – Curva de amplificação do qPCR em Tempo Real. CT – Cycle Threshold, Cruva dividida em 3 fases principais: Fase Lag ou fase Linear, Fase Log ou fase exponencial e Fase platô. GOMES, 2011.
- Figura 4 – Desenho experimental do procedimento de fotohipertermia (FHT) pela a incidência de luz do LED.
- Figura 5 – Gel de agarose 1,2% dos RNA's totais extraídos.
- Figura 6 – Layout da placa para análise eficiência dos primers dos genes selecionado, genes de referência: B-actin; GAPDH. Genes de interesse: CLDN11; MTRF1, StAR; TRF2.
- Figura 7 – Layout da placa análise qPCR dos genes selecionado, genes de referência: B-actin; GAPDH. Genes de interesse: CLDN11; MTRF1, StAR; TRF2.
- Figura 8 – Micrografias de testículos dos animais controles
- Figura 9 – Micrografias de testículos dos animais tratados com FHT após 24 horas.
- Figura 10 – Micrografias de testículos dos animais tratados com FHT após 72 horas.
- Figura 11 – Micrografias de testículos dos animais tratados com FHT após 7 dias.
- Figura 12 – Gel de agarose 2%, para análise de eficiência dos primers.
- Figura 13 – Gráfico de curva de amplificação dos genes. A – B-actin; B- GAPDH (genes referência); C – CLDN11; D – MTRF1; E- StAR.
- Figura 14 – Gráfico de abundância relativa de RNA mensageiro dos genes MTRF1, CLDN11, TRF2 e StAR.

Lista de abreviações

ATP	Adenosina trifosfato
FSH	Hormônio folículo-estimulante
BAX	Associated X-protein
BCL2	B-cell lymphoma 2
BTB	Barreira hematotesticular
B-ACTIN	Beta-actin
CACL ₂	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
CHPPR	Proteína condrocite com uma região de poliprolina
CLDN11	Claudin 11
CT	Cycle Threshold
DBP	Di (<i>n</i> -butil) ftalato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica
FHT	Fotohipertermia
FMA	Campo magnético alternado
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HSP	Proteína de choque térmico
IONPs	Nanopartículas de óxido de ferro
IR	Infravermelho
MNH	Nanopartículas magnéticas
mRNA	RNA mensageiro
MTFR1	Regulador de fissão mitocondrial 1
NGS	Next Generation Sequencing
NIR	Espectroscopia de Infravermelho Próximo
NOS	Sintase de óxido nítrico
NPMs	Nanopartículas magnéticas
NTCs	Nanotubos de carbono
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRLR	Receptor de prolactina
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-SEQ	Sequenciamento de moléculas de RNA
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rRNA	RNA ribossômico
SOD	Superóxido dismutase
SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro
SPR	Ressonância plásmon de superfície
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogênica
THR	Hormônio tireoidiano
TRF2	TATA box-binding protein related factor 2
tRNA	RNA transportador

Sumário

INTRODUÇÃO.....	4
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	6
1.2 TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR.....	8
1.3 EFEITOS DA TEMPERATURA NA REPRODUÇÃO.....	9
2. NECESSIDADE DA ESTERILIZAÇÃO DE ANIMAIS MACHOS.....	11
2.2. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO.....	12
2.2.1. MÉTODOS TÉRMICOS.....	13
3. HIPERTERMIA E NANBIOTECNOLOGIA.....	14
3.1. NANOMATERIAIS E NANBIOTECNOLOGIA.....	15
3.2 HIPERTERMIA MEDIADA POR NANOPARTÍCULA COMO FORMA DE ESTERILIDADE EM ANIMAIS MACHOS.....	17
3.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DA HIPERTERMIA MEDIADA POR NANOPARTÍCULAS.....	19
4. BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO.....	19
4.1 GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE TÉRMICO EM TESTÍCULOS.....	25
JUSTIFICATIVA.....	27
OBJETIVOS.....	28
5.1 – OBJETIVO GERAL.....	28
5.2 – OBJETIVO ESPECÍFICO.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
6.1 – COMITÊ DE ÉTICA.....	29
6.2 – NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA.....	29
6.3 – ANIMAIS.....	29
6.4 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
6.5 – AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES.....	30
6.6 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	34
6.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
7.1 – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	36
7.2 – ANÁLISES DE QPCR.....	40
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

Introdução

Aproximadamente 75% dos cães no mundo vivem em situação de abandono (WSPA, 2012). Uma das maiores preocupações com esse número é a alta reprodução desses animais. Estes animais acabam se tornando riscos à saúde pública por meio da transmissão de doenças, desequilíbrios biológicos causado pela predação de pequenos animais, poluição ambiental causada pela disseminação de lixo doméstico, agressões e poluição sonora (Nassar et al., 1991; ICAM, 2007). O controle populacional desses animais, realizado por castração e educação da propriedade responsável, é o método mais efetivo (Bortoloti et al., 2007). Atualmente, existem dois tipos de castração de machos: castração cirúrgica e castração química (não cirúrgica). A castração cirúrgica inclui a remoção completa dos testículos (orquiectomia) (Cohen et al., 1990). Embora seja eficaz, é caro, requer ambiente controlado, profissionais habilitados e acompanhamento pós-operatórios (Oliveira et al., 2012). A castração química por sua vez é realizada por injeção intratesticular à base de solução esclerosante (Massei & Miller, 2013), e é vantajosa pelo baixo custo, a capacidade de esterilizar um grande número de animais em um dia, a simplicidade do procedimento e a ausência de pós-operatório (Fahim et al. 1993). No entanto, pode causar inflamação e desconforto nos animais (Tepsumethanon et al., 2005), e nunca foi largamente utilizada, de modo que ainda se busca aperfeiçoamentos e também outros métodos não cirúrgicos.

A nanotecnologia pode ser um novo método de castração alternativa, já que essa possibilita o uso de materiais em nanoescala na pesquisa biomédica, em novos tratamentos para doenças, diagnóstico, engenharia de tecidos e gerenciamento de medicamentos. Nanomateriais, como nanopartículas metálica, aquecem quando são expostos a uma fonte de calor - hipertermia (Yu et al., 2011). Considerando que a produção de espermatozoides requer baixa temperatura, a aplicação da hipertermia mediada por nanopartículas pode ser uma estratégia para o desenvolvimento de um método de castração de machos.

A temperatura testicular deve sempre se manter estável, cerca de 3-4°C abaixo da temperatura corpórea, caso essa temperatura se eleve por longos períodos, podem trazer prejuízos ao ciclo espermático e danos ao tecido. Vários estudos documentaram efeitos adversos da hipertermia em testículos adultos normais em várias espécies, incluindo camundongos (Hand et al., 1979), ratos (Collins et al., 1969), touros (Casady et al., 1953), porcos (Wettemann et al., 1976), carneiros (Mieusset et al., 1991) e humano (Baranski, 1993; Mieusset & Bujan, 1995). Pesquisas realizadas por Fahin (1975) mostraram que diferentes fontes de calor são capazes de prejudicar a formação de gametas masculinos em ratos Wistar. Trabalhos (Jannes et al., 1998; Setchell et al., 1998), mostraram redução temporária no peso relativo do testículo acompanhada por um período temporário de infertilidade parcial ou completa. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa

demonstraram que a aplicação da hipertermia testicular mediada por nanopartículas promove danos à espermatogênese em ratos Wistar (Jivago et al., 2021; Lima, 2019).

Um dos grandes desafios em relação ao estresse por calor é a perda da capacidade de modular o fluxo sanguíneo para atender às necessidades de O₂ no tecido, podendo acarretar a geração de ROS (Christophi et al., 1998; Harmon et al., 1991; Sellins & Cohen, 1991). As células espermáticas, assim como todas as demais, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), que são várias moléculas e radicais livres produzidos em sistemas biológicos (Ferreira & Matsubara, 1997), ambos essenciais para as funções orgânicas quando em equilíbrio, como um processo contínuo e fisiológico, mas tornam-se prejudiciais quando em excesso (Vasconcelos et al., 2007).

O estresse oxidativo é uma das principais causas de danos térmicos às células espermatogênicas e leva à apoptose e à quebra da fita de DNA (Pérez-Crespo et al., 2008). Estudos mostram que o estresse térmico altera várias funções moleculares, como síntese, replicação e reparo do DNA, divisão celular e funções de enzimas nucleares e polimerases do DNA (Higashikubo et al., 1993; Slimen et al., 2016). Também foi demonstrado que o estresse térmico afeta a fluidez e a estabilidade das membranas celulares e inibe os receptores e a função das proteínas de transporte transmembrana (Slimen et al., 2016).

Várias enzimas podem acelerar a produção de ROS, além disso existem fontes externas, que incluem a utilização de algumas drogas e o aumento da temperatura (Santana, 2018), que podem causar apenas redução temporária na qualidade do esperma, ou pode causar infertilidade dependendo da intensidade e duração (Rizzoto et al., 2020). No entanto, ainda não sabemos as alterações moleculares que podem estar envolvidas neste processo. Assim, o objetivo da presente dissertação foi investigar alterações moleculares causadas pelo procedimento de fotohipertermia mediada por nanopartículas (FHT) aplicada a testículos de ratos Wistar.

Revisão de literatura

1. Sistema Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino dos mamíferos é constituído por: pênis, saco escrotal, testículos, túbulos retos, túbulos eferentes, epidídimos, vasos deferentes, próstata, vesícula seminal e glândulas bulbouretrais (Reece et al., 2015). Os testículos, gônadas sexuais masculinas, são divididos em dois compartimentos: o compartimento intersticial e o compartimento tubular. Eles também são responsáveis pela produção de hormônio sexual, definindo características do indivíduo do sexo masculino, e pela espermatogênese, produzindo os espermatozoides (Reece et al., 2015). Os testículos e epidídimos, onde o desenvolvimento e maturação dos espermatozoides ocorrem, estão localizados fora da cavidade abdominal, dentro da bolsa escrotal, que mantém uma temperatura inferior à temperatura corporal, necessária para a formação e maturação de espermatozoides viáveis (Vanputte et al., 2014).

Os testículos são divididos internamente em lóbulos e cerca de 90% do seu volume é ocupado pelos túbulos seminíferos (Scanlon & Sanders, 2007). Entre os túbulos seminíferos, no tecido intersticial, estão as células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona. No seu interior, os túbulos seminíferos contêm células de duas origens: células de Sertoli e células germinativas. As células de Sertoli no túbulo seminífero formam junções oclusivas que definem os compartimentos basal e adluminal. Essas conexões criam a chamada barreira hematotesticular. Essa barreira impede que substâncias presentes no sangue passem entre as células para atingir o lúmen do túbulo seminífero, dessa forma apenas moléculas selecionadas podem passar pelas células de Sertoli e assim entrar no líquido intratubular. A barreira também impede que anticorpos entrem em contato com espermatozoides altamente diferenciados (Sherwood, 2013). A produção de espermatozoides que ocorre nos túbulos seminíferos é chamada de espermatogênese. O epidídimo é um túbulo de aproximadamente 6 metros de comprimento em humanos, sendo o local em que o espermatozóide completa sua maturação e se torna funcional (Scanlon & Sanders, 2007).

1.1 Espermatogênese

A espermatogênese (Figura 1) é o processo de divisão e diferenciação celular de espermatogônias em espermatozoides. Essas células são de suma importância para a manutenção da fertilidade dos machos e garantem a preservação da espécie (Pryor et al., 2000). A espermatogênese é um processo complexo envolvendo divisões mitóticas e meióticas, bem como a diferenciação celular, e pode ser dividida em três fases principais: (1) proliferação e diferenciação das espermatogônias, (2) meiose e (3) espermiogênese, a transformação das espermatídes em espermatozoides (Sharma & Agarwal, 2011). A espermatogênese é uma série

altamente organizada e complexa de eventos de desenvolvimento, produzindo gametas geneticamente distintos para a fertilização. Em machos, esse processo se inicia na puberdade e continua por toda a vida do indivíduo, ocorrendo dentro dos túbulos seminíferos (Sharma & Agarwal, 2011; Esteves & Miyaoska, 2015). O tempo necessário para o processo de espermatogênese varia conforme a espécie e dura cerca de 64 dias em humanos, 50 dias em ratos, 62 dias em cães e 46,8 dias em gatos (Adler, 1996; França & Godinho, 2003; Peterson & Talcott, 2012).

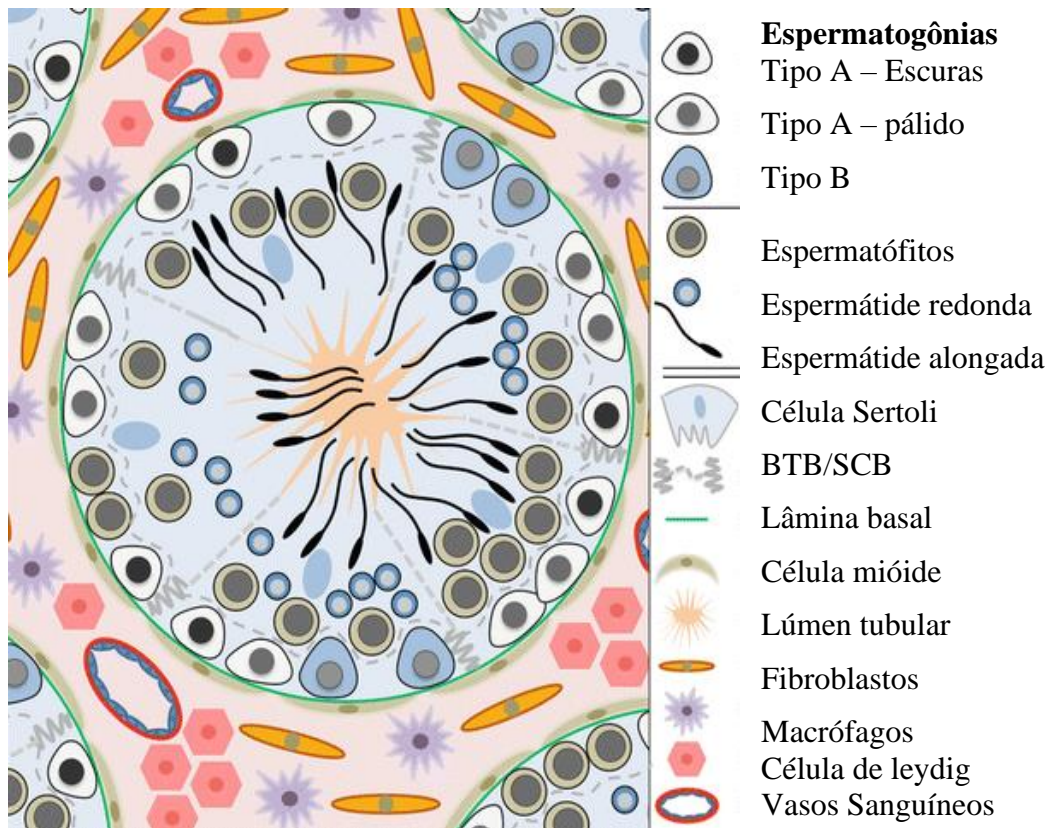


Figura 1. Desenho esquemático de um túbulo seminífero ilustrando o processo de espermatogênese. Adaptado de: Mäkelä & Toppari. (2017), *Endocrinology*. Springer, Cham.

A espermatogênese começa com a multiplicação das espermátogônias por mitose, que então entram em meiose e duplicam seus cromossomos. Nesse processo, que ocorre no compartimento basal, as células com DNA duplicado são chamadas de espermátócitos primários. Os espermátócitos primários migram para o compartimento adluminal, um compartimento adequado para a divisão meiótica, e passam pela primeira divisão meiótica para se tornarem espermátócitos secundários. O processo de mudança para um espermátócito secundário divide os cromossomos, transformando uma célula $2n$ em uma célula n , mas cada cromossomo tem 2 cromátides. Assim, os espermátócitos secundários sofrem uma segunda divisão meiótica, onde as

cromátides-irmãs se separam, para formar as espermátides (Sharma & Agarwal, 2011). As espermátides passam pelo processo de espermiogênese. Isso ocorre assim que a meiose é concluída, havendo algumas mudanças morfológicas. As espermátides permanecem ligadas à membrana apical das células de Sertoli até a transformação completa em espermatozóides. Durante esse processo, os espermatozóides perdem grande parte de seu citoplasma. O complexo de Golgi e as mitocôndrias se desenvolvem e se diferenciam. Uma vesícula acrossômica é formada, bem como um corpo cromatóide que se desenvolve no polo oposto dessa vesícula. Em seguida, aparecem o centríolo proximal e o filamento axial. A formação do acrossoma está completa e a peça intermediária e a cauda se desenvolvem. Com a inativação do genoma, ocorre uma condensação progressiva do núcleo. Assim, os espermatozóides são formados e liberados no lúmen do túbulo seminífero juntamente com o líquido secretado (Schatten & Constantinescu, 2007; Silverthorn, 2010; Sharma; Agarwal, 2011).

A espermatogênese é dividida em ciclos, chamados ciclos do epitélio seminífero. O ciclo do epitélio seminífero é caracterizado como um evento temporal e sequencial de mudanças, levando à progressão da espermatogênese em uma determinada região do túbulo seminífero (Lara et al., 2018). O ciclo do epitélio seminífero também pode ser definido como o intervalo entre o início do processo de espermatogênese e o início do próximo processo que ocorre na mesma seção do túbulo seminífero e geralmente ocupa $\frac{1}{4}$ do tempo total da espermatogênese. Além disso, diferentes seções do túbulo seminífero não possuem um processo mutuamente sincronizado de espermatogênese, o que é chamado de onda espermatogênica. Cada sessão de túbulo está na fase de espermatogênese um pouco antes ou depois da sessão contígua. Juntos, esses dois eventos, o ciclo do epitélio seminífero e a onda espermatogênica, garantem a produção contínua e diária de espermatozoides em qualquer macho a partir da puberdade (Hess & Franca, 2008).

1.2 Termorregulação testicular

Nos mamíferos, a temperatura dos testículos tende a estar 3 °C a 4 °C abaixo da temperatura corporal para o curso adequado da espermatogênese, fazendo com que os animais desenvolvem mecanismos termorreguladores eficazes para os testículos (Hafez, 1964). A termorregulação testicular em animais pode ser dividida em dois componentes: não vascular e vascular. A termorregulação não vascular inclui respostas fisiológicas, por exemplo, sudorese, mudanças na localização dos testículos em relação ao abdômen e outras abordagens comportamentais. Em contraste, as respostas vasculares envolvem troca de calor em contracorrente e vasodilatação periférica (Rizzoto & Kastelic, 2020). Os efeitos do aumento da temperatura sobre a qualidade do sêmen têm sido amplamente estudados, onde temperaturas

ambientes de 40 °C a uma umidade relativa de 35–45% por 12 horas contínuas reduziram a qualidade do sêmen (Skinner & Louw, 1966).

A localização dos testículos suspensos em um escroto fora da cavidade corporal, é um dos mecanismos que garante baixa temperatura testicular (Kastelic et al., 1997), além do sistema de termorregulação em que ocorre uma troca de calor em contracorrente do sangue quente que entra no testículo e o sangue frio que sai do testículo através de um plexo arteriovenoso chamado plexo pampiniforme (Hees et al., 1984). O grau de resfriamento é ainda controlado por dois músculos: a túnica dartos no escroto que regula a área da superfície escrotal e o músculo cremaster que controla a posição do escroto em relação ao corpo (Hees et al., 1984).

A regulação da temperatura testicular depende de várias características, sendo que a pele escrotal é tipicamente fina, com poucos pelos e uma extensa vasculatura subcutânea, o que facilita a perda de calor por radiação (Dahl & Herrick, 1959). O colo escrotal que é a parte mais quente do escroto, é longo e distinto (escroto pendular) e reduz a temperatura testicular aumentando a área de radiação e permitindo que os testículos se afastem do corpo. A túnica dartos, uma fina camada de músculo liso sob a pele escrotal, é controlada por nervos simpáticos e se contrai e relaxa em ambientes frios e quentes, respectivamente (Setchell, 1978). O músculo cremaster também se contrai para aproximar os testículos do corpo em condições ambientais frias (Setchell, 1978). Respostas de corpo inteiro também contribuem para o resfriamento testicular, por exemplo em touros, a densidade das glândulas sudoríparas é maior na pele escrotal (Blazquez et al., 1988).

1.3 Efeitos da temperatura na reprodução

Os efeitos do aumento da temperatura testicular dependem da extensão e duração do aquecimento testicular. Embora um aumento leve e curto na temperatura testicular possa causar apenas uma diminuição temporária na qualidade do sêmen, o aquecimento prolongado é uma das causas da infertilidade (Rizzoto & Kastelic, 2020). As flutuações sazonais nos componentes do ciclo reprodutivo são bastante complexas, as mudanças climáticas e a periodicidade de picos de alta temperatura ambiente em alguns países podem impactar negativamente a produtividade alimentar e a reprodução animal (Smoyer et al., 2003; Ho et al., 2017; McManus et al., 2020).

Altas temperaturas que gerem estresse térmico podem levar a interrupções nos processos reprodutivos por meio de dois mecanismos gerais. Primeiro, mudanças homeocinéticas para regular a temperatura corporal. O segundo mecanismo é a falha dos sistemas homeocinéticos (Hansen, 2009). Isso pode ser exemplificado nos casos de criptorquidismo, que se caracteriza pela incapacidade dos testículos de descerem para a bolsa escrotal e acabam se alojando na cavidade abdominal. Animais criptorquídicos apresentam testículos retidos hipoplásicos e não funcionais com concentração reduzida de espermatozóides, embora apresentem aspectos sexuais secundários

normais (Hafez & Hafez, 2004). Assim, um aumento da temperatura testicular leva a uma diminuição na produção de espermatozoides, bem como a uma diminuição da motilidade e a um aumento da percentagem de espermatozoides morfológicamente anormais (Hansen, 2009). Tais efeitos também podem ser observados quando uma fonte de calor local é aplicada diretamente nos testículos (Setchell, 2006).

Os efeitos de temperaturas extremas na reprodução variam com a espécie, raça, idade, duração da exposição à temperatura, natureza das flutuações de temperatura e altitude (Hafez, 1964), causando o que chamamos de estresse térmico prejudicial para células somáticas e reprodutivas (Kastelic et al., 2017; Rojas et al., 2017). O estresse térmico ocorre quando um animal é exposto a temperaturas além de sua capacidade de compensação, geralmente envolvendo todo o corpo, embora possa ser limitado a órgãos/regiões anatômicas específicos (Setchell et al., 1966). O estresse térmico pode afetar adversamente a reprodução de pelo menos duas maneiras. O primeiro é o efeito sistêmico, que perturba o equilíbrio energético, o segundo é um efeito deletério direto ou indireto na função reprodutiva celular, dependendo do grau e duração da exposição a altas temperaturas (Hansen et al., 2009; Sailer et al., 1997).

As células mais suscetíveis a danos por temperatura elevada são os espermatócitos e espermatídes, embora também possam ocorrer danos as espermatogônias B (Setchell, 1998) e irregularidade nas funções das células de Sertoli e Leydig (Waites & Setchell, 1990). Todas as fases da espermatogênese são suscetíveis, com o grau de dano relacionado à extensão e duração do aumento da temperatura (Waites & Setchell, 1990). Os espermatócitos na prófase meiótica são destruídos pelo calor, enquanto espermatozoides maduros comumente exibem anormalidades metabólicas e estruturais (Setchell, et al., 1971). O aquecimento do testículo tende a reduzir a proporção de espermatozoides vivos e com motilidade progressiva e aumenta a incidência de espermatozoides morfológicamente anormais, especialmente aqueles com cabeças defeituosas (Barth & Oko, 1989). Em um estudo em touros (Rahman et al., 2011), o aumento da temperatura testicular causou falta de protaminação da cromatina e mudanças sutis no formato da cabeça do espermatozoide. Quando analisados os epidídimos na maioria dos mamíferos, a cauda do epidídimo é mais fria que os testículos (Bedford, 1991), facilitando sua função de armazenamento de esperma. O aumento da temperatura da cauda interrompe as funções de absorção e secreção, altera a composição (íons e proteínas) do fluido da cauda e aumenta (aproximadamente três vezes) a taxa de passagem do esperma através da cauda (Bedford, 1991).

Os danos causados pela elevação da temperatura testicular, quando analisados em termos de nível e duração da exposição, podem ser graves e de recuperação lenta (Gabaldi et al., 1999), sendo o estresse oxidativo o principal indutor (Hansen, 2009), em que altas temperaturas promovem a formação de ROS (Kim et al., 2013). A regulação dos níveis de oxidantes, pelo

balanço redox dos sistemas biológicos, ocorre em virtude da geração dos compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (Halliwell & Whiteman, 2004), quando em equilíbrio atua como processo contínuo e fisiológico, mas tornam-se deletérias quando em excesso o que poderia gerar infertilidade ao depender do nível de desequilíbrio (Vasconcelos et al., 2007).

2. Necessidade da esterilização de animais machos

Os animais errantes são um problema de saúde pública para a maioria das cidades do mundo. Nos Estados Unidos até o início dos anos 2000, eram mortos até 9,1 milhões de cães e 9,5 milhões de gatos por ano (Soares & Silva, 1998), como medida para o controle populacional, o que gerava um gasto elevado para os cofres públicos, destinados à captura, à guarda e ao sacrifício. O sacrifício animal, além de caminhar contra o avanço de uma mentalidade humanitária relacionada às questões animais, não se mostra eficaz para o controle populacional de animais errantes e cria um ciclo de mortes contínuas (Joffily et al., 2013).

A superpopulação de animais errantes constitui um cenário alarmante, principalmente em países subdesenvolvidos (Jana & Samanta, 2007). Em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou cerca de 30 milhões de animais em situação de rua no Brasil, sendo a maioria cães (Martinhago & Magalhães, 2018). Em cidades de grande porte, para cada cinco habitantes há um cachorro, destes, 10% estão abandonados. No interior, em cidades menores, a situação não é muito diferente. Em muitos casos o número de animais em situação de abandono chega a 1/4 da população humana (ANDA, 2013). O contato próximo entre as espécies tem permitido o surgimento de doenças conhecidas como zoonoses, comuns entre humanos e animais (Beserra et al., 2020; Schantz, 1991), como raiva (Gupta & Gupta, 2019), leishmaniose (OMS, 2010) e doença de Chagas (Coura, 2015). Além das zoonoses, a superpopulação de animais nas ruas aumenta a incidência de maus-tratos, acidentes e mordidas (Marlet & Maiorka, 2010).

Os animais errantes, por sua vez possuem uma alta reprodução, cadelas e gatas são animais pluríparos e de gestação curta (em torno de 60 dias) e com grande potencial para produzir proles numerosas que atingem a maturidade sexual a partir dos seis meses de idade. Como a reprodução é muito acelerada, o espaço antes ocupado por um animal é rapidamente preenchido por novos (Olson, 1993). E quando considerando o sexo masculino, o seu potencial reprodutivo é bem maior quando comparado com o feminino, já que a produção de espermatozoides é contínua desde a puberdade ao final da vida, logo cada macho não esterilizado contribui para o aumento do número de fêmeas gestantes (Oliveira et al., 2012).

Nesta perspectiva, o conceito de saúde única, que é definido como o equilíbrio na relação entre humanos, animais e o ambiente (Carvalho & Pessanha, 2013; Sousa & Silva, 2012) visa a castração maciça de animais errantes como a principal alternativa para reduzir a superpopulação,

minimizando os problemas de saúde pública (Okwee-Acai et al., 2013). Em 30 de março de 2017 vigorou a lei federal 13.426/2017, a qual traz no Art. 1º que o controle de natalidade de cães e gatos em todo o território nacional deve ser regido de acordo com o estabelecido nesta Lei, mediante esterilização permanente por cirurgia, ou por outro procedimento que garanta eficiência, segurança e bem-estar ao animal.

Com esse propósito, os métodos convencionais utilizados são a ovariectomia e a orquiectomia. No entanto, as técnicas cirúrgicas apresentam desvantagens para aplicação em larga escala (Adin, 2011). Como alternativa, vários métodos para alcançar a esterilidade têm sido estudados, incluindo a castração química, que possuem algumas vantagens, como o baixo custo e a possibilidade de uso massivo, incentivando organizações de saúde pública e governos a participar mesmo com recursos limitados (Garde et al., 2016).

2.2. Métodos de esterilização

O controle populacional de cães e gatos ainda é feito principalmente pela castração cirúrgica (orquiectomia), que é um método de seleção eficaz e seguro (Sampaio et al., 2014). Quando nos deparamos com o problema da superpopulação de animais errantes, a castração para remover completamente as gônadas é a forma mais eficaz de reduzir a população, pois suprime a fertilidade masculina e também ajuda a reduzir a agressividade e a competição por fêmeas, bem como o comportamento de marcação territorial (Fossum, 2013; Sampaio et al., 2014). A castração cirúrgica requer uma equipe profissional, anestesia geral dos animais, equipamentos médicos, centros cirúrgicos esterilizados e tempo de recuperação pós-operatória dos animais, podendo haver riscos no processo cirúrgico, demandando acompanhamento desses animais (Cathey & Memon, 2010). No entanto, o custo e o tempo de castração dessa grande população podem ser insustentáveis em relação ao problema da superpopulação de animais errantes (Menezes, 2008; Massei et al., 2016).

Portanto, métodos não cirúrgicos de esterilização podem ser uma boa opção (Cathey & Memon, 2010). A castração com quimioesterilizantes inorgânicos é realizada por injeção intratesticular, que promove reações inflamatórias locais e peroxidação lipídica, causando degeneração irreversível dos gametas levando à infertilidade (Oliveira et al., 2013).

Há mais de cinco décadas métodos não cirúrgicos de esterilização de animais machos vêm sendo buscados, dentre eles os quimioesterilizantes (Freund et al., 1953). Um quimioesterilizante ideal deve apresentar capacidade irreversível de interromper a gametogênese e a libido, ser seguro em relação à toxicidade sistêmica e/ou graves efeitos colaterais, possuir uma acessibilidade no uso em larga escala (Wiebe & Barr, 1984) e atingir a esterilidade em uma única aplicação (Jana & Samanta, 2007). Dois agentes químicos destacam-se pelo número de estudos realizados e pela

existência de formulações comerciais: cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl_2) (Leoci et al., 2019) e gluconato de zinco (DiGangi et al., 2017).

O Gluconato de zinco foi descrito pela primeira vez por Fahim et al., (1993) e demonstrado por Garde et al., (2016), que o gluconato de zinco leva à fibrose irreversível dos túbulos seminíferos, plexo testicular e epidídimo, levando à esterilização permanente após 30 dias de aplicação. No entanto, seu efeito não atinge as células de Leydig, de modo que o composto interrompe a espermatogênese, mas os níveis circulantes de testosterona permanecem normais (Levy et al., 2008; Rafatmah et al., 2019).

O CaCl_2 é um agente esterilizante aplicável a várias espécies: cães, gatos, roedores e bovinos (Massei & Miller, 2013) em que diferentes concentrações e doses já foram testadas e determinadas (Jana & Samanta, 2011; Leoci et al., 2014; Soumendra & Das, 2017). O CaCl_2 leva à necrose completa, fibrose e ausência de células germinativas no tecido testicular (Jana & Samanta, 2011). Seu mecanismo de ação é dose-dependente, portanto, indica-se como eficaz a concentração de 20%, capaz de reduzir a testosterona sérica (Soumendra & Das, 2017). No entanto, em cães, os resultados mostraram que um em cada seis animais manteve a produção espermática, as medições de testosterona mostraram variação individual (Paranzini et al., 2018; Silva et al., 2018). Além disso, não foi comprovado se o efeito da castração é irreversível e muitos efeitos adversos são relatados (Oliveira et al., 2012). Dessa forma, até hoje, os agentes químicos que surgiram no mercado como opção aos métodos de castração não conseguiram atender a todos os critérios de eficiência exigidos (Cathey & Memon, 2010). Assim, ainda há necessidade de estudos para o desenvolvimento de novos métodos para o controle de animais errantes, e a nanotecnologia pode ser uma opção.

2.2.1. Métodos térmicos

Um estudo de Fahim et al., (1975) demonstrou que a fertilidade pode ser temporariamente afetada em ratos machos quando expostos a diferentes fontes de calor. Para isso, foram utilizados 300 ratos machos, divididos em 5 grupos diferentes: grupo I como controle, grupo II, onde os testículos foram expostos por 15 minutos em água aquecida a 60°C , grupo III, que teve a temperatura dos testículos aumentada para 60°C por 15 minutos com aquecedor infravermelho, grupo IV, que foi tratado com radiação de micro-ondas por 1, 5 ou 15 minutos, e grupo V, que utilizou ultrassom aplicado uma ou duas vezes nos testículos. Após 10 meses de experimento, os resultados obtidos mostraram que houve uma diminuição significativa de espermatozoides e espermátides no grupo II em relação ao grupo controle. O grupo III não apresentou espermatozoides e 20-25% do estágio de espermatogênese nos túbulos seminíferos. No grupo IV, foi observado 100% de ausência de espermatogênese, quando 100% de energia aplicada aos

testículos foi usada, a temperatura interna foi aumentada para 63-65 C durante o tratamento de 5 minutos. No grupo V, o número de espermatozoides, espermátides e espermatócitos secundários diminuiu após uma aplicação; quando expostos a duas aplicações, 100% dos túbulos seminíferos apresentaram ausência de estágios de espermatogênese.

Setchell & Waites (1972), analisaram testículos de ratos que foram aquecidos por 1 hora, sendo o rato levemente anestesiado, onde o escroto e a cauda ficavam imerso em água a 41 ou 33° C. O animal foi então seco e deixado para recuperar a consciência. Em intervalos entre 1 e 60 dias após o tratamento térmicos, grupos de 4 ratos tiveram seus ductos deferentes ligados em um lado. Os ductos deferentes de um grupo de quatro os ratos foram ligados imediatamente antes da exposição da área escrotal ao calor, e o fluido foi coletado da rete testis 24 horas depois. Eles observaram que o aquecimento local dos testículos de ratos foi seguido por uma queda na concentração de espermatozoides começando entre 6 e 10 dias, e durando até 39 dias, após o aquecimento. Esta queda foi associada com uma diminuição no peso do testículo que persistiu após a concentração de espermatozoides no fluido da rete testis voltar ao normal. Outro estudo mostrou que banhar os testículos de camundongos em água a 40°C por 20 minutos resultou em diminuição da proliferação de células germinativas e diminuição da testosterona circulante (Rizzoto et al., 2020). Em alguns estudos, (Wildeus & Entwistle, 1983; Kastelic et al., 1996) ao analisar o esperma no epidídimo após procedimentos de aquecimento escrotal, apresentavam morfologia anormais quando coletados logo após o aquecimento. Assim como foi relatado por Loughlin et al., (1991), que banhos quentes intermitentes em ratos machos por 30 minutos, podem causar estresse térmico nos testículos, reduzindo significativamente a fertilidade e apresentaram alterações histológicas testiculares que incluíram diminuição do diâmetro tubular, adelgaçamento da membrana basal e diminuição da espermatogênese. Porém, após 10 semanas da conclusão do tratamento estavam recuperados.

3. Hipertermia e Nanobiotecnologia

A hipertermia (HPT), já está comprovada como uma terapia minimamente invasiva, sendo uma opção próspera para terapias convencionais contra alguns tipos de câncer (Pinel et al. 2019). O tratamento com HPT envolve uma exposição a temperatura elevada (na faixa de 41 a 46 °C) em comparação com a temperatura normal do corpo (37 °C), por um período de tempo específico, induzindo assim um dano celular eficaz por choque térmico (Zhao et al., 2006). Essas temperaturas podem ser alcançadas por diferentes fontes de energia, incluindo campos magnéticos, lasers, pulsos de radiofrequência e ultrassom (Fang & Chen, 2013). O choque térmico causado por essas técnicas de modulação de temperatura modifica os processos celulares, alterando assim a estrutura e função das proteínas, eventualmente levando à destruição celular e apoptose (morte celular)

(Kumar & Mohammad, 2011). A hipertermia acima de 46 °C pode levar à morte celular em minutos (Deatsch & Evans, 2014), evento conhecido como termoablação (Kumar & Mohammad, 2011).

Existem diversas técnicas de hipertermia onde uma fonte de calor diferente é utilizada em cada uma, a luz laser (Fotohipertermia) é a fonte mais utilizada. A luz laser é altamente confiável neste tipo de hipertermia devido às suas características de monocromaticidade (único comprimento de onda), coerência (ondas idênticas e estão na mesma fase) e colimação (possui pouca divergência e a luz consegue propagar-se em grandes distâncias sem perder potência) (Khalid, 2016), utilizada na região do infravermelho próximo (ou NIR) possuindo uma penetração profunda no tecido biológico e baixíssima absorção por molécula de água e hemoglobina na região aplicada (Jacques, 2013).

A fotohipertermia tem a capacidade de converter energia luminosa em calor, afim de causar danos às células malignas, como câncer ou bactérias (Chanchala et al., 2013). A nanobiotecnologia vem como uma nova forma de tornar essa técnica mais eficaz, quando utilizadas em conjuntos com nanopartículas, a fonte de calor (as nanopartículas) é concentrada no local em que foram aplicadas, absorvendo a luz incidente e liberando o calor com capacidade fototérmica (Li & Gu, 2010; Fang & Chen, 2013). E para essa geração de calor é necessário o conhecimento propriedades estruturais (tamanho, forma, composição, funcionalização da superfície), bem como das propriedades magnéticas (magnetização de saturação, suscetibilidade magnética, anisotropia magnética) das NPs (Chanchala et al., 2013).

3.1. Nanomateriais e Nanobiotecnologia

A nanotecnologia vem gerando diversas mudanças nas formas de utilização de alguns materiais, com a sua capacidade de síntese de materiais em nano escala. A vantagem é que esses materiais podem ser mais resistentes, leves e programáveis, têm custos de produção mais baixos e podem ter usos mais específicos (Patel et al., 2021). A nanotecnologia tem sido considerada a sexta tecnologia verdadeiramente revolucionária introduzida no mundo moderno no século XXI (Nset, 2001). É uma tecnologia em desenvolvimento que deve afetar diversos campos, como tratamento e proteção ambiental (Komatsu et al., 2008). Tem sido usado na medicina para terapia de entrega de drogas e também para desenvolver tratamentos para várias doenças. Os avanços na nanotecnologia levam a importantes desenvolvimentos nesses campos (Faraji & Wipf, 2009). As principais propriedades dos nanomateriais são tamanho pequeno, grande área superficial, efeito direcionado, versatilidade e estabilidade, que favorecem seu uso na medicina. Todos esses fatores juntos também explicam o crescente interesse em seu uso em ensaios clínicos (Barkalina et al., 2014). Esses materiais podem ter diferentes propriedades químicas, pois quanto menor o material,

maior a proporção de átomos em sua superfície, tornando-os mais reativos do que partículas maiores (Lanone & Boczowski, 2006). As propriedades físicas e químicas são muito importantes para alcançar efeitos biológicos e, portanto, vários aspectos como propriedades físico-químicas do material, composição química, tamanho e forma, aglomeração de nanopartículas e fatores externos podem influenciar o processo de sua internalização pelas células (Oberdorster et al., 2005; Unfried et al., 2007; Arora et al., 2012). Nanomateriais podem possuir formas diversas, como nano objetos (nanopartículas e nanotubos de carbono), materiais com poros de dimensões nanométricas (filmes porosos) e outros tipos de materiais com estruturas em nanoescala variadas.

Nanopartículas

Nanopartículas são uma categoria de nanomateriais e possuem três dimensões na escala nanométrica. Esses materiais podem ser personalizados e possuem propriedades muito específicas (incluindo de superfície e propriedades químicas, forma e tamanho). As nanopartículas podem ser baseadas em metais (ouro, prata e óxidos de metais reativos, como dióxido de titânio) e também podem ser compostos combinados com outros nanomateriais. Esses nanomateriais possuem propriedades únicas que fornecem novas propriedades elétricas, catalíticas, magnéticas, mecânicas, térmicas ou de imagem que são altamente desejáveis (Lanone & Boczowski, 2006) atualmente, as nanopartículas metálicas são as mais estudadas e as que têm despertado mais interesse entre os pesquisadores (Gong et al., 2007). As nanopartículas têm a capacidade de atravessar facilmente membranas biológicas, pequenos capilares e paredes epiteliais, o que permite a movimentação no corpo, podendo ser direcionadas a diversos tecidos, sabe-se que algumas nanopartículas podem passar pelo trato gastrointestinal e serem excretadas nas fezes e na urina (Oberdorster et al., 2005). Elas também podem atravessar barreiras biológicas existentes, como as barreiras hematoencefálica e hematotesticular (De Jong & Borm, 2008; Oberdorster, 2010), podem ser absorvidas pela barreira gastrointestinal e entrar no sistema circulatório (Oberdorster et al., 2005). Uma vez que as nanopartículas tenham entrado no corpo, elas se movem através do sistema linfático e circulatório para vários órgãos, tecidos e células (Fischer & Chan, 2007; Panyala et al., 2008). Portanto, é natural que possam afetar fisiologicamente qualquer célula do organismo (Brooking et al., 2001). Órgãos como fígado e baço podem ser os principais alvos para o acúmulo de nanomateriais, por conterem muitas células fagocitárias e por serem mais sensíveis ao estresse oxidativo, que esses nanomateriais podem produzir, como radicais livres que gerem espécies reativas de oxigênio (ROS), inflamação e, finalmente, parada do ciclo celular ou morte celular (Ahamed et al., 2010; Asharani et al., 2009).

3.2 Hipertermia mediada por nanopartícula como forma de causar esterilidade em animais machos

Pitsillides et al., (2003) foram pioneiros no uso da fotohipertermia mediado por nanopartículas, combinando nanopartículas de látex dopadas com óxido de ferro (SPIONs) com propriedades superparamagnéticas e nanopartículas de ouro ligadas a anticorpos específicos, resultando em uma técnica não invasiva, eficaz e que não agride as células saudáveis. No entanto, a resposta óptica global é determinada pela combinação de nanopartículas com tecidos biológicos, e as propriedades dos tecidos devem ser compreendidas, pois os tecidos biológicos possuem várias estruturas, como: células, vasos sanguíneos e espaço intersticial, que podem afetar a ótica. Propriedades do tecido fazem com que a absorção geral e a dispersão sejam diferentes e o sucesso da fotohipertermia depende dos nanomateriais aplicados, bem como das propriedades de absorção (Chichel et al., 2007; Day et al., 2009).

A janela de comprimento de onda entre o visível e o infravermelho que pode variar entre 700 e 1100 nm, chamada de janela terapêutica ou janela do infravermelho próximo (NIR) também é um ponto a ser levado em consideração. Esta janela está relacionada com a distância entre o absorvedor e o comprimento de onda NIR em meios biológicos (Qin & Bischof, 2012). Os agentes fototérmicos mais comumente usados são as nanopartículas magnéticas; nanotubos de carbono; nanomateriais de ouro, nanobastões e nanoshells (Li & Gu, 2010; Fang & Chen, 2013). Em hipertermias baseadas em nanomateriais de ouro, a excitação das nanopartículas geralmente é feita usando uma fonte de luz laser infravermelho próximo, onde o calor é gerado quando as partículas absorvem a luz e aumentam a temperatura (Day et al., 2009; Kennedy et al., 2011). As NPMs são, em geral, revestidas com um material biocompatível, evitando aglomeração e aumentando a estabilidade em meios fisiológicos (Laurent et al., 2010; Gupta & Gupta, 2005).

Como dito anteriormente, para que a espermatogênese ocorra de maneira adequada, é necessário que a temperatura dos testículos esteja abaixo da temperatura corporal. Quando expostos a uma fonte de calor local aplicada diretamente aos testículos, verifica-se que a produção de espermatozoides é afetada, levando a uma alteração dos estágios da espermatogênese (Fahim et al., 1975). Os grandes desafios da Fotohipertermia estão ligados a profundidade de penetração da luz infravermelha próxima no tecido (Cervadoro et al., 2013), além de identificar as melhores concentrações de nanopartículas, distribuições da mesma no organismo e parâmetros de fonte de excitação para que a técnica tenha êxito (Rizzoto et al. 2020).

Li e colaboradores (2013), mostraram que a injeção testicular *in situ* de nanobastões de ouro com irradiação de infravermelho próximo em camundongos, afetou negativamente a fertilidade dos animais no curto prazo. Em um tratamento de hipertermia mais baixa, a morfologia

dos testículos e túbulos seminíferos foi parcialmente prejudicada e os índices de fertilidade diminuíram para aproximadamente 10% no dia 7, depois se recuperaram para 50% no dia 60. Em um segundo tratamento de hipertermia mais alto, a morfologia dos testículos e os túbulos seminíferos são totalmente destruídos e os índices de fertilidade diminuíram para 0 no dia 7. Os resultados desse trabalho indicam um grande potencial de nanomateriais para contracepção masculina. Outro estudo de Ding e colaboradores (2021), demonstrou que a injeção testicular de nanopartículas de óxido de ferro (IONPs) revestidas com PEG (PEG@Fe₃O₄-50) e aplicação de campo magnético alternado (FMA) poderia alcançar contracepção masculina controlável, eles propõem uma abordagem não invasiva e direcionada para a contracepção masculina via administração intravenosa. Porém as propriedades magnéticas e o direcionamento dos testes de IONPs provaram ser muito afetados por sua química de superfície e tamanho de partícula. E em uma nova abordagem de administração sistêmica, os IONPs estabilizados com ácido cítrico com tamanho de 100 nm (CA@Fe₃O₄-100) mostraram ser o melhor termoagente para realizar a contracepção não invasiva pelo método sugerido.

Segundo Jivago e colaboradores (2021), a aplicação localizada de nanopartículas magnéticas nos testículos de ratos Wistar e realização de magneto-hipertermia (MNH) em um período a curto prazo (56 dias), tem se mostrado um método altamente eficaz causando degeneração progressiva dos túbulos seminíferos com posterior substituição de tecido estromal parenquimatoso e atrofia gonadal, sugerindo um processo irreversível com mínimos efeitos colaterais na saúde geral do animal. Considerando os achados, Lima (2019) experimentou a “castração-fototérmica” que é uma nova alternativa de esterilização para machos, tendo uma redução de custos, utilizando injeção intratesticular de nanopartículas magnéticas e aplicando irradiação não-ionizante de LED na faixa do infravermelho próximo, resultando em geração de calor local. Este método também mostrou causar danos à espermatogênese no curto prazo (56 dias), sem efeitos colaterais graves, porém o efeito não foi completo.

A geração de calor gerado por esses nanomateriais, principalmente em relação ao estresse gerado, pode levar uma perda da capacidade de modular o fluxo sanguíneo, que tem como função dissipar o calor (Rizzoto et al., 2020). Há um paradigma de que o microambiente testicular opera no limite da hipóxia (Bergh et al., 2001) e à medida que a temperatura testicular aumenta, o metabolismo testicular e a demanda de oxigênio aumentam, mas sem alteração no fluxo sanguíneo testicular (Hamilton et al., 2016; Paul et al., 2009). Porém marcadores de hipóxia foram detectados após exposição a tratamentos de hipertermia (Paul et al., 2009; Verratti et al., 2008), corroborando a afirmação de que os efeitos deletérios da hipertermia testicular são mediados pela hipóxia. Em condições isquêmicas, devido ao fluxo sanguíneo, a uma obstrução testicular (por exemplo, varicocele e torção testicular) ou hipóxia hipobárica, alguns estudos (Ates et al., 2015; Damsgaard

et al., 2016; Reyes et al., 2012; Verratti et al., 2008) demonstraram que a espermatogênese e a fertilidade foram prejudicadas, de forma semelhante ao que ocorre após o aquecimento testicular.

3.3 Efeitos biológicos da hipertermia mediada por nanopartículas

A consequência da cascata patológica associada à produção de ROS, são pontos pouco explorados sobre essa técnica (Rizzoto et al., 2020). Além disso, as células podem tolerar níveis moderados de oxidação, aumentando a expressão gênica dos sistemas de defesa redutores, garantindo um equilíbrio oxidação / antioxidante (Whillier, et al., 2011). Contudo, quando a estabilização não pode ser atingida, devido a danos enzimáticos, limitação de substratos ou se a geração das ROS ocorre de maneira excessiva, resultando no estresse oxidativo (Birben et al., 2002; Yoshikawa et al., 2002; Whillier, et al., 2011) nessas situações o desequilíbrio de produção de ROS levam à morte celular (Noori, 2012). Em nível de DNA, as ROS em excesso afetam na degradação de bases, a quebra de fitas simples e duplas de DNA, mudanças nas ligações das purinas, das pirimidinas e dos açúcares, mutações, deleções ou translocações e ligações cruzadas com proteínas (Birben et al., 2002). Os mecanismos de geração dos agentes oxidantes são comumente encontrados em mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma e podem ter suporte por íons de ferro e cobre (Koury & Donangelo, 2003). Sob condições fisiológicas normais, os espermatozoides produzem níveis basais de ROS para garantir suas funções fisiológicas, como capacitação, hiperativação, reação acrossômica e fertilização (Agarwal & Saleh, 2002; Abshenas et al., 2011). Em contraste, as membranas desses gametas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, tornando-os mais suscetíveis à peroxidação lipídica na presença de altos níveis de oxidantes (Abshenas et al., 2011; Merve & Elmas, 2016).

Devido a esse fato, o estresse oxidativo é apontado como um mediador da disfunção espermática e, posteriormente, da infertilidade masculina (Agarwal & Saleh, 2002; Merve & Elmas, 2016), o que pode causar perda de motilidade e enzimas intracelulares nesses gametas, além de lesões no DNA (Valença & Guerra, 2007). A produção excessiva de oxidantes pode ser mediada por choque térmico, resultando em danos severos às células da linhagem espermatogênica, mesmo após uma curta exposição ao calor (Ishii et al., 2005). Assim, o estresse oxidativo ameaça a capacidade reprodutiva dos animais (Andrade et al., 2010), pois um desequilíbrio na produção de oxidantes e antioxidantes aparece como um denominador comum em vários processos patológicos que resultam em dano tecidual e morte celular (Turrens, 2003).

4. Biologia molecular como ferramenta de avaliação

Com o desenvolvimento de biotecnologias moleculares, novas oportunidades estão disponíveis para caracterizar a expressão gênica e identificar as principais respostas celulares ao

estresse térmico (Renaudeau et al., 2012). Alguns estudos analisaram a interrupção da espermatogênese por choque térmico, onde micro arranjos de genes foram empregadas para monitorar a expressão gênica nos testículos. Esses possuem diversos elementos genéticos em cada uma, geralmente incluindo uma variedade de genes induzidos por estresse e outros que codificam proteínas que regulam o ciclo celular e a morte celular. Esses genes são de alto interesse toxicológico e podem fornecer informações úteis sobre como os agentes ambientais regulam ou interrompem redes inteiras de expressão gênica (Rockett & Dix, 1999; 2000).

A expressão gênica é resultado de vários mecanismos altamente regulados que controlam as taxas de transcrição, de reciclagem de RNA mensageiro (mRNA), de tradução, de reciclagem de proteínas, de endereçamento e ativação de proteínas, culminando na variação de proteínas funcionais modificando a fisiologia celular (Figura 2).

A regulação, em qualquer uma das etapas do processo, pode levar a uma expressão gênica diferencial que acarretará em variações fenotípicas entre os indivíduos (Lehninger et al., 2000). Genes diferencialmente expressos para diversas características vêm sendo amplamente utilizados como ferramenta em estudos que visam relacionar a expressão gênica a fenótipos importantes, e sua compreensão abre então uma porta para a possibilidade de identificação de importantes alterações que acontecem no nível de RNA. Contudo, a análise dos transcritos é prejudicada pela sua susceptibilidade à degradação e pela variação de associação entre a quantidade de RNA e proteína presentes nas amostras (Chen et al., 2002; Tian et al., 2004; Dhingra et al., 2005; Rogers et al., 2008).

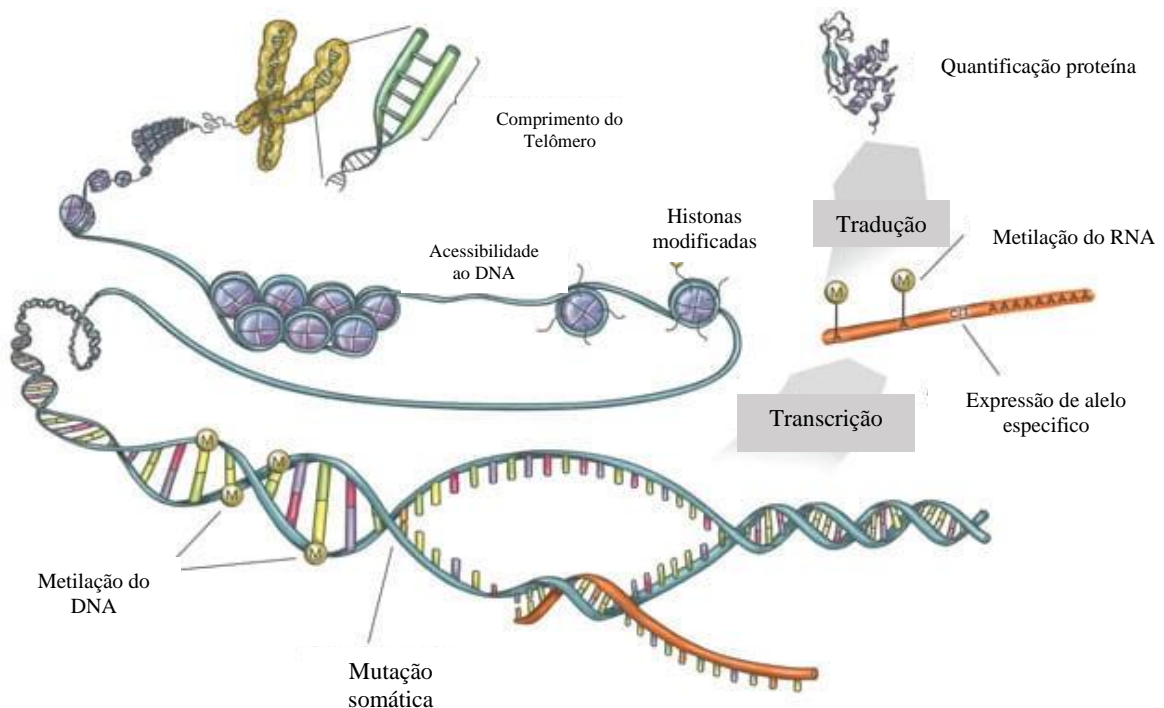


Figura 2. Mapa de expressão gênica. Adaptado de: Alzforum, Jessica Shugart, Uc Santa Cruz – 23 outubro, 2017.

Normalmente em eucariotos, a molécula de RNA é uma fita simples, podendo ser encontrada tanto no núcleo, local em que é sintetizado, quanto no citoplasma, onde tem lugar a síntese proteica (Lehninger, 2004). Todos os RNAs são sintetizados por um processo conhecido como transcrição. Essa polimerização é feita com base na sequência de nucleotídeos de apenas uma das fitas do DNA, que é denominada como fita molde e que se apresenta na orientação 3' → 5' para a sua transcrição (Pierce, 2011). A compreensão dos processos que regulam a transcrição dos genes poderá facilitar uma interpretação funcional de determinados genes (Wang et al., 2009).

Diferentes tipos de RNA estão presentes nas células, e alguns deles são os mensageiros (mRNA), os ribossômicos (rRNA), os transportadores (tRNA) e os micro RNAs. O mRNA conduz a informação genética apresentada na cadeia de DNA aos ribossomos. O tRNA identifica essa informação e transporta as moléculas de aminoácidos até os ribossomos, organelas compostas por rRNA e que dão subsídio molecular para a síntese de polipeptídios (Lehninger, 2004).

A expressão de genes nucleares finaliza com proteínas traduzidas pelos ribossomos no citoplasma, com modificações pós-traducionais, como glicosilação, metilação, especialmente realizadas em retículo endoplasmático e complexo de Golgi, endereçadas as organelas corretas, e ativadas por reguladores alostéricos. Nesse contexto, as técnicas de identificação e quantificação de mRNA são integradas às análises proteômicas para compreensão de mecanismos biológicos numa abordagem mais ampla. A análise proteômica pode fornecer informações sobre as modificações pós-traducionais sofridas por essas moléculas, além de identificar proteínas presentes em situações contrastantes em estudo (Salvato & Carvalho, 2010).

Atualmente existe uma gama de técnicas moleculares para quantificação da expressão gênica e seus mecanismos de regulação. A técnica de microarranjos, por exemplo, ocasionou uma revolução nas formas de análises de expressão gênica (Rosa, 2007). Essa técnica permite a determinação, respectivamente, dos níveis de expressão de milhares de genes, porém está limitada a quantificar genes pré-determinados e conhecidos. O princípio da técnica consiste em uma coleção de milhares de pontos (*spots*) com sondas (DNA complementar (cDNA) ou oligonucleotídeos) de sequências complementares a molécula alvo correspondente (Hegde et al., 2000). As sondas se hibridizam com as moléculas alvos de cDNA previamente marcadas com fluoróforos e são detectadas por um scanner de fluorescência. O computador então é utilizado para captar e armazenar os dados que serão convertidos em resultados quantitativos de expressão gênica. (Hegde et al., 2000). Contudo, essa técnica traz consigo uma qualidade de dados de expressão gênica com uma grande variação dependendo muito de qual plataforma e que procedimentos foram utilizados (Morey et al., 2006).

As tecnologias de sequenciamento em larga escala, ou sequenciamento de próxima geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), também trouxeram grandes mudanças nos estudos de

genômica e nas diversas variações das “ômicas” existentes atualmente. Uma das técnicas mais utilizadas é o sequenciamento *Illumina*, que é caracterizada por produzir milhões de pequenas sequências (60 pb) com custo reduzido por base sequenciada. Essa técnica tem sido bastante utilizada para transcrito, especialmente em espécies que já possuem genoma sequenciado, sendo responsável pela grande quantidade de informações geradas e utilizadas atualmente em pesquisas e diagnósticos (Bai et al., 2012). Essa técnica de NGS surgiu como uma ferramenta de altíssima credibilidade para estudos de transcrito, levando em conta a sua precisão na quantificação de transcritos (WANG et al., 2009). Já o estudo de genes diferencialmente expressos pode ser empregado para distinção molecular de modificações fenotípicas (Chitwood et al., 2013; McCabe et al., 2012; Scholey et al., 2013).

Dentre as grandes variedades de técnicas que utilizam NGS, o sequenciamento de moléculas de RNA (RNA-Seq) demonstra uma grande versatilidade em comparação com o microarranjo, ferramenta de análise de transcritomas largamente utilizada até então (Mortazavi et al., 2008). A técnica de RNA-Seq, também chamada de sequenciamento *shotgun* do transcrito completo, possibilita obtenção do perfil de expressão dos genes e a identificação de novos transcritos, regiões regulatórias e eventos de processamento (*splicing*) alternativos com certa relevância em sua sensibilidade e precisão. Ou seja, o sequenciamento de próxima geração é utilizado para identificar genes expressos de forma qualitativa e quantitativa, partindo de amostra biológica, representando determinado tecido/órgão, em momento do ciclo de vida, em resposta a determinada condição ambiental, hormonal ou fisiológica (Mortazavi et al., 2008). Comparativamente, o RNA-Seq permite maior cobertura, com custo bem mais baixo de sequenciamento e processamento de dados, facilitando a identificação de genes com expressão diferencial (Oshlack et al., 2010; Nookaew et al., 2012), em que esse é utilizado para analisar o transcrito celular em mudança contínua, que por sua vez, além de quantificar a expressão de todos os genes em uma célula em um dado momento, fornece uma medida muito mais precisa de níveis de transcritos e suas isoformas (Wang, 2009).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (qPCR ou qRT-PCR), por sua vez surgiu como uma variação da PCR atrelada a capacidade de acompanhamento da amplificação em tempo real, mostrando-se altamente específica, sensível e frequentemente utilizada para a validação dos resultados quantitativos de expressão gênica adquiridos a partir da análise de microarranjo de expressão e RNA-Seq (Morey et al., 2006; Robinson et al., 2007; Fonseca et al., 2015; Fonseca et al., 2017; Malheiros et al., 2018).

A qPCR é um desdobramento da técnica de PCR convencional, comumente utilizada para quantificar DNA ou RNA em uma amostra. Enquanto na PCR convencional a análise só é realizada após todos os ciclos estarem completos (end-point), na qPCR em tempo real, o acúmulo

do produto de amplificação é mensurado a cada ciclo em tempo real, à medida que a reação avança. Nesse caso, a amplificação e a detecção do DNA ocorrem simultaneamente em sistema fechado, eliminando etapa de eletroforese e fotodocumentação (Sacchi, 2007), conferindo alta sensibilidade e baixo risco de contaminação, já que não há o manuseio dos produtos amplificados (Postollec et al., 2011). Devido a eliminação destas etapas, os resultados são mais rápidos e confiáveis na PCR em tempo real quando comparada à PCR convencional (Marra, 2012). A qPCR vem sendo aceita em diversos diagnósticos moleculares realizados em laboratórios de pesquisa e de análise clínica, gerando resultados precisos, rápidos e/ou quantitativos (Ferraz, 2009).

Essa técnica necessita de uma plataforma de instrumentação que possua um termociclador com sistema ótico para excitação e coleta da emissão de fluorescência, e um computador com um software para a captação dos dados e análise final da reação emitida pela máquina (Novais & Alves, 2004). E essa detecção em tempo real dos produtos da qPCR só é possível devido à utilização de uma molécula fluorescente, a qual intensifica a emissão de fluorescência logo que aumenta a quantidade do produto a cada novo ciclo. As químicas de fluorescência comumente utilizadas incluem corantes que se ligam a moléculas de dupla fita (*SYBR Green*) ou sondas de sequências específicas marcadas com fluorescência (*TaqMan*) (Life technologies, 2016). A emissão desses compostos fluorescentes suscita um sinal que vai aumentando em proporção direta à quantidade de produto da PCR (Postollec et al., 2011). Os valores adquiridos pela fluorescência são registrados em um dispositivo de armazenamento no decorrer de cada ciclo e simbolizam a quantidade de produto amplificado, formando um gráfico de amplificação (Novais & Alves, 2004). Desta forma, a mudança na fluorescência ao longo dos ciclos é percebida e captada por termocicladores específicos e utilizada para calcular a quantidade de amplicon produzido (Postollec et al., 2011).

A curva de amplificação ocorre em três fases (Figura 3). A fase denominada de Lag ou linear basal, a fase Log ou exponencial e a fase platô (Tichopad, 2003). A fase Lag ocorre normalmente entre os ciclos 1 a 12, quando as amplificações podem não ser totalmente específicas, a quantidade de fragmentos amplificados aumenta, mas chega a dobrar a cada ciclo, e a emissão de fluorescência, proporcional à quantidade de DNA, ainda não é suficiente para ser detectada. Na fase Log, que ocorre normalmente entre os ciclos 12 e 35, o sinal de fluorescência é corretamente detectado, mostrando amplificação exponencial, ou seja, dobrando o produto de qPCR a cada ciclo. Na última etapa observa-se uma redução no aumento e, por fim, um platô das amplificações, ambos resultantes de excesso de molde em relação a quantidade de oligonucleótidos, geralmente ocorrendo entre os ciclos 35 ao ciclo 40 (Derveaux et al., 2010; Vanguilder et al., 2008). Os produtos de qPCR inicialmente estão em baixa quantidade para gerar fluorescência detectável. O momento que a fluorescência passa a ser percebida (limite de detecção

ou dez vezes o ruído de fundo) é o ciclo denominado de *Cycle Threshold* (CT), na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial. O CT apresenta alta correlação com a quantidade inicial de amostra, que por sua vez, possibilita a quantificação de genes ou transcritos detectados pela fluorescência emitida (Postollec et al., 2011).

Existem duas metodologias de qPCR diferentes: a quantificação absoluta e a quantificação relativa. Na primeira, há uma determinação do número de cópias do gene ou transcrito de interesse fundamentado numa curva padrão gerada como CTs em função de quantidade conhecida em diluição seriada. Enquanto que o segundo método apresenta comparações de quantificações de diferentes genes, tendo no mínimo um gene de interesse e um gene controle, também chamado de gene referência, ou ainda gene constitutivo. Desse modo, a quantificação relativa é observada como proporções de gene (s) de interesse normalizadas com gene (s) referência (Life technologies, 2016). Do mesmo modo, um tratamento biológico (determinado órgão, característica histológica, indivíduo doente, tratamento hormonal, exposição ambiental, etc) é comparado com o controle (outro órgão, padrão histológico, indivíduo saudável, sem tratamento hormonal ou exposição ambiental, etc). Ou seja, a quantificação relativa é uma proporção entre a expressão gênica do tratamento relativizada com a expressão gênica do controle. A quantificação relativa é então dependente de escolha adequada dos genes referência, ou constitutivos, para normalizar a expressão dos genes alvo, sendo de suma importância para refletir verdadeiramente o processo biológico (Robinson et al., 2007).

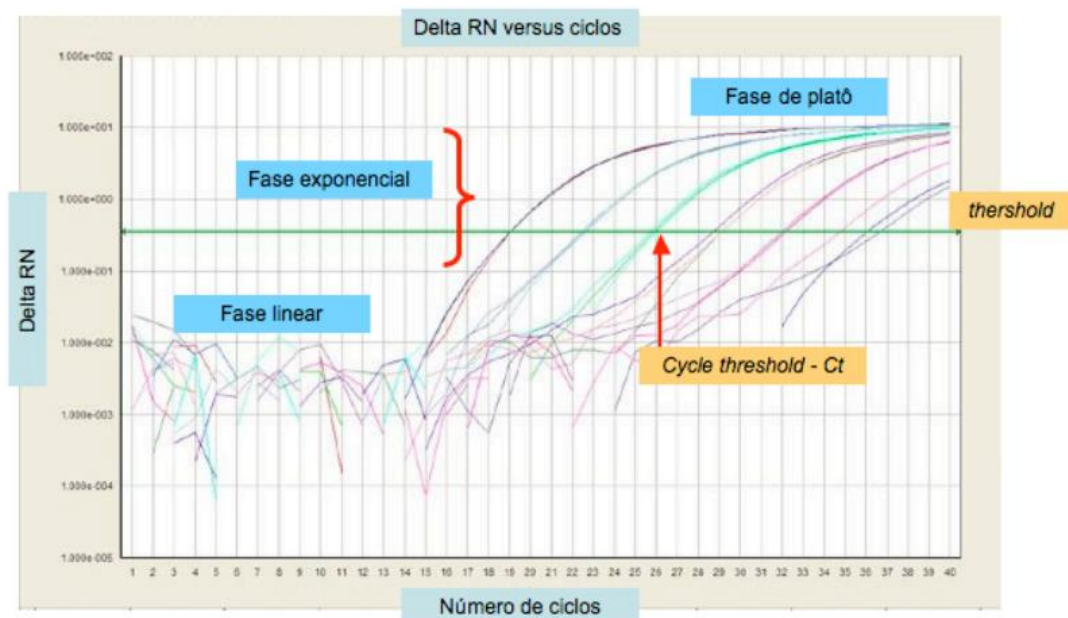


Figura 3. Curva de amplificação da qPCR em Tempo Real. CT – Cycle Threshold, Curva dividida em 3 fases principais: Fase Lag ou fase Linear, Fase Log ou fase exponencial e Fase platô. GOMES, 2011.

4.1 Genes relacionados ao estresse térmico em testículos

Genes com uma função de adaptação celular em animais são considerados potenciais biomarcadores para entender os mecanismos de adaptação ao estresse (Collier et al., 2012). Os genes mais clássicos para análises sobre o estresse térmico, são os da proteína de choque térmico (HSP), genes apoptóticos, outras citocinas e receptores do tipo toll (TLR2 e TLR4). Genes, como superóxido dismutase (SOD), sintase de óxido nítrico (NOS), receptor de hormônio tireoidiano (THR) e receptor de prolactina (PRLR), foram associados à termotolerância em animais ruminantes (Collier et al., 2012). Quando levado em consideração os danos que são gerados por ROS, que estão geralmente associados à apoptose, podem ser detectados por marcadores específicos (Berenguer et al., 2008), com por exemplo, as proteínas BAX e BCL2 que são moléculas de sinalização apoptótica. Um aumento nos níveis de BAX e/ou uma diminuição nos níveis de BCL2 são conhecidos por promover a permeabilização da membrana mitocondrial levando à liberação de fatores pró-apoptóticos (Crompton, 2000).

Para análise de expressão gênica relacionada ao estresse térmico em testículos de ratos, fizemos um levantamento de alguns genes que foram estudados com relação ao estresse térmico e ROS e selecionamos alguns para serem estudados. Como o Regulador de fissão mitocondrial 1 (*Mtfr1*), localizado no cromossomo 3 A3 em camundongo, sendo uma proteína mitocondrial contendo uma região curta rica em poliprolina anteriormente chamada CHPPR (proteína condrocite com uma região de poliprolina (Tonachini et al., 2002). Essa proteína está associada à membrana mitocondrial interna e induz a fissão mitocondrial, de maneira sequência-específica, quando sua expressão é dirigida por um promotor de citomegalovírus em vários tipos de células de mamíferos. Segundo Monticone et al., (2007) o gene *Mtfr1* é expresso em diversos tipos celulares e exibe o mais alto nível de expressão em testículos pubertal e adultos e, em particular, em espermátides e células de Leydig. *Mtfr1* é proeminente nos testículos e sugerem que este gene está envolvido na regulação da atividade antioxidante na gônada masculina.

O gene TATA box-binding protein related factor 2 (*Trf2*), segundo WEI et al. (2013), é expresso em um nível muito alto no testículo e media como fator de transcrição de genes específicos, necessários para a diferenciação de células germinativas masculinas, como proteínas de transição 1 e 2, protaminas 1 e 2, proteína de choque térmico, cápsula mitocondrial selenoproteína, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), componente fibroso de esperma, dentre outros (Martianov et al., 2001; Zhang et al., 2001). Assim, o *Trf2* atua como um interruptor mestre que rege a diferenciação de células germinativas masculinas (WEI et al., 2013). Segundo Kimmins et al., (2004), a expressão de *Trf2* é maior no testículo do que em outros tecidos, e sua expressão controla a transcrição de genes testiculares específicos essenciais para a espermatogênese. Estudos com camundongos machos deficientes em *Trf2* apresentaram

esterilidade, devido a parada completa da espermatogênese (Martianov et al., 2001; Zhang et al., 2001), também foi observado uma superprodução de espécies reativas de oxigênio, após a torção-detorção testicular, surgindo danos na espermatogênese testicular pela baixa regulação da expressão *Trf2* (Wei et al., 2013).

O gene da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) desempenha um papel fundamental na regulação aguda da síntese de hormônios esteróides, atuando na entrega de colesterol para a membrana mitocondrial interna, aumentando a conversão do colesterol em pregnenolona (Norman et al., 2003). Essa proteína permite a clivagem do colesterol em pregnenolona, mediando o transporte do colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna. Este gene é de suma importância na via esteroidogênica, atuando na produção de testosterona pelas células de Leydig e de suma relevância no suporte da espermatogênese e integridade testicular (BOZKAYA et al., 2017). Diversos estudos demonstraram que um aumento na expressão da proteína STAR está ligado a um aumento na esteroidogênese (Stocco & Clark, 1996; Stocco et al., 2017).

O gene Claudin 11 (CLDN11) é um membro da família claudina. Claudinas são proteínas integrais de membrana e componentes de cadeias de junções oclusivas (Dym & Fawcett., 1970). Os filamentos de junções oclusivas servem como uma barreira física para impedir que solutos e água passem livremente pelo espaço entre as células epiteliais ou endoteliais, desempenhando papéis críticos na manutenção da polaridade celular e nas transduções de sinal (Dym & Fawcett., 1970). Esta é uma proteína de junção oclusiva na barreira hematotesticular humana, e a interrupção desta barreira está relacionada a uma disfunção desse gene (Gey, 2003). Foi relatada uma regulação positiva da expressão de CLDN11 em células de hepatoma por ROS (Jhun et al., 2022 & Zhang et al., 2013). Curiosamente, em roedores, o estresse oxidativo testicular induzido por radiação local aumenta os níveis de transcrição de CLDN11 nos testículos. Zhang et al., (2013) relata que o papel do CLDN11, no estresse oxidativo testicular local induzido por radiação diminuiu o nível de expressão de mRNA de inibina beta, aumentou o FSH sérico, danificou as células de Sertoli e elevou a expressão de CLDN11 no tecido testicular. O aumento da CLDN11 e do FSH sérico pode retardar a restituição cíclica da barreira hematotesticular e reduzir o número de espermátócitos meióticos no epitélio seminífero, o que conseqüentemente leva à infertilidade masculina (Zhang et al., 2013).

Embora as respostas fisiológicas e celulares ao tratamento térmico dos testículos tenham sido bem documentadas, a expressão gênica após o aumento da temperatura escrotal foi pouco descrita, e os mecanismos moleculares pelos quais essas respostas são direcionadas permanecem amplamente desconhecidos quando analisados em ratos. Nessa perspectiva este estudo vem com propósito de iniciar uma verificação e melhor entendimento em relação as alterações moleculares

causadas pelo procedimento de fotohipertermia (FHT) em testículos de ratos Wistar, e tentar explicar melhor como ocorre a infertilidade por esse procedimento.

Justificativa

A lei federal 13.426/2017 determina no Art. 1º que o controle de natalidade de cães e gatos em todo o território nacional brasileiro deve ser regido mediante esterilização permanente por cirurgia, ou por outro procedimento que garanta eficiência, segurança e bem-estar ao animal. As castrações são algumas das alternativas de controlar a natalidade dos animais errantes, a castração cirúrgica por sua vez, não atende a demanda da população de animais, principalmente animais em situação de rua e ferais, e alternativas não cirúrgicas como o uso de quimioesterilizantes inorgânicos, apresentam efeitos colaterais, em alguns casos mais graves que as castrações cirúrgicas, e não há relatos que comprovem a eficácia do método. Desse modo é necessário o desenvolvimento de novos métodos alternativos. Estudos mostram a fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas como nova alternativa ao método de castração podendo ser uma solução viável devido à sua influência na temperatura do órgão e sua praticidade, segundo Rockett et al., (2001), mudanças na expressão gênica em testículos de camundongos após choque térmico a 43 °C por 20 min também foram observadas além de apresentar efeitos adversos nas células espermatogênicas e nas células auxiliares. Porém, estudos sobre mudanças na expressão gênica de testículos após o procedimento de fotohipertermia (FHT) aplicada a testículos de ratos Wistar não foram investigados e se faz necessário para o entendimento do mecanismo de ação do procedimento.

Objetivos

5.1 – Objetivo geral

Analisar alterações moleculares causadas pelo procedimento de fotohipertermia (FHT) mediada por nanopartículas em testículos de ratos Wistar.

5.2 – Objetivo específico

Avaliar marcadores moleculares encontrados no tecido testicular dos ratos submetidos à FHT testicular mediada por nanopartículas magnéticas;

Avaliar a histopatologia no tecido testicular dos ratos submetidos à FHT testicular mediada por nanopartículas magnéticas;

Materiais e Métodos

6.1 – Comitê de ética

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), SEI n.º 23106.068761/2022-08.

6.2 – Nanopartícula magnética

Foi utilizada uma nanopartícula magnética (NPM) de ferrita de Manganês funcionalizada com citrato ($Mn_{0.75}Fe_{2.25}O_4$ -Citrato +), sintetizada no Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica, Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás na forma de um fluido magnético.

6.3 – Animais

Utilizamos 16 ratos Wistar machos (N=32 testículos), com aproximadamente 12 semanas de vida, mantidos no biotério da Universidade de Brasília, alojados em gaiolas a temperatura ambiente sob um ciclo claro/escuro de 12h com livre acesso a comida e água.

6.4 – Desenho experimental

Os animais foram divididos de acordo com o tratamento realizado. Um total de 12 animais tiveram ambos os testículos submetidos a fotohipertermia (FHT). Para isso, foi feita injeção intratesticular do fluido da nanopartícula magnética, (0,15µL em 3 pontos na parte cranial, média e caudal de cada testículo) e imediatamente passaram pela incidência de luz do LED, sendo 2 LED's um superior e um inferior, para abranger todo o testículo (Figura 4), para que ocorresse o processo de fotohipertermia com duração de 15 minutos (Figura 4). Esses animais passaram por uma subdivisão com relação ao dia da eutanásia, sendo formados os subgrupos FHT - 24h, FHT - 72h e FHT - 7D (N=4 animais por grupo), nos quais os animais foram eutanasiados após 24 horas, 72horas e 7 dias do tratamento. Outros 4 animais não receberam nenhum tratamento, sendo utilizados como grupo controle. Como cada testículo foi individualmente tratado e pode ser considerado uma unidade experimental, cada grupo experimental conta com um N de 8 testículos.

Em todos os tratamentos os animais foram pesados e anestesiados com Cetamina (Cetamin®, Syntec, 80mg/kg) e Xilazina (Calmiun®, Agener União, 10mg/kg). As medidas da temperatura dos testículos foram feitas por meio de sensores termopar tipo K (junção cromel/alumel). Após o tratamento todos os animais, receberam uma dose de analgésico e anti-inflamatório (Meloxicam – 1,0 mg/kg) via subcutânea. As eutanásias ocorreram por overdose de barbitúricos (Cetamina e Xilazina, 2 vezes da dose anestésica) e punção cardíaca.

Após a eutanásia de cada animal, retiramos os dois testículos e epidídimos. Os testículos foram separados dos epidídimos, medidos e pesados. ¼ dos testículos foram então separados para

análises de expressão gênica, sendo submergidas em RNA Stabilization Solution (Invitrogen®) e armazenada no - 80°C. O restante foi dividido e fixado para análise histopatológica.

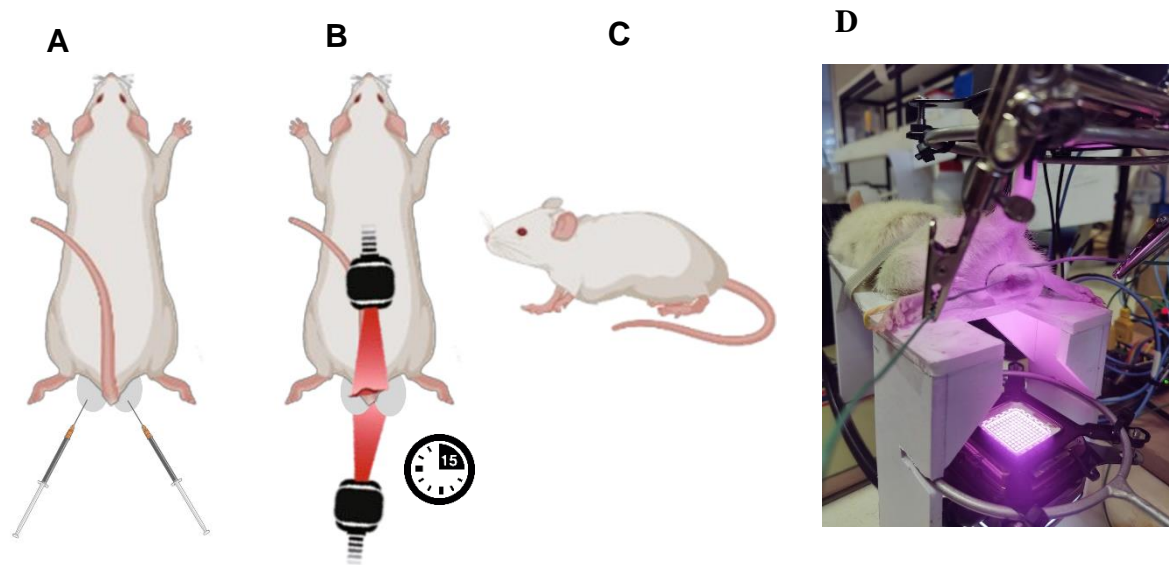


Figura 04. Desenho experimental do procedimento de fototerapia (FHT) pela incidência de luz do LED. A - Animal anestesiado e injeção intratesticular, 0,15 µL da nanopartícula em 3 pontos. B - Processo de fototerapia (FHT) com duração de 15 min. C - Ao voltarem da anestesia os animais foram então separados nos grupos para análise 24h, 72h e 7 dias após o tratamento de FHT. D - Protótipo de equipamento e procedimento de fototerapia (FHT) pela incidência de luz do LED.

6.5 – Avaliação de marcadores moleculares

Foi realizado um levantamento bibliográfico sobre os genes que apresentavam ligação ao tecido ou as ROS e então selecionados 6 genes para análise, sendo 4 genes de interesse (CLDN11; MTRF1; StAR; TRF2) e 2 genes de referência (β -actin; GAPDH). Com base nesse levantamento bibliográfico desenhamos os primers com base no número de acesso no GenBank de cada gene (Quadro 1).

Para a extrações de RNA total das amostras utilizamos o reagente Trizol (Invitrogen®) para lise e o Kit: PureLink™ RNA mini kit (ThermoFisher) para purificação e retirada do excesso de trizol, seguindo os protocolos indicados pelos fabricantes. Após a extração do RNA total levamos as amostras para o NanoDrop, onde analisamos quantitativamente as amostras em suas razões proteicas e de ácidos nucleicos (RNA e DNA) (Quadro 2). A fim de determinar a qualidade do RNA extraído de cada amostra, utilizamos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, onde avaliamos a relação entre as bandas 28S e 18S de uma alíquota de RNA total 5 µg de RNA que foram tratados com 5U da enzima DNase I. Para que a amostra possa ser considerada íntegra, foram incubados a 37 °C por 30 minutos seguido de 75 °C por 10 minutos (Figura 5).

Quadro 1. Nomenclatura dos genes, número de acesso no GenBank, sequência dos primer e tamanho do amplicon dos genes selecionados para análise de qPCR.

Gene	Nome	Sequência Primer	Tamanho amplicon (bp)
CLDN11	Claudin 11	(F) GGAGTGGCCAAGTACAGG (R) CCCGCATACAGCGAGTAG	146
MTRF1	Mitochondrial fission regulator 1	(F) GAGGATGTGGTGGCAACT (R) GTTCTCAAGAGGAGGCTTGG	108
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein	(F) CATCCAGCAAGGAGAGGAAG (R) CACCTGGCACCACCTTAC	122
TRF2	Telomeric repeat binding factor 2	(F) GCGGGTTATGCAGTGTCTAT (R) AGCCTCCTTCACCAGTCT	179
β -actin	Beta-actin	(F) GCCTTCCTTCCTGGGTATG (R) GCTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT	181
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	(F) GCGAGATCCCGCTAACATC (R) CTCGTGGTTCACACCCATC	178

(F) forward; (R) reverse; (bp) base pair

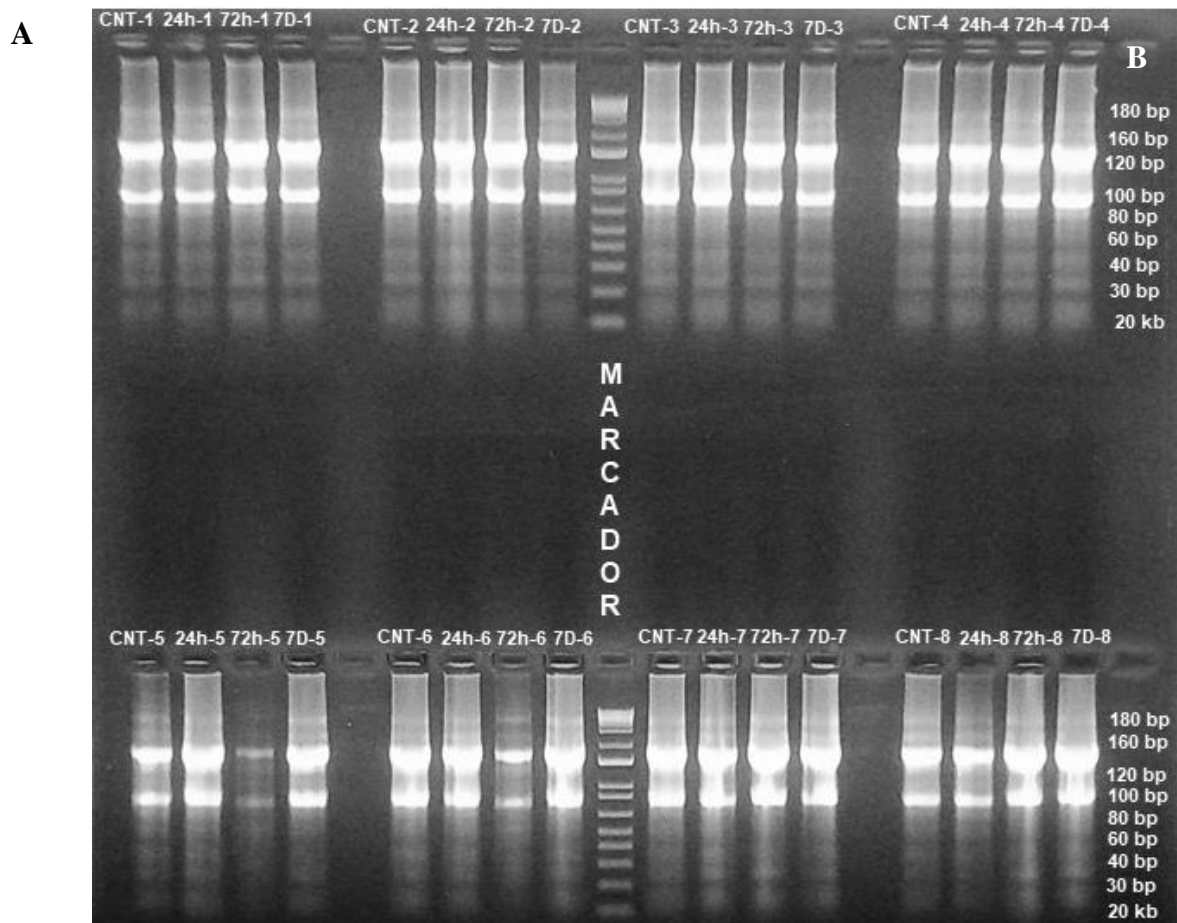


Figura 5. A - Gel de agarose 1,2% dos RNA's totais extraídos. Marcador 1 kb plus. Demonstrando que todas as amostras estavam integras. B - Pares de bases do marcador.

Quadro 2. Identificação das amostras e seus pesos, utilizadas para síntese do cDNA e quantificações de RNA total extraído e purificado.

Amostra	cDNA	Peso antes (mg)	Peso depois (mg)	Quantificação (ng/μL)	Quantificação pós-purificação
TD CNT DØ	C1	250	65	2272,5	146,9
TD A1 24h	24h (1)	210	61	2175,4	142,0
TD A1 72h	72h (1)	265	87	2866,1	197,6
TD A1 7D	7d (1)	205	60	2657,3	158,7
TE CNT DØ	C2	250	87	3207,6	93,0
TE A1 24h	24h (2)	213	94	3506,7	120,5
TE A1 72h	72h (2)	210	80	3193,4	152,4
TE A1 7D	7d (2)	217	60	1606,6	115,4
TD CNT 24h	C3	300	200	3760,0	197,7
TD A2 24h	24h (3)	250	140	3303,1	161,4
TD A2 72h	72h (3)	260	95	3356,9	124,3
TD A2 7D	7d (3)	221	60	2288,7	181,9
TD CNT 72h	C4	180	56	1846,5	226,2
TE A2 24h	24h (4)	250	53	2606,7	91,4
TE A2 72h	72h (4)	207	81	3585,3	92,4
TE A2 7D	7d (4)	280	86	3590,9	125,7
CNT TD 7D	C5	204	55	2115,1	103,5
TD A3 24h	24h (5)	247	102	1841,5	174,4
TD A3 72h	72h (5)	214	63	318,4	94,7
TD A3 7D	7d (5)	181	88	2303,3	150,2
CNT TE 7D	C6	223	77	2218,2	140,2
TE A3 24h	24h (6)	247	92	3100,5	171,8
TE A3 72h	72h (6)	254	170	634,9	136,2
TE A3 7D	7d (6)	155	104	3121,2	126,4
TE CNT 24h	C7	274	116	1798,9	137,3
TD A4 24h	24h (7)	234	82	3444,0	84,1
TD A4 72h	72h (7)	271	151	3815,9	134,6
TD A4 7D	7d (7)	205	146	3116,0	135,4
TE CNT 72h	C8	171	95	2032,1	174,5
TE A4 24h	24h (8)	256	135	1573,1	141,0
TE A4 72h	72h (8)	234	178	2922,7	181,7
TE A4 7D	7d (8)	242	176	3606,2	162,6

Com a verificação em gel realizamos a purificação do RNA total com o Kit: RNeasy mini kit, seguindo o protocolo conforme recomendação do kit. Para sintetizar o cDNA o Kit: GoScript Reverse Transcriptase (Promega®) foi utilizado. Também seguimos o protocolo indicado pelo fabricante e obtivemos um volume final de 42 µL (Tabela 1). Com tempos no Termociclador por 5 minutos e depois em gelo por 5 minutos, sendo os ciclos no termociclador: 25 °C/5 min, 42 °C/60 min e 70 °C/15 min.

Tabela 1. Concentrações cDNA o Kit: GoScript Reverse Transcriptase (Promega®)

Reagente	Concentração inicial	Concentração final	Volume final
Buffer	5x	1x	8,4 µL
MgCl ₂	25mM	5mM	8,4 µL
Nucleotide mix	10mM	0,5mM	2,1 µL
RNasin	40U/µL	20U	0,5 µL
Enzima RT	-	-	1,0 µL
Água	-	-	Quantidade suficiente para (qsp) 42 µL

Para avaliar a eficiência dos oligonucleótidos (Figura 6), o cDNA utilizado para cálculo da eficiência dos primers foi sintetizado com RNA não tratado com DNase I no final do protocolo de extração, tendo um volume final de 20 µL. Utilizamos o Kit: GoTaq qPCR Master Mix (Promega®) em 5 pontos e todos em triplicata, com uma diluição 1:4, sendo 1 µL de cDNA (cDNA sintetizado com 5 µg de RNA não purificado).

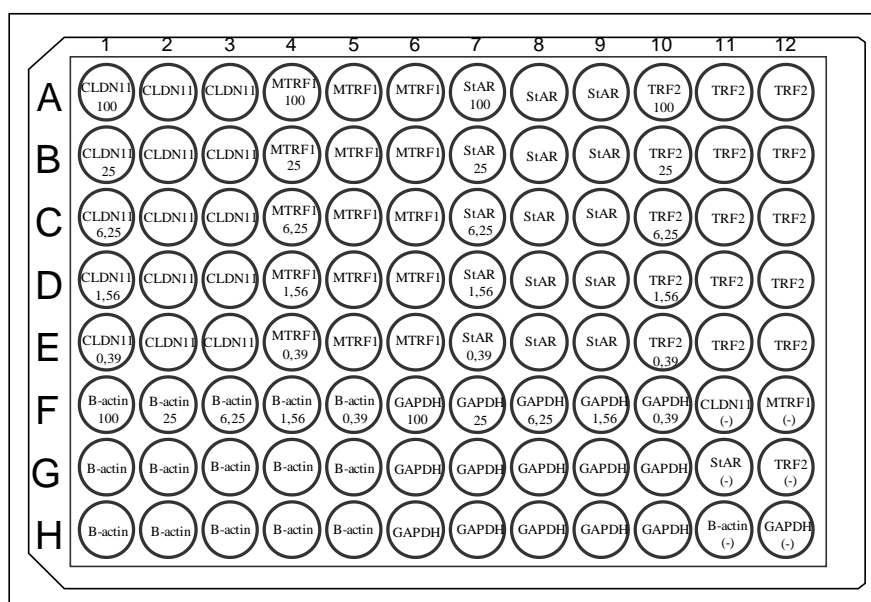


Figura 6. Layout da placa para análise de eficiência dos primers dos genes selecionado, genes de referência: B-actin; GAPDH. Genes de interesse: CLDN11; MTRF1, StAR; TRF2.

Para as análises de PCR em tempo real utilizamos o Kit: GoTaq qPCR Master Mix (Promega®), junto com o equipamento de RT-qPCR: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram realizadas 8 réplicas biológicas (8 placas) e três réplicas técnicas (Figura 7) em condição de 95 °C por 5 min, seguido de 50 ciclos de: desnaturação a 95 °C/15 s, e anelamento e extensão a 60 °C/1 min. Em que utilizamos o método $\Delta\Delta C_t$ com correção de eficiência dos genes (Pfaffl, 2001).

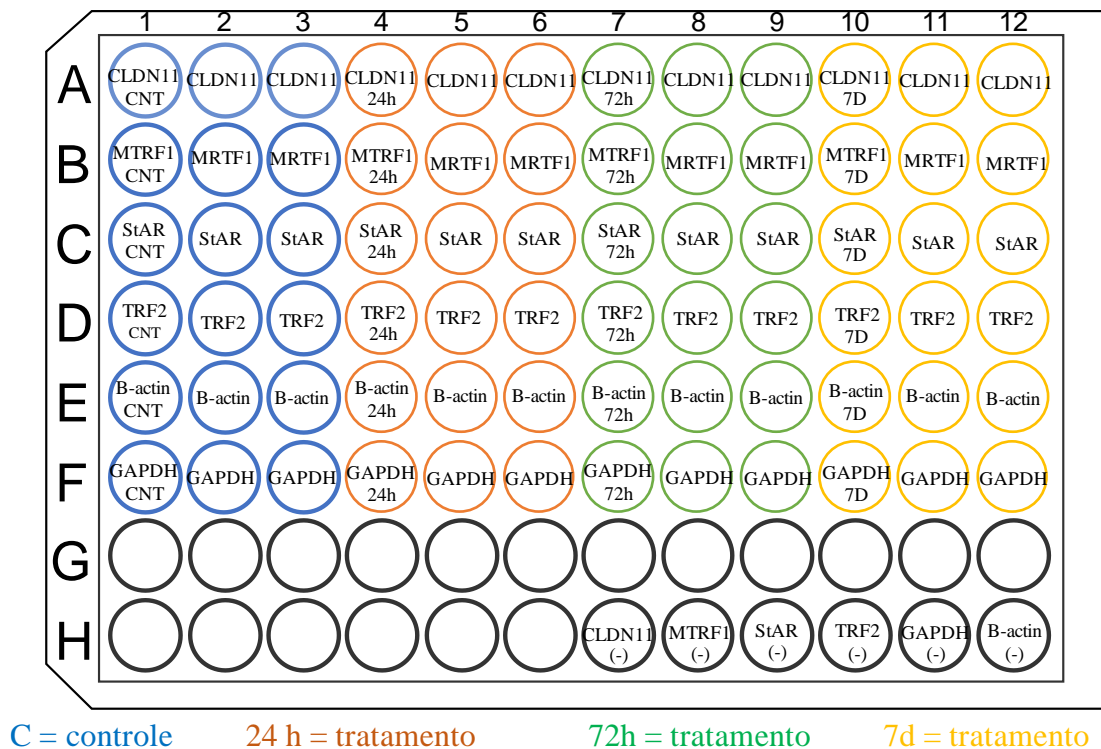


Figura 7. Layout da placa para análise de genes por qPCR dos genes selecionado, genes de referência: B-actin; GAPDH. Genes de interesse: CLDN11; MTRF1, StAR; TRF2. Método $\Delta\Delta C_t$ com correção de eficiência (Pfaffl 2001).

6.6 – Processamento histológico

Os testículos foram fixados com uma solução fixadora de Bouin, por 24 horas, e lavados em seguida por 5 vezes com álcool 50%. Após a lavagem foram mantidos em álcool 70%. Para o processamento histológico, todas amostras passaram pelo processamento com duração de 1 hora cada passo: álcool 80%, álcool 90%, álcool 100% I, álcool 100% II, álcool 100% III, Xilol I, Xilol II, Xilol III, Parafina I, Parafina II, Parafina III e, então, emblocados em Paraplast®.

Para o preparo das lâminas, foram realizados cortes dos blocos com o equipamento micrótomo manual RM2125 RTS Leica Biosystems, cortes com espessura de 5µm, os quais foram montados em lâminas e passaram por coloração por hematoxilina e eosina. A avaliação foi realizada em microscópio de luz (EVOS™ FL Auto Imaging System, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). Na histologia dos testículos avaliamos a estrutura geral do órgão, organização dos túbulos seminíferos e a presença de células da linhagem germinativa, integridade da lâmina basal e possíveis alterações no parênquima e estroma testicular. Esta análise foi utilizada para correlacionar os danos causados ao tecido com as alterações encontradas nos marcadores moleculares analisados.

6.7 – Análise estatística

Fizemos as análises dos dados obtidos pelo GraphPad Prism software versão 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA; www.graphpad.com). A comparação no nível de transcritos entre os grupos foi realizada usando ANOVA e teste de Tukey ou Kruskal–Wallis e Mann–Whitney com um critério de significância de 5% ($p < 0,05$) para dados de distribuição normal e não-normal respectivamente.

Resultados e Discussão

7.1 – Análise histopatológica

Os resultados obtidos através das análises histopatológicas desse estudo, mostraram que em nossos animais controle (Figura 8), os túbulos seminíferos com suas camadas de células germinativas bem, definida e com a presença de espermatozoides no lúmen, em que nas amostras após as 24h de tratamento (Figura 9), já possuem um início de vacuolização, exfoliação de células para o lúmen de alguns túbulos, com vários túbulos apresentando o lúmen preenchido com células germinativas descoladas. Foi possível observar a presença de material sugestivo de aglomerados de nanopartículas ao redor dos túbulos seminíferos. Em algumas lâminas havia retração tubular, principalmente nas regiões com presença desses aglomerados de nanopartícula. No entanto, havia vários túbulos normais ainda.

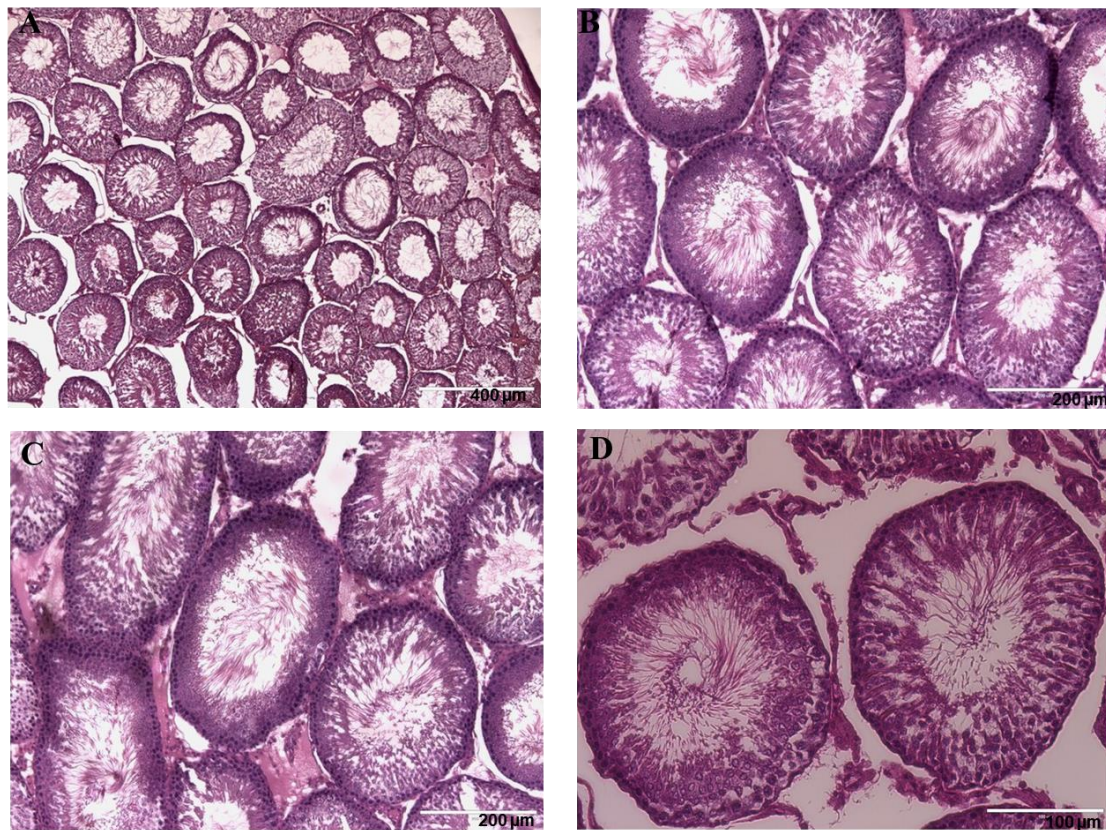


Figura 8. Micrografias de testículos dos animais controles, com os túbulos seminíferos com suas camadas de células germinativas bem, definida e com a presença de espermatozoides no lúmen. Coloração de hematoxilina e eosina.

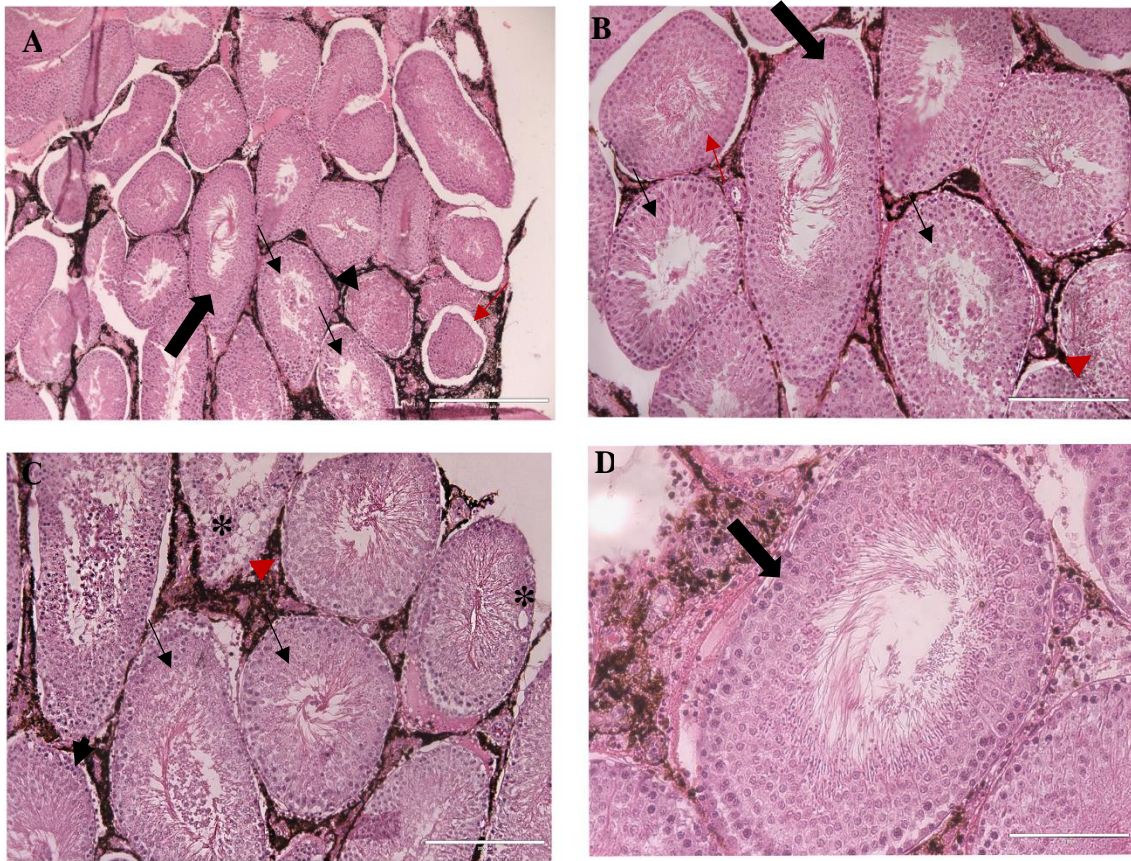


Figura 9. Micrografias de testículos dos animais tratados com FHT mediada por nanopartícula após 24h. Coloração de hematoxilina e eosina. **A)** Presença de túbulos com células esfoliadas no lúmen (seta preta fina), alguns com o lúmen totalmente preenchido, túbulos retraídos (seta vermelha), e alguns túbulos normais (seta grossa preta). Barra- 400 μm ; **B e C)** Túbulo seminíferos normal (seta grossa preta) ao lado de um túbulo retraído (seta vermelha) e outros com células esfoliadas no lúmen (seta preta fina); início de vacuolização no epitélio seminífero (*). Note a presença de material sugestivo de aglomerados de nanopartículas (Ponta de seta vermelha) entre os túbulos. Barra – 200 μm ; **D)** Túbulo seminífero morfologicamente normal, com presença de células da linhagem germinativa, inclusive espermatozoides. Material sugestivo de aglomerados de nanopartículas no espaço intersticial. Barra – 100 μm .

Nas amostras de tratamento após as 72h (Figura 10), os túbulos apresentavam intensa vacuolização, presença de células grandes e multinucleadas no interior dos túbulos, células da linhagem germinativa desorganizadas e necrose coagulativa em diferentes intensidades. Vasos dilatados e hemácias livres no interstício. Também era possível visualizar túbulos retraídos e alguns túbulos normais.

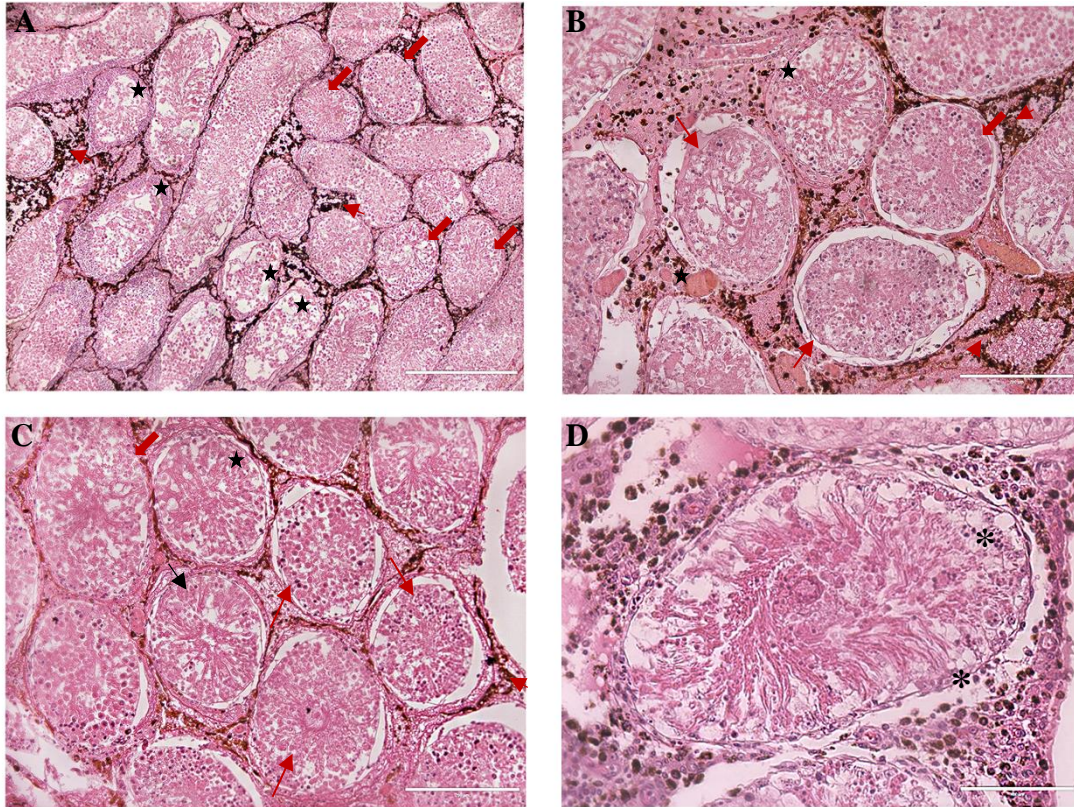


Figura 10. Micrografias dos testículos dos animais tratados com FHT mediada por nanopartículas após 72h. Coloração de hematoxilina e eosina. **A)** Túbulos seminíferos com epitélio seminífero desorganizado (seta vermelha grossa) e necrose coagulativa extensa em alguns deles (estrela preta). material sugestivo de aglomerados de nanopartículas (Ponta de seta vermelha). Barra- 400 μm ; **B e C)** Detalhe de túbulo seminífero com epitélio desorganizado (seta vermelha grossa) e necrose coagulativa (estrela preta). Vasos dilatados (estrela cinza) com hemácias livres nas proximidades no espaço intersticial. Barra – 200 μm ; **D)** Detalhe de um túbulo seminífero com epitélio desorganizado e vacuolização (*) evoluindo para necrose coagulativa. Barra – 100 μm .

Nas amostras de tratamento após 7 dias (Figura 11), as lâminas apresentaram túbulos bem degenerados e espaçados, com preenchimento dos espaços por material hialino. Túbulos com vacuolizações maiores que se estendem até a região luminal. Presença de células inchadas e multinucleadas nas regiões mais internas dos túbulos e muitos túbulos com necrose coagulativa.

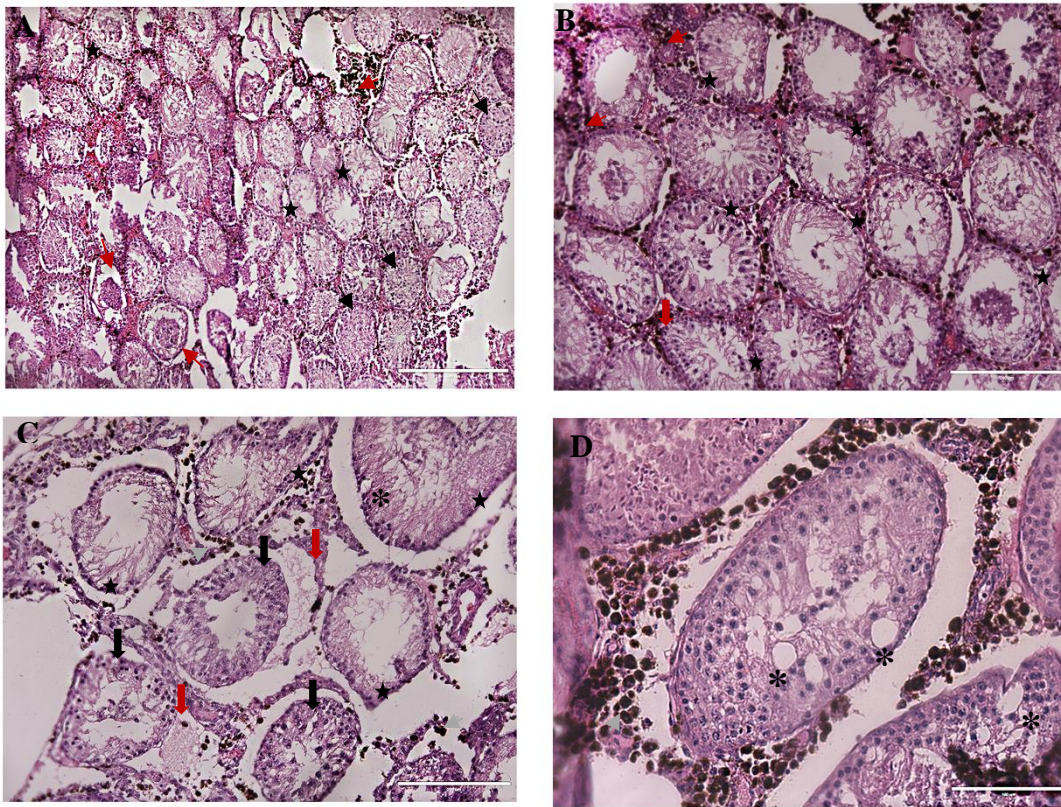


Figura 11. Micrografias dos testículos dos animais tratados com FHT mediado por nanopartícula após 7 dias. Coloração de hematoxilina e eosina. **A)** Presença de túbulos com células esfoliadas no lúmen (seta preta fina), necrose coagulativa extensa em alguns deles (estrela preta), alguns com o lúmen totalmente preenchido, túbulos retraídos (seta vermelha fina). Note a presença de material sugestivo de aglomerados de nanopartículas (Ponta de seta vermelha) entre os túbulos. Barra – 400 μm ; **B e C)** Detalhe de túbulos seminíferos, necrose coagulativa extensa (estrela preta) e com redução de tamanho (seta preta grossa), vacuolização no epitélio seminífero (*), infiltrado hialino (seta vermelha grossa). Note a presença de material sugestivo de aglomerados de nanopartículas (Ponta de seta vermelha) entre os túbulos. Barra – 200 μm ; **D)** Detalhe dos túbulos seminíferos com epitélio seminífero desorganizado e vacuolização avançada no epitélio seminífero (*). Barra – 100 μm .

Os nossos resultados trazem uma perspectiva em menor prazo, porém se mantém em igualdade aos achados de Lima et al., (2019), que observaram que após 7 dias da fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas já era possível observar danos severos aos túbulos seminíferos. Esta autora ainda descreve células inchadas e perda de definição dos túbulos seminíferos em algumas áreas aos 28 dias de tratamento e vacúolos no epitélio tubular aos 56 dias. Essa vacuolização epitelial tubular foi descrita por Creasy et al., (2013) nas análises histológicas de ratos e cachorros criptorquídicos. Patil et al., (2014) expôs os testículos de *Rattus norvegicus* a 39 °C, 41 °C e 43 °C, repetidamente duas vezes por semana durante 5 semanas. Estes autores observaram que a 39 °C os túbulos seminíferos já foram danificados. A 41 °C, os túbulos seminíferos se romperam em algumas áreas e o número de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos diminuiu. A 43 °C, apareceram mais vacúolos, os túbulos apresentaram menos espermatozoides e as células do estroma também foram reduzidas. Estudos de Wei et al. (2013), demonstraram que testículos de ratos que passaram por torção-destorção (1 hora de torção)

apresentaram redução no diâmetro dos túbulos seminíferos e no número de camadas de células germinativas. As células germinativas desenvolveram-se apenas até o estágio de espermatíde redonda, sem a presença de espermatozoides. Também foi observada descamação acentuada do epitélio germinativo presente no centro tubular, que por vezes obstruiu o lúmen tubular, o que também foi visualizado nos nossos achados histológicos de 24 e 72h. Achados descritos por Fahim et al., (1975), realizados com ratos Wistar machos expostos a aquecimento testicular com infravermelho (60 °C por 15 minutos) e micro-ondas (45 °C por 15 minutos), mostram prejuízo na espermatogênese e alterações morfológicas semelhantes às nossas, porém resultados foram observados somente após 60 dias. Em descrições oferecidas por Lue et al., (1999, 2000) demonstraram que testículos de ratos expostos a água quente a 43 °C por 15 minutos analisados após 6 semanas do tratamento resultou em danos aos túbulos seminíferos e apoptose das células germinativas, revelando sensibilidade dessas células a elevadas temperaturas, sendo as espermatídes e os espermatócitos mais sensíveis do que as espermatogônias.

Rockett et al., (2001), observaram em suas análises histológicas que a exposição (33 °C) em testículos de camundongos, não produziu efeito na espermatogênese, e que exposição de 20 minutos a 39 °C também não teve efeito na espermatogênese. No entanto, 8 h após o choque térmico de 43 °C, vacúolos eram comuns nos túbulos, muitos núcleos de células germinativas continham cromatina altamente condensada (núcleos picnóticos) e alguns núcleos pareciam fragmentos de corpos apoptóticos. Já 16 horas após o choque térmico de 43 °C, os túbulos estavam ainda mais degradados e muitos continham células gigantes em degeneração.

7.2 – Análises de qPCR

Os genes selecionados para o experimento apresentaram uma eficiência de amplificação variando entre 86% a 109% (Quadro 3), e ao serem investigados em Gel de agarose 2,0% (Figura 12), apresentaram grande especificidade de cada gene quando comparados com o marcador 1kb plus, onde o primeiro gel representa em cada poço 1: CLDN11 (146 pb); poço 2: MTRF1 (108 pb); poço 3: StAR (122 pb); poço 4: Marcador 1kb plus; Poço 5: TRF2 (primers antigos – que foram desconsiderados e redesenhados); poço 6: GAPDH (178 pb); poço 7: B-actin (181 pb). Já o segundo gel representa poço 1*: Marcador 1kb plus e poço 2*: TRF2 (179 pb). E em suas curvas de dissociação evidenciaram amplificações bastante específicas de cada gene.

Quadro 3. Eficiência e temperatura de melt.

Gene	MT (°C)	Eff%	R ²	Slope	Threshold
CLDN11	86,78	97,141	0,998	-3,392	0,2
MTRF1	82,13	106,515	0,997	-3,175	0,2
StAR	82,46	100,614	0,999	-3,307	0,2
TRF2	82,07	109,221	0,979	-3,119	0,2
β -actin	82,96	102,414	0,998	-3,265	0,2
22GAPDH	85,62	86,062	0,999	-3,708	0,2

(MT) melt temperature; (Eff%) primer efficiency.

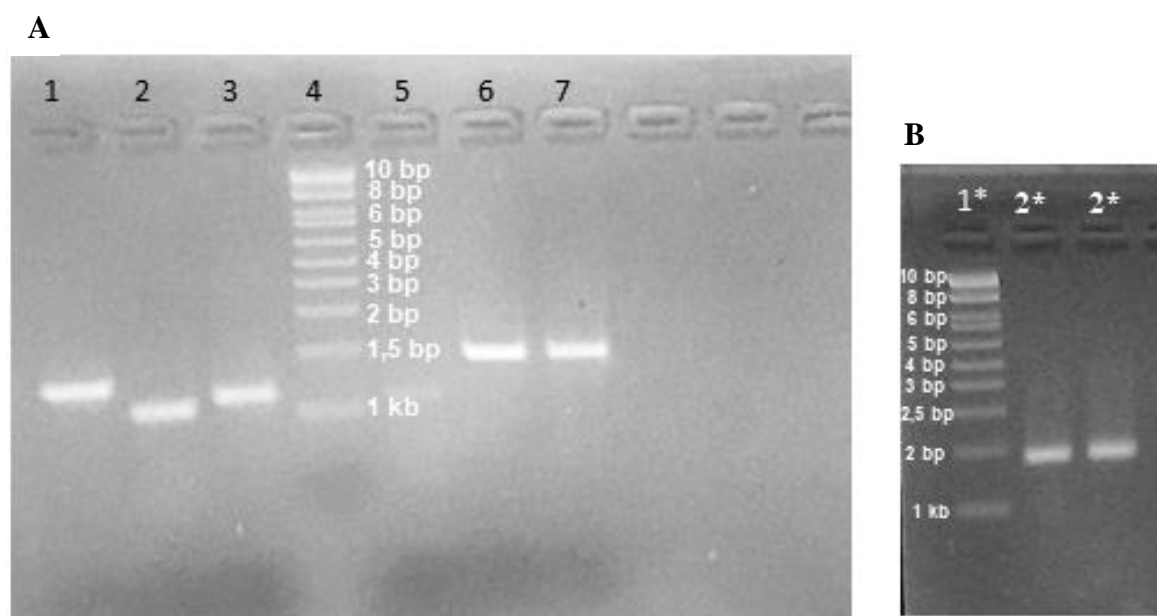


Figura 12. A - Gel de agarose 2%, para análise de eficiência dos oligonucleótidos. (1): poço 1: CLDN11 (146 pb); poço 2: MTRF1 (108 pb); poço 3: StAR (122 pb); B - poço 4/1*: Marcador 1kb plus; Poço 5: TRF2 (primers antigos – que foram desconsiderados e redesenhados); poço 6: GAPDH (178 pb); poço 7: B-actin (181 pb); B - Gel de agarose 2%, para análise de eficiência dos oligonucleótidos. Poços: 1* Marcador 1kb plus, 2* TRF2 (179 pb).

Os gráficos de amplificação, Melt Curve (figura 13), que é a avaliação das características de dissociação do DNA de fita dupla durante o aquecimento, mostram os picos de fusão que distinguem produtos específicos de outros produtos que fundem em diferentes temperaturas, como primer-dímeros (Life technologies, 2016). Devido ao seu pequeno tamanho, os dímeros de primer geralmente fundem a temperaturas mais baixas do que o produto desejado, enquanto a

amplificação inespecífica pode resultar em produtos de PCR que fundem a temperaturas acima ou abaixo do produto desejado. Nos melt curve das nossas amostras (Figura 13), os picos a 80 °C representam o produto alvo do ensaio qPCR e correspondem as bandas demonstradas nos géis (Figura 5). Um único pico distinto no gráfico indica que os produtos amplificados de DNA de cadeia dupla são uma única espécie, ou seja, alta especificidade, o que é necessário para um ensaio de qPCR bem-sucedido (Life technologies, 2016).

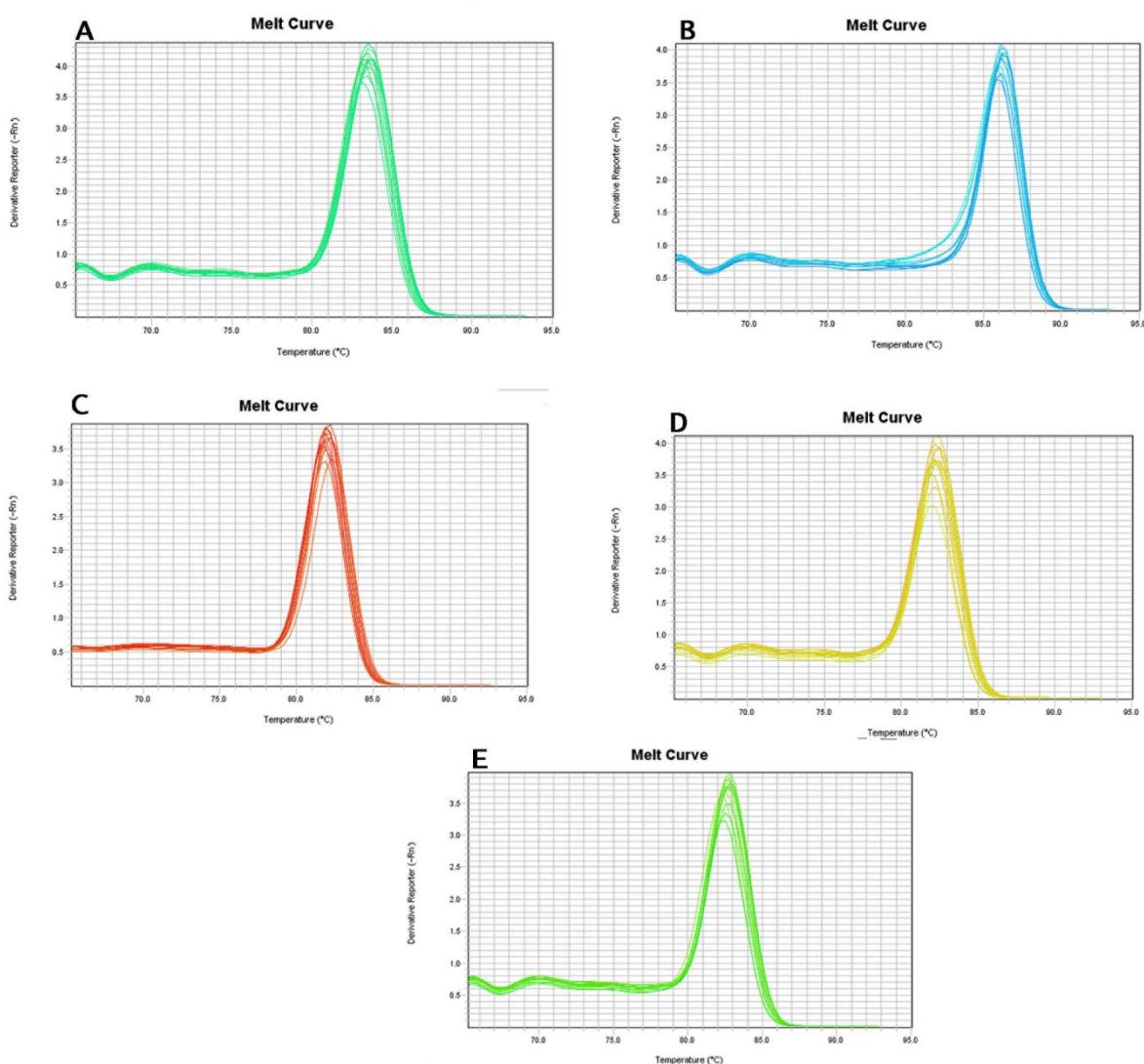


Figura 13. Gráfico de curva de amplificação dos genes. A – B-actin; B- GAPDH (genes referência); C – CLDN11; D – MTRF1; E- StAR.

Em nossos gráficos de abundância relativa de mRNA (Figura 14), demonstramos que os genes *Mtrf1* e *Trf2* são apresentados em altos níveis nos animais controle, porém após o tratamento há uma expressão desses genes significativamente menor ($P < 0,0003$), com exceção do *Mtrf1* às 24 h ($P > 0,05$). Já o gene StAR, 24 h após o tratamento, apresentou uma maior expressão quando comparado com o controle ($P = 0,0505$), apesar da variação entre os animais. Porém, com o passar do tempo de tratamento esse nível foi diminuindo chegando próximo do nível dos animais controle

($P > 0,05$). Já o gene *CLDN11* não apresentou diferença significativa entre o controle e os tempos após o tratamento ($P > 0,05$).

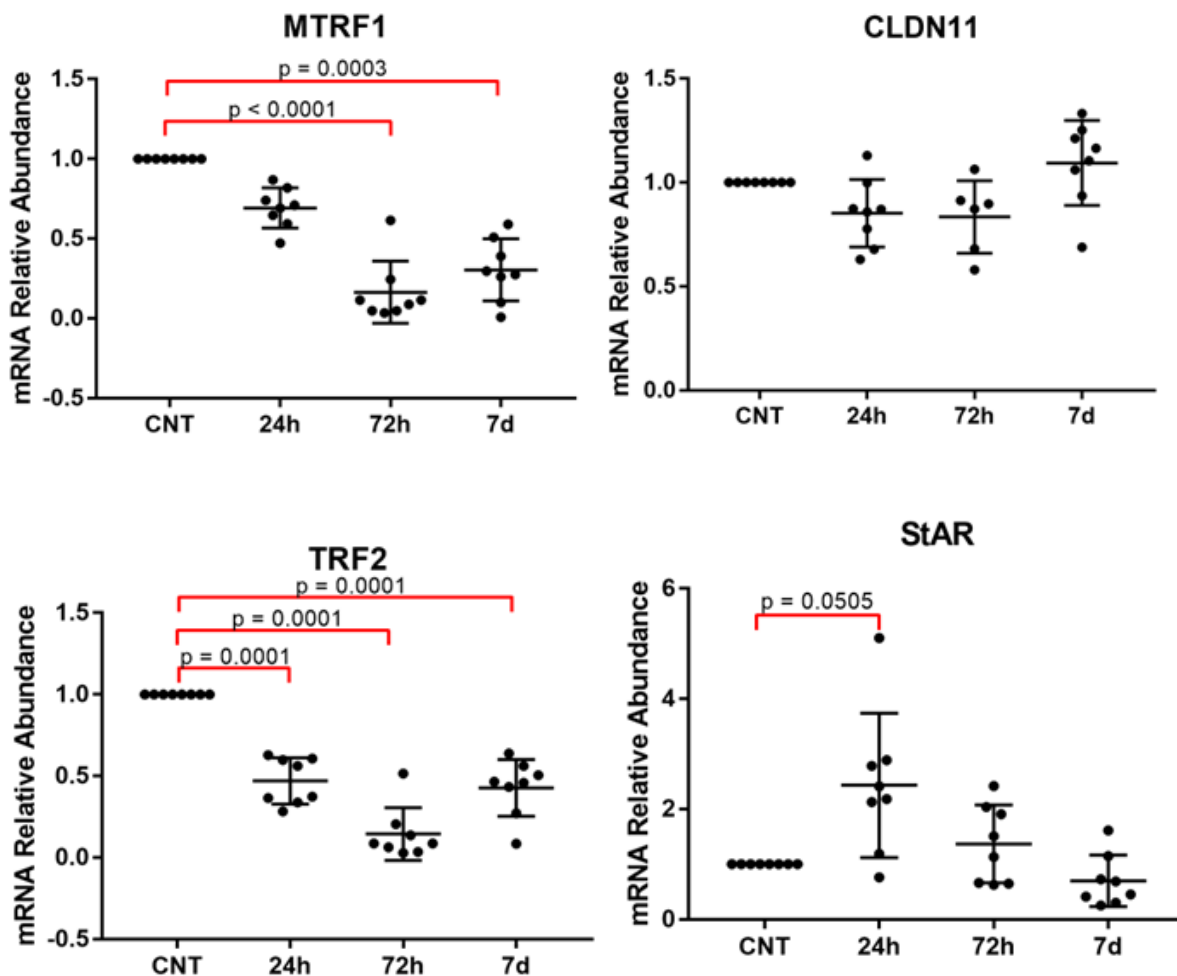


Figura 14. Gráfico de abundância relativa de RNA mensageiro dos genes *MTRF1*, *CLDN11*, *TRF2* e *StAR*, normalizados com os genes referência *GAPDH* e *B-actin*. A comparação no nível de transcritos entre os grupos foi realizada usando ANOVA e teste de Tukey (dados com distribuição normal).

Estudos demonstram que as respostas moleculares ao estresse térmico fazem parte de uma rede gênica, coordenada em vários sistemas que visa minimizar os efeitos da temperatura nas funções celulares (Collier et al., 2008). O efeito das altas temperaturas aplicadas no presente trabalho regulou negativamente a expressão de genes que podem estar envolvidos em processos que regulam o estresse oxidativo ou ROS do tecido testicular e que por sua vez podem levar a infertilidade devido as células espermáticas serem sensíveis a temperaturas elevadas (Vernet et al., 2004).

O gene *Mtrf1* é um gene nuclear que codifica uma proteína mitocondrial, capaz de induzir a fissão dessa organela de maneira sequencial. Estudos mostram que há uma influência indireta do gene sobre as células de Leydig e possivelmente efeitos de seu nível de expressão sobre o

metabolismo da mitocôndria (Monticone et al., 2007). *Mtfr1* é expresso em nível mais alto nos testículos puberais e adultos, em particular pelas células germinativas haploides e células de Leydig (Honda & Hirose, 2003). Em nosso estudo mesmo com a variabilidade biológica entre os animais, há uma queda de expressão de *Mtfr1* nos animais tratados, acentuada a partir de 72h, quando comparados com os animais controle (Figura 14). Estudos com camundongos deficientes em *Mtfr1* (Monticone et al., 2007; 2010), mostraram que a falta do gene em questão proporciona menor expressão de outros genes envolvidos na defesa contra o estresse oxidativo, que é acompanhada por danos ao DNA. Que também foi demonstrado em outros estudos, em que o gene está envolvido na regulação da atividade antioxidante na gônada e influencia a expressão de genes que codificam enzimas *scavenger* de ROS, que são sequestradores de ROS, e atuam como uma rede coordenada contra o dano oxidativo (Mates et al., 1999; Finkel, 2003; Vernet et al., 2004; Hanukoglu, 2006).

Monticone et al., (2010) relatam que a inibição da expressão de *Mtfr1*, em uma linhagem de células germinativas testiculares, prejudica severamente o consumo de O₂ e indica que o gene é necessário para a respiração mitocondrial. Conseqüentemente, ao analisarem mitocôndrias dos testículos de camundongos deficientes em *Mtfr1* revelou que o consumo de O₂ e síntese de ATP foram severamente reduzidos em comparação com animais selvagens para o gene e apresentam potencial papel na função testicular. Archer (2013), demonstra que as mitocôndrias têm um papel importante na regulação da morte celular, em que elas constantemente se fundem e se dividem para formar uma rede dinâmica em resposta ao estresse e às demandas de energia da célula. Segundo Wang et al., (2015) o gene *Mtfr1* apresenta um papel crítico na regulação da dinâmica mitocondrial, participando da regulação da fissão mitocondrial e apoptose, observados em cardiomiócitos e nocautes de *Mtfr1* em camundongos. A fissão mitocondrial é importante para o crescimento e divisão de células para fornecer novas mitocôndrias e também é importante para remover mitocôndrias danificadas da célula (Frank et al., 2001; Toyama et al., 2016). Podemos supor que no tecido testicular submetido ao tratamento com FHT mediada por nanopartículas, essa redução na expressão de *Mtfr1* pode estar contribuindo para um acúmulo de mitocôndrias danificadas no tecido e conseqüentemente baixa captura de O₂ no tecido, o que pode gerar acúmulo de ROS. Além disso, pela influência do gene na regulação de ROS por enzimas *scavenger* a sua baixa também pode estar afetando a capacidade antioxidante do tecido gonadal.

O gene *Trf2* controla a transcrição de genes testiculares específicos, essenciais para a espermatogênese (Zhang et al., 2001; Martianov et al., 2001). Alguns estudos mostram que a expressão de *Trf2* é maior no testículo do que em outros tecidos (Kimmins et al., 2004). Em nosso estudo foi possível observar uma queda na expressão desse gene, sendo já visível no grupo de 24h, mais acentuada no grupo de 72h e se mantendo baixa no grupo 7 dias, quando comparado com o

grupo controle. Estudos com camundongos machos deficientes em *Trf2*, mostram que esses são estéreis, devido a parada completa da espermatogênese (Zhang et al., 2001; Martianov et al., 2001). Pesquisas que avaliaram a torção-detorção testicular unilateral mostraram que aumentou significativamente o nível de malondialdeído (marcador de estresse oxidativo), e que reduziu a expressão de *Trf2* e a espermatogênese nos testículos, sugerindo que a supergeração de espécies reativas de oxigênio após a torção-detorção testicular pode diminuir a expressão de *Trf2*, levando a danos espermatogênicos (Wei et al., 2013). Esta observação concorda com os achados e a hipótese da nossa pesquisa, que mostra uma diminuição da expressão de *Trf2* após o tratamento de FHT testicular e que esse esteja gerando um estresse oxidativo no tecido.

Os achados histopatológicos de Monticone et al., (2007), onde analisou a expressão de *Mtfr1* em tecido testicular de camundongos deficientes, não apresentaram diferença morfológicas aparentes, diferente do que foi observado em nosso estudo. Os achados histopatológicos de Zhang et al., (2001), ilustraram que camundongos deficientes em *Trf2* não apresentavam espermátides alongadas ou espermatozoides, que estão presentes em animais que expressavam o gene, e que estes sofrem apoptose em caso de irregularidade. Quando comparado com camundongos juvenis de 28 e 25 dias de idade, as estruturas acrossômicas são anormais em animais deficientes em *Trf2* e ainda não há presença de espermátides alongadas ou espermatozoides. Wei et al., (2013), também ilustra em suas análises histopatológicas que testículos no grupo torção-detorção apresentaram redução no diâmetro de túbulos seminíferos e no número de camadas de células germinativas. Além disso, células germinativas desenvolveram-se apenas até o estágio de espermátides arredondadas, com espermatozoides completamente ausentes, bastante semelhante com nossos achados nos tempos de 72h e 7 dias após o tratamento de FHT. Os testículos no grupo de animais tratados com *scavengers* de espécies reativas de oxigênio exibiam características histológicas testiculares quase normais, com muitos espermatozoides maduros. No entanto, ainda apresentavam descamação acentuada do epitélio germinativo no centro tubular, que facilmente obstruía o lúmen tubular, bastante semelhante com os nossos achados em primeiros tempos 24h e 72h de tratamento de FHT. Nossos achados também concordam com os de Martianov et al., (2001), que também observaram que nos túbulos seminíferos de camundongos deficientes de *Trf2*, havia muitas células gigantes multinucleadas com citoplasma altamente vacuolizado, correspondendo a espermátides arredondadas em degeneração. Estes autores mostraram que essas células estão passando por apoptose, confirmada por análise TUNEL in situ. Martianov et al., (2001), também mostram que os testículos de camundongos deficientes de *Trf2* são significativamente menores do que no tipo selvagem, e os túbulos seminíferos são desprovidos de espermatozoides maduros. O que fortalece nossa hipótese de que a FHT mediada por nanopartículas aplicada aos testículos esteja afetando a regulação da cadeia de ROS. Este efeito é

visível no nível de expressão dos genes *Mtrf1* e *Trf2* que tiveram uma diminuição após o nosso tratamento, sugerindo uma não regulação de ROS e falha de balanceamento no estresse oxidativo nas células dos testículos, levando a esterilidade.

O gene CLDN11 codifica proteínas integrais de membrana e componentes de cadeias de junções oclusivas. Estudos sobre os efeitos de Varicocele (Pan et al., 2018), em análises de RT-PCR expuseram que a expressão de CLDN11 estava diminuída em ratos com varicocele em 6 e 8 semanas, e o lado doente foi afetado de forma mais significativa em comparação com o lado saudável na semana 8. Além disso, a expressão de CLDN11 diminuiu gradualmente ao longo do tempo, diferente do que foi observado em nosso estudo.

Em nosso estudo o gene CLDN11 apresentou uma tendência de aumento na sua expressão após 7 dias, apesar de não significativo, que não foi tão visível nas 24h e 72h (Figura 14). Porém foi observado por Jhun et al., (2022) e Zhang et al., (2013), que após exposição ao calor escrotal (43 °C por 30 min) os níveis de expressão de CLDN11 foram aumentados nos testículos. Jhun et al., (2022) observaram que a expressão relativa de CLDN11 por qPCR foi significativamente aumentada em células de Sertoli cultivadas a 37 °C em comparação com aquelas cultivadas a 34 °C, sendo os resultados da análise de proteínas semelhantes. Os resultados de Jhun et al., (2022), mostram que a expressão de CLDN11 foi aumentada em testículos de cães criptorquídicos, que não possuem células germinativas. É relatado por Hellani et al., (2000), que os níveis de expressão de CLDN11 nos testículos aumentaram durante o desenvolvimento pré-púbere, mas diminuíram gradualmente de acordo com a maturação testicular devido ao aumento da expressão de células germinativas que não expressam CLDN11. Yang et al., (2018), que também analisaram células de Sertoli de leitões de 3 semanas de idade, submeteram elas a tratamento térmico, 43 °C por 30 min (banho-maria) ou em incubadora a 43 °C (5% CO₂) por 30 min (banho de ar). Essas células apresentaram baixa viabilidade após 1h de tratamento térmico, porém a viabilidade voltou aos níveis normais 48 h após. Eles então selecionaram esses tempos para detecção de expressão das proteínas de junções oclusivas, visualizaram que os níveis de mRNA e proteico de CLDN11 diminuíram significativamente 1 h após a exposição ao calor, mas se recuperaram com o passar do tempo. Em contraste, ao analisarem o citoplasma das células, a expressão da CLDN11 diminuiu 1 h após o tratamento e aumentou 48 h após a exposição ao calor, sendo também encontrada nas membranas de vesículas de transição. Esse fenômeno indicou que a dinâmica do CLDN11 muda com a dinâmica das junções oclusivas. Essas mudanças sugerem que o tratamento térmico pode destruir o sistema de transporte intracelular e restringe ainda mais a reciclagem da CLDN11 de volta ao citoplasma e à membrana plasmática (Yang et al., 2018). Zhang et al., (2013), visualizaram que o estresse oxidativo testicular induzido por radiação gama ⁶⁰Co local no abdome inferior, em camundongos, diminuiu o nível de mRNA da inibina beta, aumentou o FSH sérico,

danificou as células de Sertoli e elevou a expressão de CLDN11 no tecido testicular. O que pode concordar com essa tendência de aumento observada no nosso estudo, onde esse aumento de expressão pode retardar a restituição cíclica da barreira hematotesticular e reduzir o número de espermatócitos meióticos no epitélio seminífero, o que conseqüentemente leva à infertilidade masculina (Zhang et al., 2013). Essa tendência de aumento de expressão do gene CLDN11, pode estar evidenciando que a regulação do estresse oxidativo não esteja sendo realizada, sendo mais expressivo após 7 dias de tratamento. Além do que, diferente do que foi observado por Yang et al., (2018), nossos dados podem demonstraram a expressão de CLDN11 maior no citoplasma das células ou nas membranas de vesículas de transição (não fizemos distinção nas análises) e por possuímos tempos maiores.

Resultados dos estudos de Ha et al., (2011) e Koksai et al., (2007), sugerem que a infertilidade masculina induzida por varicocele é mediada por danos à barreira hematotesticular. Em análises histopatológicas realizadas por Zhang et al., (2013), após radiação gama ^{60}Co local, observou-se uma diminuição dos túbulos seminíferos, epitélio seminífero reduzido e células espermatogênicas desorganizadas. O que também foi ilustrado pelas nossas micrografias que mostram os danos progressivos nos túbulos, onde há uma desorganização dos túbulos nas primeiras horas após o tratamento, acentuando-se no 7º dia. Pan et al., (2018) em seu exame histopatológico revelou ruptura crescente da integridade da barreira hematotesticular ao longo do tempo, o que também foi ilustrado pelas nossas micrografias, mostrando uma retração dos túbulos e necrose coagulativa do epitélio seminífero.

O gene StAR possui a função de entrega de colesterol para a membrana mitocondrial interna, além de outras funções desconhecidas no organismo. Em nossos resultados, quando comparado com os animais controle, há uma maior expressão nos testículos dos animais tratados após 24h de tratamento, mesmo com variação entre os animais, que reduziu nos tratamentos após 72h e 7 dias, aproximando do nível de expressão visto nos animais controle (Figura 14). Segundo o estudo de Norman et al., (2003), após o tratamento com Di(*n*-butil) ftalato (DBP), um desregulador endócrino, ocorreu uma diminuição do conteúdo lipídico das células de Leydig e a alteração dos genes de transporte do colesterol, alterando e influenciando no transporte e agindo como um mecanismo potencial para a diminuição da síntese de testosterona, influenciando negativamente o desenvolvimento reprodutivo masculino. Norman et al., (2003), também observaram que a expressão do gene StAR, foi significativamente reduzida e que quando analisados sua imunocoloração, foi intensa e localizada no citoplasma de células de Leydig em testículos de animais controle, no entanto, a intensidade de coloração de células de Leydig em testículos expostos a DBP diminuiu acentuadamente.

Galano e Papadopoulos (2022), observaram que quando nocauteado o gene StAR em célula de Leydig, altera-se a estrutura e função mitocondrial que não é recuperada. Além disso, mostram que quando a estrutura e/ou função mitocondrial é prejudicada, o processamento de StAR é defeituoso, resultando na incapacidade de StAR de se mover da membrana mitocondrial externa para a matriz mitocondrial (Galano & Papadopoulos, 2022). Resultados observados por Bozkaya et al. (2017), demonstraram que o estresse térmico prolongado diminuiu a expressão do gene StAR em testículos de ratos, onde o estresse térmico crônico (a 38 °C por 9 semanas) causou degeneração do epitélio seminífero. Em nosso estudo, o estresse térmico agudo a 45 °C causou um aumento da expressão de StAR às 24h seguida do retorno para níveis semelhantes ao controle às 72h e 7 dias. Esse aumento pode ser explicado pela resistência das células de Leydig sobre os efeitos da temperatura, diferente das espermatídes e os espermátócitos que são mais sensíveis. E com a redução na expressão de *Mtrf*, que pode estar contribuindo para um acúmulo de mitocôndrias danificadas no tecido, pode sugerir que esse aumento tenha sido de achados de StAR nas membranas externas dessas mitocôndrias. Já a sua queda propõe que nossas mitocôndrias e células de Leydig estejam sendo afetadas após 72h, e continua no 7º dia, de tratamento de FHT.

Aktas & Kanter (2009), mostraram que o número de células de Leydig positivas para testosterona diminuiu em testículos de ratos expostos a altas temperaturas devido a alterações degenerativas dos túbulos seminíferos, que estavam não canalizados e atróficos de diâmetro muito menor, e apresentando o tecido conjuntivo intertubular mais abundante e mais solto, ilustrados nos achados histopatológicos. Portanto, a regulação negativa da expressão do gene StAR nos testículos por altas temperaturas ambientais podem resultar da diminuição do número de células de Leydig nos testículos. Um declínio na proteína esteroidogênica, StAR, após tratamento térmico em ratos adultos foi relatado por Hwang et al., (2010), envolvendo a exposição do testículo a uma faixa de temperatura de 41 a 43 °C por 10 minutos, duas vezes ao dia, durante 3 dias por semana, durante um período de 4 semanas. Eles observaram mudanças morfológicas significativas na maquinaria esteroidogênica das células de Leydig, além do que sugerem que banhos quentes frequentes podem prejudicar a esteroidogênese testicular e afetar a função das células de Leydig, podendo ser diminuída por um efeito direto da hipertermia ou por um efeito indireto da lesão dos túbulos seminíferos. Nas histologias observadas por Hwang et al., (2010), os testículos do grupo controle apresentavam espermatogênese normal com a presença de todos os tipos de células germinativas. Porém os grupos submetidos a banhos quentes, tanto de jovens quanto de idosos, apresentavam túbulos seminíferos vacuolizados, e maior deterioração no grupo de idosos. Sendo bastante parecidos com os nossos achados histopatológicos, com o início de vacuolização e necroses coagulativa nos tempos de 24h e 72h, porém mais acentuado no grupo de 7 dias após o tratamento. O acúmulo de gotículas lipídicas, o aparecimento de um retículo endoplasmático liso

dilatado, o inchaço mitocondrial e o desaparecimento das cristas mitocondriais, foram relatados por vários investigadores dentro de 35 dias de exposição ao calor (Damber et al., 1980; Aktas e Kanter, 2009).

No geral, os dados sugerem que a célula de Leydig pode sofrer alterações funcionais significativas após o tratamento térmico, incluindo redução na expressão gênica de StAR. Advertindo que o nosso tratamento de FHT pode interferir nos níveis proteicos do transporte de colesterol e subsequentemente na produção de testosterona, essa tendência de redução de expressão do gene observada nos nossos achados de 24h a 7 dias, pode ser explicada devido a quantidade de células viáveis no tecido, principalmente no 7º dia, e que pode ser contínua em outros tempos maiores de análises.

Conclusão e perspectivas

Podemos concluir que o tratamento de FHT mediada por nanopartículas nos testículos de ratos está afetando o nível de expressão dos genes estudados. Dois destes genes, *Mtrf1* e *Trf2*, estão envolvidos em processos de defesa ou regulação de ROS, bem como a tendência de aumento da expressão de CLDN11. A redução no gene StAR, indica que o nosso tratamento também afeta os níveis de proteínas envolvidas no transporte de colesterol e compromete uma das vias de produção de testosterona, o que consequentemente leva à infertilidade masculina. As análises histopatológicas correlacionam-se com os dados obtidos da expressão dos genes, ilustrando os danos causados na primeira semana pós-tratamento, e por uma falta de regulação do estresse oxidativo. Juntos, estes dados corroboram que esse novo procedimento é bastante eficiente como método de castração e gera infertilidade. Ainda assim, se faz necessário mais estudos para medição de níveis de ROS no tecido após o tratamento, avaliação das mitocôndrias e análises de outros genes que possam estar envolvidos nessa cascata de ativação de ROS, para melhor elucidar os efeitos moleculares da FHT testicular.

Referências Bibliográficas

ABSHENAS, J. Babaei, H. Zare, M. H. Allahbakhshi, A. Sharififar, F. **The effects of green tea (Camellia sinensis) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress.** Veterinary Research Forum, 2(4): 242-247. (2011).

ADIN, C. A. **Complications of ovariohysterectomy and orchietomy in companion animals.** Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice, 41(5), 1023–1039. (2011). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.05.004>

ADLER, I.D. **Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans.** Mutation Research 352: 169- 172. (1996).

AGARWAL, A. & Saleh, R.A. **Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment.** Urologic Clinics of North America, 29(4): 817-27. (2002).

AKTAS, C. & Kanter, M. **A morphological study on Leydig cells of scrotal hyperthermia applied rats in short-term.** Journal of Molecular Histology, 40, 31–39. (2009).

ALZFORUM, J.S. **Genomic Institute.** UC Santa Cruz. (2017). Disponível em: <<https://ucscgenomics.soe.ucsc.edu/gene-expression-map-human-body-gives-value-variants>>. Acesso em: 19 de março de 2023.

ANDA - **Agência de Notícias de Direito dos Animais.** Brasil tem 30 milhões de animais abandonados. (2013). Disponível em: <https://anda.jusbrasil.com.br/noticias/100681698/brasil-tem-30-milhoes-de-animais-abandonados>. Acesso em: 7 mar. 2023.

ANDRADE, E. R. Melo-Sterza, F. A. Seneda, M. M. Alfieri, A. A. **Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, 34(2): 79- 85. (2010).

ARCHER, S.L. **Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases.** N Engl J Med. 5;369(23):2236-51. (2013). DOI: 10.1056/NEJMra1215233.

ARORA, S. Rajwade, J.M. Paknikar, K.M. **Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour.** Toxicology and Applied Pharmacology, 258: 151–165. (2012). DOI: 10.1016/j.taap.2011.11.010

- ASHARANI, P.V. Mun, G.L.K. Prakash, H.M. Valiyaveetil, S. **Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells**. American Chemical Society, 3 (2): 279–290. (2009). DOI: 10.1021/nn800596w
- ATES, U. Gollu, G. Bingol-Kologlu, M. Billur, D. Kucuk, G. Oruklu, N. Bagriacik, U. Hasirci, N. Dindar, H. **The effects of local and systemic growth hormone treatment on germ cell population and fertility in an experimental unilateral testicular torsion and orchiectomy model**. J. Urol. 194, 1816–1822. (2015). DOI: 10.1016/j.juro.2015.07.087.
- BAI, Y. Sartor, M. Cavalcoli, J. **Current status and future perspectives for sequencing livestock genomes**. Journal of animal science and biotechnology, v. 3, n. 1, p. 8–8. (2012).
- BARANSKI, B. **Effects of the workplace on fertility and related reproductive outcomes**. Environ Health Perspect; 1019(suppl 2):81–90. (1993).
- BARKALINA, N. Charalambous, C. Jones, C. Coward, K. **Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials**. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 10 (5): 921-938. (2014). DOI: 10.1016/j.nano.2014.01.001
- BARTH, A. & Bowman, P. **The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls**. Can Vet J; 35:93–102. (1994).
- BEDFORD, J. **Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies**. In: Zorngiotti AW (ed.) Temperature and Environmental Effects on the Testis. New York: Plenum Press, pp. 19–32. (1991).
- BERENQUER, J. G. Peregrín, P. C. López-Fernández, C. Fernández, J. L. and Calonge, R. N. **Fragmentación Del ADN espermático**. Revista Internacional de Andrología, vol. 6, no. 3, pp. 193–209. (2008).
- BERGH, A. Collin, O. Lissbrant, E. **Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat**. Biol. Reprod. 64, 13–20. (2001).
- BIRBEN, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. **Oxidative stress and antioxidant defense**. World Allergy Organ J, 5(1):9-19. (2002).
- BLAZQUEZ, N. Mallard, G. Wedd, S. **Sweat glands of the scrotum of the bull**. J Reprod Fertil; 83:673–677. (1988).

- BORTOLOTTI, R., & D'AGOSTINO, R. G. **Ações pelo controle reprodutivo e posse responsável de animais doméstico interpretadas à luz do conceito da metacontingência.** *Brazilian Journal of Behavior Analysis*, 3(1): 17–28. (2007).
- BOZKAYA, F. Atli, M.O. Guzeloglu, A. Kayis, S.A. Yildirim, M.E. Kurar, E. Yilmaz, R. Aydilek, N. **Effects of long-term heat stress and dietary restriction on the expression of genes of steroidogenic pathway and small heat-shock proteins in rat testicular tissue.** *Andrologia*;49(6). (2017). DOI: 10.1111/and.12668.
- BROOKING, J. Davis, S. Illum, L. **Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa.** *Journal of Drug Target*, 9 (4): 267-79. (2001).
- CASADY, R. B. Myers, R.M. Legates, J.E. **The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull.** *J Dairy Sci*; 36:14. (1953).
- CERVADORO, A. Giverso, C. Pande, R. Sarangi, S. Preziosi, L. Wosik, J. Brazdeikis, A. Decuzzi, P. **Design maps for the hyperthermic treatment of tumors with superparamagnetic nanoparticles.** *PLoS One*8(2), e57332. (2013). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057332>
- CHANCHALA, D. K. John, H. P. & May, D. W. **Computational nanomedicine: modeling of nanoparticle-mediated hyperthermal cancer therapy.** *Nanomedicine*. 8:8, 1323-1333. (2013). DOI: doi.org/10.2217/nmm.13.117
- CHEN, G. Gharib, T.G. Huang, C.C. Taylor, J.M. Misk, D.E. Kardia, S.L. Giordano, T.J. Iannettoni, M.D. Orringer, M.B. Hanash, S.M. Beer, D.G. **Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas.** *Mol Cell Proteomics*; 1(4):304-13. (2002). DOI: 10.1074/mcp.m200008-mcp200
- CHICHEL, A. Skowronek, J. Kubaszewska, M. Kanikowski, M. **Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications.** *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*12(5),267–275. (2007).
- CHITWOOD, J. L. Rincon, G. Kaiser, G. G. Medrano, J. F. E Ross, P. J. **RNA-seq analysis of single bovine blastocysts.** *BMC genomics*, v. 14, n. 1, p. 350–350. (2013).
- CHRISTOPHI, C. Winkworth, A. Muralidharan, V. E Evans, P. **The treatment of malignancy by hyperthermia.** *Surgical Oncology*, 7(1–2): 83–90. (1998).

COHEN, R. D. KING, B. D. THOMAS, L. R. JANZEN, E. D. **Efficacy and stress chemical versus surgical castration of cattle.** Canadian Journal of Animal Science, 1072: 1063– 1072. (1990).

COLLIER, R. J. Gebremedhin, K. Macko, A.R. and Roy, K. S. **Genes involved in the thermal tolerance of livestock.** In Environmental stress and amelioration in livestock production (ed. V Sejian, SMK Naqvi, T Ezeji, J Lakritz and R Lal), pp. 379–410. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, NY, USA. (2012).

COLLIER, R.J. Collier, J.L. Rhoads, R.P. Baumgard, L.H. **Invited review: genes involved in the bovine heat stress response.** J. Dairy Sci. 91 (2), 445–454. (2008). DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0540>

COLLINS, P. Lacy, D. **Studies on the structure and function of the mammalian testis. II. Cytological and histochemical observations on the testis of the rat after a single exposure to heat applied for different lengths of time.** Proc R Soc Lond B Biol Sci; 172:17–38. (1969).

COURA, J. R. **The main sceneries of chagas disease transmission.** The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 110(3), 277–282. (2015). DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>

CREASY, D.M. Chapin, R.E. **Male Reproductive System.** In: Haschek, W; Rousseaux, C; and Wallig, M. (Org.) Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology Academic Press. p. 2493– 2598. (2013).

CROMPTON, M. **Bax, bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis.** Current Opinion in Cell Biology, vol. 12, no. 4, pp. 414–419. (2000).

DAHL, E. & Herrick, J. **A vascular mechanism of maintaining testicular temperature by counter-current exchange.** Surg Gynecol. Obstet; 108:697–705. (1959).

DAMBER, J.E. Bergh, A. Janson, P.O. **Leydig cell function and morphology in the rat testis after exposure to heat.** Andrologia. 12(1):12-9. (1980). DOI: 10.1111/j.1439-0272.1980.tb00568.x.

DAMSGAARD, J. Joensen, U.N. Carlsen, E. Erenpreiss, J. Blomberg Jensen, M. Matulevicius, V. Zilaitiene, B. Olesen, I.A. Perheentupa, A. Punab, M. Salzbrunn, A. Toppari, J. Virtanen, H.E. Juul, A. Skakkebaek, N.E. Jørgensen, N. **Varicocele is associated with impaired semen quality**

and reproductive hormone levels: a study of 7035 healthy young men from six European Countries. Eur. Urol. 70, 1019–1029. (2016). DOI: 10.1016/j.eururo.2016.06.044.

DAY, E. S. Morton, J. G. West, J. L. **Nanoparticles for thermal cancer therapy.** J. Biomech. Eng.131(7),074001. (2009).

DE JONG, W.H. & Borm, P.J. **Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards.** International Journal of Nanomedicine, 3 (2): 133-49. (2008).

DEATSCH, A. E. & Evans, B. A. **Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 354, 163–172. (2014).

DERVEAUX, S. Vandersompele, J. O. Hellemans, J. A. N. **How to do successful gene expression analysis using real-time PCR.** Methods, San Diego, v. 50, p. 227 – 230. (2010).

DHINGRA, V. Gupta, M. Andacht, T. Fu, Z. **New frontiers in proteomics research: a perspective.** International journal of pharmaceutics, v. 299, n. 1-2, p. 1-18. (2005).

DIGANGI, B. A. Grijalva, J. Jaramillo, E. P. P. Dueñas, I. Glenn, C. Cruz, M. E. C. Pérez, R. P. M. **Post-operative outcomes of surgical and chemical castration with zinc gluconate in dogs presenting to veterinary field clinics.** Veterinary Journal, 229, 26–30. (2017). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.016>.

DING, W. Chen, Z. Gu, Y. Chen, Z. Zheng, Y. Sun, F. **Magnetic Testis Targeting and Magnetic Hyperthermia for Noninvasive, Controllable Male Contraception via Intravenous Administration.** Nano Lett. 28;21(14):6289-6297. (2021). DOI: 10.1021/acs.nanolett.1c0218

DYM, M. & Fawcett, D.W. **The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium.** Biol. Reprod; 3, 308–326. (1970).

ESTEVEZ, S.C. & Miyaoska, R. **Sperm Physiology and Assessment of Spermatogenesis Kinetics In Vivo.** Em: Handbook of Fertility, Elsevier. (2015).

FAHIM, M. S. Fahim, Z. Hall, D. G. Harman, J. **Heat in male contraception hot water 60 C, infrared, microwave, and ultrasound.** Contraception, 11(5): 549–562. (1975).

FAHIM, M. S. WANG, M. SUTCU, M. F. FAHIM, Z. YOUNGQUIST, R. S. **Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine.** Contraception, 47(1): 107–122. (1993).

- FANG, J. & Chen Y. **Nanomaterials for Photohyperthermia: A Review**. Current Pharmaceutical Design, 19(37): 6622-6634. (2013).
- FARAJI, A.H. & Wipf, P. **Nanoparticles in cellular drug delivery**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17: 2950–2962. (2009). DOI: 10.1016/j.bmc.2009.02.043
- FERRAZ, A. L. J. **Análise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças Nelore e Aberdeen angus e sua relação com o desenvolvimento e a carne maciez da carne**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. xv, 96 f.; 28 cm Jaboticabal. (2009).
- FINKEL, T. **Oxidant signals and oxidative stress**. Current Opinion in Cell Biology. 15 247–254. (2003).
- FISCHER, H.C. & Chan, W.C.W. **Nanotoxicity: the growing need for in vivo study**. Current Opinion in Biotechnology, 18: 565–571. (2007).
- FONSECA, L. F. S. Gimenez, D. F. J. Santos, S. D. B. Barthelson, R. Baldi, F. Ferro, J. A. Albuquerque, L. G. **Differences in global gene expression in muscle tissue of Nelore cattle with divergent meat tenderness**. BMC Genomics, London, v. 18, n. 945. (2017).
- FONSECA, L. F. S. Gimenez, D. F. Mercadante, M. E. Bonilha, S. F. Ferro, J. A. Baldi, F. De Souza, F. R. Albuquerque, L. G. **Expression of genes related to mitochondrial function in nelore cattle divergently ranked on residual feed intake**. Molecular Biology Reports, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 559-565. (2015).
- FOSSUM, T.W. **Small animal surgery**. 4th edition, Elsevier, USA. (2013).
- FRANÇA, L.R. & Godinho, C.L. **Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (Felis catus)**. Biology of Reproduction, 68 (5): 1554-1561. (2003).
- FREUND, J. Lipton, M. M. Thompson, G. E. **Aspermatogenesis in the guinea pig induced by testicular tissue and adjuvants**. The Journal of Experimental Medicine, 97(5), 711–726. (1953). <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.711>
- GABALDI, S.H. Define, R.M. Barros, C.M.Q. Mascaro, K. Kastelic, J.P. Rosa, G.J.M. **Efeitos da elevação da temperatura testicular nas características espermáticas em touros Nelore**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 23(3): 222-224. (1999).

GALANO, M. & Papadopoulos, V. **Role of Constitutive STAR in Mitochondrial Structure and Function in MA-10 Leydig Cells.** *Endocrinology*, Volume 163, Issue 8, bqac091. (2022). DOI: <https://doi.org/10.1210/endocr/bqac091>

GARDE, E. Pérez, G. E. Vanderstichel, R. Dalla Villa, P. F. Serpell, J. A. **Effects of surgical and chemical sterilization on the behavior of free-roaming male dogs in Puerto Natales, Chile.** *Preventive Veterinary Medicine*, 123, 106–120. (2016). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.011>

GOMES, A. L. V. **Expressão de genes relacionados com a indução da resposta imune inata da dengue: implicações no prognóstico.** Recife: A. L. do Vale, Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 120 f.: il. (2011).

GONG, P. Li, H. He, X. Wang, K. Hu, J. Tan, W. Zhang, S. Yang, X. **Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄ Ag nanoparticles.** *Nanotechnology*, 28 (18): 604–611. (2007).

GUPTA, A. K. & Gupta, M. **Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.** *Biomaterials*, 26(18): 3995–4021. (2005).

GUPTA, N. & GUPTA, R. K. **Animal welfare and human health: Rising conflicts over stray dogs in Chandigarh.** *South Asia Research*, 39(3), 339–352. (2019). DOI: <https://doi.org/10.1177/0262728019868895>.

HA, H.K. Park, H.J. Park, N.C. **Expression of E-cadherin and α -catenin in a varicocele-induced infertility rat model.** *Asian J Androl*. 13:470–475. (2011).

HAFEZ, B. & Hafez, E. S. E. **Reprodução animal.** 7ªed. São Paulo, Manole, p. 513. (2004).

HAFEZ, E.S.E. **Effects of high temperature on reproduction.** *Int J Biometeorol* 7, 223–230. (1964). DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02187454>

HALLIWELL, B. & Whiteman, M. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?.** *British Journal of Pharmacology*, 142(2): 231-55. (2004).

HAMILTON, T. R. Mendes, C.M. de Castro, L.S. de Assis, P.M. Siqueira, A.F. Delgado, J.de C. Goissis, M.D. Muiño-Blanco, T. Cebrián-Pérez, J.Á. Nichi, M. Visintin, J.A. Assumpção, M.E. **Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen**

and epididymal sperm. *Oxid. Med. Cell Longev.* 1687657. (2016). DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/1687657>

HAND, J.W. Walker, H. Hornsey, S. Field, S.B. **Effects of hyperthermia on the mouse testis and its response to X-rays, as assayed by weight loss.** *Int J Radiat Biol*; 35:521–528. (1979).

HANSEN, P. J. **Effects of heat stress on mammalian reproduction.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 27;364(1534):3341-50. (2009). DOI: 10.1098/rstb.2009.0131.

HANUKOGLU, I. **Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells.** *Drug Metabolism Reviews* 38 171–196. (2006).

HARMON, B.V. Takano Y.S. Winterford C.M. Gobe G.C. **The role of apoptosis in the response of cells and tumours to mild hyperthermia.** *International Journal of Radiation Biology*, 59: 489-501. (1991).

HEES, H. Leiser, R. Kohler, T. Wrobel, K. **Vascular morphology of the bovine spermatic cord and testis. Light and scanning electron microscopic studies on the testicular artery and pampiniform plexus.** *Cell Tissue Res*; 237:31–38. (1984).

HEGDE, P. Qi, R. Abernathy, K. Gay, C. Dharap, S. Gaspard, R. Hughes, J. E. Snesrud, E. Lee, N. E Quackenbush, J. **A concise guide to cDNA microarray analysis.** *Biotechniques*, Boca Raton, v. 29, n. 3, p. 548-563. (2000).

HELLANI, A. Ji, J. Mauduit, C. Deschildre, C. Tabone, E. Benahmed, M. **Developmental and hormonal regulation of the expression of oligodendrocyte-specific protein/claudin 11 in mouse testis.** *Endocrinology*, 141, 3012–3019. (2000)

HESS, R.A. & Franca, L.R. **Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium.** Em: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, Cheng, C.Y. Springer Science. (2008).

HO, H.C., Lau, K.K., Ren, C., Ng, E. **Characterizing prolonged heat effects on mortality in a sub-tropical high-density city, Hong Kong.** *Int J Biometeorol*; 61: 1935 e 44. (2017).

HONDA, S. & Hirose, S. **Stage-specific enhanced expression of mitochondrial fusion and fission factors during spermatogenesis in rat testis.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 424–432. (2003).

HWANG, E.C. Min, K.D. Jung, S.I. Ryu, S.B. Ahn, K.Y. Lee, K. Park, K. **Testicular steroidogenesis is decreased by hyperthermia in old rats.** *Urol Int*; 84(3):347-52. (2010). DOI: 10.1159/000288241

ICAM. **Humane Dog Population**, Management Guidance. (2007).

ISHII, T. **Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress.** *Free Radical Research*, 39(7): 697-705. (2005).

JACQUES, S. L. **Optical properties of biological tissues: a review.** *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, no. 11, pp. R37–R61. (2013).

JANA, K. & Samanta, P. K. **Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride.** *BMC Veterinary Research*, 39. (2011). DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-39>.

JANA, K. & Samanta, P. K. **Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study.** *Contraception*, 75(5), 390–400. (2007). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2007.01.022>

JANNES, P. Spiessens, C. Van der Auwera, I. D'Hooghe, T. Verhoeven, G. Vanderschueren, D. **Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice.** *Hum Reprod*; 13:372–375. (1998).

JHUN, H.; Lee, W.-Y.; Park, J.-K.; Hwang, S.-G.; Park, H.-J. **Transcriptomic Analysis of Testicular Gene Expression in a Dog Model of Experimentally Induced Cryptorchidism.** *Cells*; 11, 2476. (2022). DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11162476>

JIVAGO, J.L.P.R.; Brito, J.L.M.; Capistrano, G.; Vinícius-Araújo, M.; Lima Verde, E.; Bakuzis, A.F.; Souza, P.E.N.; Azevedo, R.B.; Lucci, C.M. **New Prospects in Neutering Male Animals Using Magnetic Nanoparticle Hyperthermia.** *Pharmaceutics*; 13, 1465. (2021). DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091465>

JOFFILY, D.; De Souza, L. M.; Gonçalves, S. M.; Pinto, J. V.; Barcellos, M. C. B.; Alonso, L. Da S. **Medidas para o controle de animais errantes desenvolvidas pelo grupo PET Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.** *Em Extensão*, Uberlândia, MG, v. 12, n. 1. (2013). DOI: 10.14393/REE-v12n12013_re116.

- KASTELIC, J. Cook, R. Coulter, G. Saacke, R. **Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull.** *Theriogenology*; 45:935–942. (1996).
- KASTELIC, J. P. Wilde, R. E. Rizzoto, G. & Thundathil, J. C. **Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia.** *Vet. Med. (Praha)*. 62(8), 437–442. (2017).
- KASTELIC, J. P., Cook, R. B., Coulter, G. H. **Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures.** *Animal Reproduction Science*, 45(4): 255–261. (1997).
- KENNEDY, L. C. Bickford, L. R. Lewinski, N.A. Coughlin, A.J. Hu, Y. Day, E. S. West, J.L. Drezek, R.A. **A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies.** *Small* 7 (2), 169–183. (2011). DOI: 10.1002/sml.201000134.
- KHALID, M. Z. **Mechanism of Laser/light beam interaction at cellular and tissue level and study of the influential factors for the application of low-level laser therapy.** pp. 1–20. (2016).
- KIM, J.E. Shin, M.H. Chung, J.H. **Epigallocatechin-3-gallate prevents heat shock-induced MMP-1 expression by inhibiting AP-1 activity in human dermal fibroblasts.** *Archives of Dermatological Research*, 305: 595-602. (2013).
- KIMMINS, S. Kotaja, N. Davidson, I. Sassone-Corsi, P. **Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation.** *Reproduction*;128(1):5-12. (2004). DOI: 10.1530/rep.1.00170.
- KOKSAL, I.T. Ishak, Y. Usta, M. Danisman, A. Guntekin, E. Bassorgun, I.C. Ciftcioglu, A. **Varicocele-induced testicular dysfunction may be associated with disruption of blood-testis barrier.** *Arch Androl*. 53:43–48. (2007).
- KOMATSU, T. Tabata, M. Kubo-Irie, M. Shimizu, T. Suzuki, K. Nihei, Y. Takeda, K. **The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro.** *Toxicology in Vitro*, 22 (8): 1825-1831. (2008). DOI:10.1016/j.tiv.2008.08.009
- KOURY, J.C. & Donangelo, C.M. **Zinco, estresse oxidativo e atividade física.** *Revista de Nutrição*, 16(4): 433-441. (2003). DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000400007>

KUMAR, C. S. S. R. & Mohammad, F. **Magnetic nanomaterials for hyperthermiabased therapy and controlled drug delivery**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(9): 789–808. (2011).

L13426. Planalto.gov.br. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/113426.htm>. Acesso em: 2 mar. 2023.

LANONE, S. & Boczkowski, J. **Biomedical Applications and Potential Health Risks of Nanomaterials: Molecular Mechanisms**. *Current Molecular Medicine*, 6: 651-663. (2006).

LARA, N.L.M., Costa, G.M.J., Avelar, G.F., Lacerda, S.M.S.N. **Testis Physiology - Overview and Histology**. Em: *Encyclopedia of Reproduction*, 2nd edition, Volume 1, Eslevier. (2018). DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64567-1

LAURENT, S. Forge, D. Port, M. Roch, A. Robic, C. Vander Elst, L. E Muller, R. N. **Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications**. *Chemical Reviews*, 110(4): 2574–2574. (2010).

LEHNINGER, A. L. Nelson, D. L. Cox, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 839 p. (2000).

LEHNINGER, Nelson, D. L. Cox, M. M. **Principles of Biochemistry**. 4ª edição. Nova Iorque: W. H. Freeman, p.1124. (2004).

LEOCI, R., Aiudi, G., Cicirelli, V., Brent, L., Iaria, C., & Lacalandra, G. M. **Effects of intratesticular vs intraepididymal calcium chloride sterilant on testicular morphology and fertility in dogs**. *Theriogenology*, 127, 153–160. (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.006>

LEOCI, R., Aiudi, G., Silvestre, F., Lissner, E. A., Marino, F., & Lacalandra, G. M. **A dosefinding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: Evaluation of the most effective concentration with the lowest risk**. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 1–8. (2014). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0063-1>.

LEVY, J.K. Crawford, C. Appel, L.D. Clifford, E.L. **Comparsion of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs**. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (1): 140-143. (2008).

LI, J.L.& Gu M. **Gold-nanoparticle enhanced cancer photothermal therapy**. IEEE J Sel Top Quantum Electron, 16: 989 –96. (2010).

LI, W. Sol, C. Wang, F. Wang, Y. Zhai, Y. Liang, M. Liu, W. Liu, Z. Wang, J. Sun, F. **Achieving a New Controllable Male Contraception by the Photothermal Effect of Gold Nanorods**. Nano Letters, 13 (6), 2477–2484. (2013). DOI: <https://doi.org/10.1021/nl400536d>

LIFE TECHNOLOGIES. **Real Time Handbook**. Foster, (2016). Disponível em: http://find.thermofisher.com/Global/FileLib/qPCR/2016-Real-Time-qPCRHandbook_branding.pdf. Acesso em: Acesso em: 14 mar. 2023 .

LIMA, V.N.D. **“Castração Fototérmica”: Fotohipertermia Como Possível Indutor De Infertilidade Em Ratos Wistar Machos**, Universidade De Brasília Instituto De Ciências Biológicas Programa De Pós-Graduação Em Biologia Animal. (2019).

LOUGHLIN, K.R., Manson, K., Foreman, R., Schwartz, B., Heuttner, P. **The Effect of Intermittent Scrotal Hyperthermia on the Sprague-Dawley Rat Testicle**. In: Zorngniotti, A.W. (eds) Temperature and Environmental Effects on the Testis. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 286. Springer, Boston, MA. (1991). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5913-5_17

LUE, Y. Sinha, A. P. Hikim, Wang, C. Im, M. Leung, A. Swerdloff, R. S. **Testicular Heat Exposure Enhances the Suppression of Spermatogenesis by Testosterone in Rats: The “Two-Hit” Approach to Male Contraceptive Development**. The Endocrine Society, 141 (4): 1414-1424. (2000).

LUE, Y. Sinha, A. P. Hikim. Swerdloff, R. S. Im, P. Taing, K. S. Bui, T. Leung, A. Wang, C. **Single Exposure to Heat Induces Stage-Specific Germ Cell Apoptosis in Rats: Role of Intratesticular Testosterone on Stage Specificity**. The Endocrine Society, 140 (4): 1709- 1717. (1999).

MÄKELÄ, JA., & Toppari, J. **Spermatogenesis**. In: Simoni, M., Huhtaniemi, I. (eds) Endocrinology of the Testis and Male Reproduction. Endocrinology. Springer, Cham. (2017). DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-44441-3_13

MALHEIROS, J.M. Enríquez-Valencia, C.E. da Silva Duran, B.O. de Paula, T.G. Curi, R.A. de Vasconcelos Silva, J.A.II; Dal-Pai-Silva, M. de Oliveira, H.N. Chardulo, L. A. L. **Association of**

- CAST2, HSP90AA1, DNAJA1 and HSPB1 genes with meat tenderness in Nellore cattle.** Meat Sci; 138:49-52. (2018). DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.01.003.
- MARLET, E. F. & Maiorka, P. C. Retrospective analyzes of cruelty toward dogs and cats in the city of São Paulo.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 47(5), 385–394. (2010). DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2010.26820>
- MARRA, K. N. Detecção por PCR em tempo real e identificação molecular de Clostridium estertheticum proveniente de carne bovina e ambientes de matadouros–frigoríficos brasileiros.** Kelly Nobre Marra. – Goiania, GO: UFG. (2012).
- MARTIANOV, I. Fimia, G-M. Dierich, A. Parvinen, M. Corsi, P, S-. e Davidson, I. Late Arrest of Spermiogenesis and Germ Cell Apoptosis in Mice Lacking the TBP-like TLF/TRF2 Gene.** Molecular Cell, v. 7, n. 3, p. 509–515. (2001). DOI: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00198-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00198-8)
- MARTINHAGO, S. S. & Magalhães, T. A. P. A ineficácia das políticas públicas para o controle de animais de rua em Cascavel/PR.** Diálogos e Interfaces do Direito, 1(1), 117–130. (2018).
- MASSEI, G. & Miller, L. A. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: A review of products and criteria for field applications.** Theriogenology, 80(8), 829– 838. (2013). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.016>.
- MASSEI, G., Fooks, A.R., Horton, D.L., Callaby, R., Sharma, K., Dhakal, I.P., Dahal, U. Free-Roaming Dogs in Nepal: Demographics, Health and Public Knowledge, Attitudes and Practices.** Zoonoses and Public Health, 64, 29–40. (2016).
- MATES, J.M. Perez-Gomez M C. & Nunez, de C. I. Antioxidant enzymes and human diseases.** Clinical Biochemistry 32 595–603. (1999).
- MCCABE, M. Waters, S. Morris, D. Kenny, D. Lynn, D. E Creevey, C. RNA-seq analysis of differential gene expression in liver from lactating dairy cows divergent in negative energy balance.** BMC genomics, v. 13, n. Vldl, p. 193–193. (2012).
- MCMANUS, C.M. Faria, D.A. Lucci, C.M. Louvandini, H. Pereira, S.A. Paiva, S.R. Heat stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant?** Theriogenology. 1; 155:157-167. (2020). DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.05.047.

- MENEZES, R. **Rabies in India**. Canadian Medical Association Journal, 178: 564–566. (2008).
- MERVE, C. & Elmas, C. **The Effects of oxidative stress and some of the popular antioxidants on reproductive system: a mini review**. Journal of Nutrition & Food Sciences, 6(2): 464. (2016).
- MIEUSSET, R. & Bujan, L. **Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review**. Int J Androl; 18:169–184. (1995).
- MIEUSSET, R. Quintana Casares, P. Sanchez Partida, L.G. Sowerbutts, S.F. Zupp, J.L. Setchell, B. P. **Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen**. J Reprod Fertil; 94:337–34. (1991).
- MONTICONE, M. Panfoli, I. Ravera, S. Puglisi, R. Jiang, M.M. Morello, R. Candiani, S. Tonachini, L. Biticchi, R. Fabiano, A. Cancedda, R. Boitani, C. Castagnola, P. **The nuclear genes Mtfr1 and Dufd1 regulate mitochondrial dynamic and cellular respiration**. J Cell Physiol; 225(3):767-76. (2010). DOI: 10.1002/jcp.22279
- MONTICONE, M. Tonachini, L. Tavella, S. Degan, P. Biticchi, R. Palombi, F. Puglisi, R. Boitani, C., Cancedda, R. Castagnola, P. **Impaired expression of genes coding for reactive oxygen species scavenging enzymes in testes of Mtfr1/Chppr-deficient mice**. Reproduction 134, 3, 483-492. (2007). DOI:10.1530/REP-07-0199
- MOREY, J. S. Ryan, J. C. Van dolah, F. M. **Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR**. Biological procedures online, v. 8, n. 1, p. 175. (2006).
- MORTAZAVI, A. Williams, B. A. Mccue, K. Schaeffer, L. E Wold, B. **Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq**. n. May, p. 1–8. (2008).
- NASSAR, R., & FLUKE, J. **Pet population dynamics and community planning for animal welfare and animal control**. Journal of American Veterinary Medicine Association, 198 (7): 1160 –1164. (1991).
- NOOKAEW, I. Papini, M. Pornputtpong, N. Scalcinati, G. Fagerberg, L. Uhlén, M. Nielsen, J. **A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in Saccharomyces cerevisiae**. Nucleic acids research, v. 40, n. 20, p. 10084–97. (2012).

NOORI, S. **An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system.** Open Access Sci Rep, 1(8). (2012).

NORMAN, J. B. Suzanne, L. Phillips, D. G. Wallace, M. S. Kevin, W. Gaido, P. M. D. F. **Quantitative Changes in Gene Expression in Fetal Rat Testes following Exposure to Di(n-butyl) Phthalate.** Toxicological Sciences, Volume 73, Issue 2, Pages 431–441. (2003). DOI: 10.1093/toxsci/kfg087

NOVAIS, C.M. & Alves, M.P. **qPCR em tempo real.** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Edição n° 33. p. 10 – 13. (2004).

NSET. **Nanoscale Science, Engineering, and Technology.** NSET Workshop Report, Editores ROCO, M & BAINBRIDGE, W.S. (2001).

OBERDORSTER, G. Maynard, A. Donaldson, K. Castranova, V. Fitzpatrick, J. Ausman, K. Carter, J. Karn, B. Kreyling, W. Lai, D. Olin, S. Monteiro-Riviere, N. Warheit, D. Yang, H. **Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanoparticles: elements of a screening strategy.** Particle and Fibre Toxicology, 2 (8): 1-35. (2005).

OBERDORSTER, G. **Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology.** Journal of Internal Medicine, 267(1):89-105. (2010). DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x.

OKWEE-ACAI, J., Omara, R., Onyait, J. S., Agwai, B., Okullo, P., & Acon, J. **An evaluation of pinhole castration as an alternative technique for dog population control in resource-poor communities.** Bulletin of Animal Health and Production in Africa, 61(3), 337–345. (2013).

OLIVEIRA, B. A. S., Rocha, L. M., Valle, G. R. **Métodos cirúrgicos e não cirúrgicos de contracepção masculina em cães.** Sinapse Múltipla, 1(1): 1–14. (2012).

OLIVEIRA, E. C. S., Fagundes, A. K. F., Melo, C. C. S., Nery, L. T. B., Rêvoredó, R. G., Andrade, T. F. G., Oliveira-Esquerre, K., Kastelic, J. P., & Silva, V. A. **Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: A randomized clinical trial of efficacy and safety.** Veterinary Journal, 197(2), 307–310. (2013). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.011>

OLIVEIRA, E. C. S., Moura, M. R. P., De Sa, M. J. C., Silva, V. A., Kastelic, J. P., Douglas, R. H. & Marques, A. P. **Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution.** *Theriogenology*, 77, 1056-1063. (2012).

OLSON, P. N. **New developments in small animal population control.** *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 202, 904-909. (1993).

OSHLACK, A. Robinson, M. D. Young, M. D. **From RNA-seq reads to differential expression results.** *Genome biology*, v. 11, n. 12, p. 220–220. (2010).

PAN, J. Zhu, Z. Xu, G. Niu, L. Yu, L. Luo, Z. Yan, J. **Expression of claudin-11 in a rat model of varicocele and its effects on the blood-testis barrier.** *Molecular Medicine Reports*, 18, 5647-5651. (2018). DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9603>

PANYALA, N.R. Pena-Mendez, E.M. Havel, J. **Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?** *Journal of Applied Biomedicine*, 6, 70 117–129. (2008).

PARANZINI, C. S., Sousa, A. K., Cardoso, G. S., Perencin, F. M., Trautwein, L. G. C., Bracarense, A. P. F. R. L., & Martins, M. I. M. **Effects of chemical castration using 20% CaCl₂ with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment.** *Theriogenology*, 106, 253–258. (2018). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.013>

PATEL, J.K., Patel, A., Bhatia, D. **Introduction to Nanomaterials and Nanotechnology.** In: Patel, J.K., Pathak, Y.V. (eds) *Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing*. Springer, Cham. (2021). DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-50703-9_1

PATIL, S. S. Patil, A. B. Patil, M. M. Nikam, P. B. Mahadik, Y. M., Londhe, S. R., Kamble, N. A. **Testicular hyperthermia in Rattus norvegicus: focus on gamatocytic alterations.** *Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6): 93– 103. (2014).

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.** *Biol. Reprod.* 80, 913–919. (2009).

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.** *Mol Reprod Dev*; 75(1):40-7. (2008). DOI: [10.1002/mrd.20759](https://doi.org/10.1002/mrd.20759).

- PETERSON, M.E; Talcott, P.A. **Small animal toxicology**. Saunders, 2ª edição. (2012).
- PIERCE, B.A. **Genética: um enfoque conceitual**. 3ª edição. Guanabara Koogan, 774 p. (2011).
- PINEL, S. Thomas, N. Boura, C. Barberi-Heyob, M. **Approaches to physical stimulation of metallic nanoparticles for glioblastoma treatment**. *Adv Drug Deliv Rev* 138:344–357. (2019).
- PITSILLIDES, C. M. Joe E. K. Wei X. B. Anderson, R. R., Lin, C. P. **Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles**. *Biophys. J.*, 84: 4023– 4032. (2003).
- PRYOR, J., Hughes, C., Foster, W., Hales, B., Robaire, B. **Critical windows of exposure for children’s health: the reproductive system in animals and humans**. *Environmental Health Perspectives*, 108 (3): 491–503. (2000).
- QIN, Z. & Bischof, J. C. **Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating**. *Chem. Soc. Rev*, 41: 1991–1217. (2012).
- RAFATMAH, D., Mogheiseh, A., & Eshghi, D. **Chemical sterilization with intratesticular administration of zinc gluconate in adult dogs: a preliminary report**. *Basic and Clinical Andrology*, 29(1), 1–9. (2019). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0092-8>
- RAHMAN, M. Vandaele, L. Rijsselaere, 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*; 76:1246–1257. (2011). DOI: [10.1016/j.theriogenology.2011.05.031](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.031).
- REECE, W. O., Howard, H. E., Goff, J. P., Uemura, E. E. **Duke’s Physiology of Domestic Animals**. (W. O. Reece, H. E. Howard, J. P. Goff, & E. E. Uemura, Eds.) (13th ed.). Ithaca. (2015).
- RENAUDEAU, D. Collin, A. Yahav, S. de Basilio, V. Gourdine, J. L. and Collier, R. J. **Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production**. *Animal* 6, 707–728. (2012).
- REYES, J. G. Farias, J.G. Henríquez-Olavarrieta, S. Madrid, E. Parraga, M. Zepeda, A.B. Moreno R.D. **The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology**. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 929285, (2012). DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/929285>

RIZZOTO, G. Boe-Hansen, G. Klein, C. Thundathil, J.C. Kastelic, J.P. **Acute mild heat stress alters gene expression in testes and reduces sperm quality in mice.** *Theriogenology*. Dec; 158:375-381. (2020). DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.10.002.

RIZZOTO, G., & Kastelic, J.P. **A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants?.** *Theriogenology*; 147: 166 e 175. (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.019>

ROBINSON, T. L. Sutherland, I. A. Sutherland, J. **Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 160-165. (2007).

ROCKETT, J. C. & Dix, D. J. **Application of DNA arrays to toxicology.** *Environ Health Perspect*; 107:681–686. (1999).

ROCKETT, J. C. & Dix, D. J. **DNA arrays: technology, options and toxicological applications.** *Xenobiotica*; 30:155–177. (2000).

ROGERS, S. Girolami, M. Kolch, W. Waters, K. M. Liu, T. Thrall, B. E Wiley, H. S. **Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models.** *Bioinformatics*, v. 24, n. 24, p. 2894-2900. (2008).

ROJAS-Downing, M.M., Nejadhashemim A.P., Harrigan, T., Woznicki, S.A. **Climate change and livestock: impacts, adaptation, and mitigation.** *Clim Risk Manag*; 16: 145 e 63. (2017).

ROSA, G. J. M. Rocha, L. B. Furlan, L. R. **Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica.** *R. Bras. Zootec.* v.36, suplemento especial, p.185-209. (2007).

SACCHI, Cláudio T. **Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz.** *Boletim Epidemiológico Paulista* Volume 4 Número 40 ISSN 1806-4272. (2007).

SAILER, B.L., Sarker, L.J., Bjordahl, J.A., Jost, L.K., Evenson, D.P. **Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure.** *J Androl*; 18: 294 e 301. (1997)

SALVATO, F. Carvalho, M. C. D. C. G. **Methods and strategies in proteomics and their applications in plants.** *Ciência Rural*, v.40, n. 3, p. 727-734. (2010).

SAMPAIO, G.R., Silva, F.R.C., Salan, M.O. **Controle Populacional de Caninos e Felinos por meio da Esterilização Cirúrgica**. IX Congresso de Extensão da UFLA, realizado entre 27 e 31 de outubro de (2014).

SANTANA, J. O. D. **Análise histomorfométrica e oxidativa do testículo de ratos provenientes de fêmeas induzidas ao diabetes do tipo 2 e submetidas ao tratamento com metformina e pentoxifilina**. Universidade federal rural de pernambuco pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação programa de pós-graduação em ciência animal tropical [s.l.]. (2018). Disponível em: <http://www.pgcat.ufrpe.br/sites/pgcat.ufrpe.br/files/documentos/tese_2.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2021.

SCANLON, V.C. & Sanders, T. **Essentials of Anatomy and Physiology**. 5ed. F. A. Davis Company. (2007).

SCHATTEN, H., & Constantinescu, G.M. **Comparative Reproductive Biology**. Blackwell. (2007).

SCHOLEY, R. Evans, N. J. Blowey, R. W. Massey J. P. Murray R. D. Smith, R. F. Ollier, W. E. Carter S. D. **Identifying host pathogenic pathways in bovine digital dermatitis by RNA-Seq analysis**. Veterinary journal (London, England: 1997), v. 197, n. 3, p. 699–706. (2013).

SELLINS, K. S. Cohen, J. J. **Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes**. Radiation Research, 126(1): 88–95. (1991).

SETCHELL, B. P. **The effects of heat on the testes of mammals**. International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 3(2): 81–91. (2006).

SETCHELL, B. **The scrotum and thermoregulation**. In: Setchell B (ed.) The Mammalian Testis. Ithaca: Cornell University Press, pp. 90–108. (1978).

SETCHELL, B. Voglmayr, J. Hinks, N. **The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious ram**. J Reprod Fertil; 24:81–89. (1971).

SETCHELL, B.P. & Waites, G.M. **The effects of local heating of the testis on the flow and composition of rete testis fluid in the rat, with some observations on the effects of age and unilateral castration**. J Reprod Fertil, 30, pp. 225-23. (1972). DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0300225>

SETCHELL, B.P. Ekpe, G. Zupp, J.L. Surani, M. A. **Transient retardation in embryo growth in normal female mice made pregnant by males whose testes had been heated.** Hum Reprod; 13:342–347. (1998);

SETCHELL, B.P., Waites, G.M., Thorburn, G.D. **Blood flow in the testis of the conscious ram measured with krypton 85.** Circ Res; 18: 755 e 65. (1966).

SHARMA, R. & Agarwal, A. **Spermatogenesis: An Overview. Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction,** Springer. (2011).

SHERWOOD, L. **Human physiology: from cells to systems.** 8a edição, USA. (2013).

SILVA, R. C. A., Paranzini, C. S., Franco, L. G., Miguel, M. P., Honsho, C. S., & Souza, F. F. **Calcium chloride combined with dimethyl sulphoxide for the chemical sterilization of dogs.** Reproduction in Domestic Animals, 53(6), 1330–1338. (2018). DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13252>

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana.** 5ª ed, Artmed. (2010).

SKINNER, J. Louw, G. **Heat stress and spermatogenesis in Bos indicus and Bos taurus cattle.** J Appl Physiol; 21:1784–1790. (1966)

SLIMEN, B. Najar, T. Ghram, A. & Abdrrabba, M. **Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review.** Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 100, 401–412. (2016).

SMOYER-Tomic, K.E., Kuhn, R., Hudson, A. **Heat wave hazards: an overview of heat wave impacts in Canada.** Nat Hazards; 28: 465 e8 6. (2003).

SOARES, J. A. G.; SILVA, P. A. R. **Castração precoce em cães e gatos.** Rev. Clínica Veterinária, São Paulo, Ano III, n. 13, p. 34-40. (1998).

SOUMENDRA, N. K., & Das, S. K. **Chemosterilization induced by intratesticular injection of calcium chloride (CaCl₂) - a tool for population control.** International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences, 7(1), 25–35. (2017).

STOCCO, D.M. Clark, B.J. **Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells.** Endocr Rev;17(3):221-244. (1996). DOI:10.1210/edrv-17-3-221.

STOCCO, D, M. Zhao, A. H. Tu, L.N. Morohaku K, Selvaraj V. **A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis.** Mol Cell Endocrinol.; 441:7-16. (2017). DOI:10.1016/j.mce.2016.07.036

TEPSUMETHANON, V., WILDE, H., HEMACHUDHA, T. **Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs.** J. Med. Assoc. Thai. 88: 686 –689. (2005).

TIAN, Q. Stepaniants, S.B. Mao, M. Weng, L. Feetham, M.C. Doyle, M.J. Yi, E.C. Dai, H. Thorsson, V. Eng, J. Goodlett, D. Berger, J.P. Gunter, B. Linsley, P.S. Stoughton, R.B. Aebersold, R. Collins, S.J. Hanlon. W. A. Hood, L. E. **Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells.** Mol Cell Proteomics;3(10):960-9. (2004). DOI: 10.1074/mcp.M400055-MCP200.

TICHOPAD, A. **Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up.** Nucleic Acids Research, v. 31, n. 20, p. 122e–122. (2003).

TONACHINI, L. Monticone, M. Di Marco, E. Zerega, B. Cancedda, R. Castagnola. P. **Chondrocyte protein with a polyproline region is a novel protein expressed by chondrocytes in vitro and in vivo.** Biochimica et Biophysica Acta 1577 421–429. (2002).

TONACHINI, L. Monticone, M. Puri, C. Tacchetti, C. Pinton, P. Rizzuto, R. Cancedda, R. Tavella, S. Castagnola, P. **Chondrocyte protein with a polyproline region (CHPPR) is a novel mitochondrial protein and promotes mitochondrial fission.** Journal of Cellular Physiology 201 470–482. (2004).

TURRENS, J.F. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** The Journal of Physiology, 552(335–344): 1469-7793. (2003).

UNFRIED, K. Albrecht, C. Klotz, L.O. Mikecz, A.V. Grether-Beck, S. Schins, R.P.F. **Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms.** Nanotoxicology, 1(1): 52-71. (2007). DOI: 10.1080/00222930701314932

VALENÇA, R. M. B. & Guerra, M.M.P. **Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, 31(1): 47-53. (2007).

VANGUILDER, H. H; Vrana, K. E. Freeman, W. M. **Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis.** BioTechniques, London, v. 44, p. 619 – 626. (2008).

VANPUTTE, C., Regan, J., Russo, A., Deeley, R., Stephens, T., Tate, P. **Seeley's Anatomy & Physiology**. 10th ed, McGraw-Hill. (2014).

VASCONCELOS, S. M. L. Goulart, M. O. F. Moura, J.B.F. Manfredini, V. Benfato, M.S. Kubota, L.T. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação**. *Quimica Nova*, 30(5): 1323-1338. (2007). DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>

VERNET, P. Aitken, R. J. Drevet, J.R. **Antioxidant strategies in the epididymis**, *Molecular and Cellular Endocrinology*. Volume 216, Issues 1–2, Pages 31-39. ISSN 0303-7207. (2004). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.069>.

VERRATTI, V. Berardinelli, F. Di Giulio, C. Bosco, G. Cacchio, M. Pellicciotta, M. Nicolai, M. Martinotti, S. Tenaglia, R. **Evidence that chronic hypoxia causes reversible impairment on male fertility**. *Asian. J. Androl.* 10, 602–606. (2008). DOI: 10.1111/j.1745-7262.2008.00346.x.

VERRATTI, V. Di Giulio, C. Berardinelli, F. Tiboni, G.M. Pellicciotta, M. Brunetti, L. Ferrante, C. Orlando, G. Bianchi, G. Cacchio, M. Vacca, M. Tenaglia, R. **Pampiniform plexus and oxidative stress during chronic hypoxia and hyperoxia**. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 21, 353–357. (2008). DOI: 10.1177/039463200802100212.

WAITES, G. Setchell, B. **Physiology of the mammalian testis**. In: Lamming CE (ed.) *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th edn, Vol. 2. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 1–105. (1990).

WANG, K. Zhang, D.L. Long, B. An, T. Zhang, J. Zhou, L.Y. Liu, C.Y. Li, P.F. **NFAT4-dependent miR-324-5p regulates mitochondrial morphology and cardiomyocyte cell death by targeting Mtfr1**. *Cell Death Dis.* Dec 3;6(12): e. (2015). DOI: 10.1038/cddis.2015.348.

WANG, Z. Gerstein, M. Snyder, M. **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics**. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57-63. (2009).

WEI, S.-M.; Yan, Z.-Z.; Zhou, J. **Involvement of Reactive Oxygen Species and TATA Box-binding Protein-related Factor 2 in Testicular Torsion/Detorsion-induced Injury**. *Urology*, v. 81, n. 2, p. 466.e9–466.e14. (2013).

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**. *J Anim Sci*; 42:664–669. (1976).

WHILLIER, S. KUCHEL, P. W.; RAFTOS, J. E. **Oxidative stress in type ii diabetes mellitus and the role of the endogenous antioxidant glutathione.** In: Croniger, C. (Ed.). *Role of the Adipocyte in Development of Type 2 Diabetes.* InTech. (2011).

WIEBE, J. P. & Barr, K. J. **The control of male fertility by 1,2,3-trihydroxypropane (THP; glycerol): Rapid arrest of spermatogenesis without altering libido, accessory organs, gonadal steroidogenesis, and serum testosterone, LH and FSH.** *Contraception*, 29(3), 291–302. (1984). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(84\)80009-8](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(84)80009-8)

WILDEUS, S & Entwistle, K. **Spermiogram and sperm reserves in hybrid *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls after scrotal insulation.** *J Reprod Fertil*; 69:711–716. (1983).

WSPA. **Surveying roaming dog populations: guidelines on methodology.** *Companion & Working Animals Unit*, 20. (2012).

YANG, W.R. Liao, T.T. Bao, Z.Q. Zhou, C.Q. Luo, H.Y. Lu, C. Pan, M.H. Wang, X.Z. **Role of AMPK in the expression of tight junction proteins in heat-treated porcine Sertoli cells.** *Theriogenology*; 121:42-52. (2018). DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.08.005

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. **What Is Oxidative Stress?** *JMAJ*, 45(7):271–276. (2002).

YU, T.J., LI, P.H., TSENG, T.W., CHEN, Y.C. **Multifunctional Fe₃O₄/alumina core/shell MNPs as photothermal agents for targeted hyperthermia of nosocomial and antibiotic-resistant bacteria.** *Nanomedicine*, 6(8): 1353-63. (2011).

ZHANG, W.-X.; Qin, J.-C.; Wang, R.; Wang, L.; Zhang, J. **Radiation-induced oxidative stress and claudin-11 mRNA expression in the testis.** *Zhonghua Nan Ke Xue*, 19, 306–310. (2013).

ZHANG. D, Penttila. TL, Morris. PL, Teichmann. M, Roeder. R, G. **Spermiogenesis deficiency in mice lacking the *Trf2* gene.** *Science*. 11;292(5519):1153-5. (2001). DOI: 10.1126/science.1059188.

ZHAO, D. L. Zhang, H. L. Zeng, X. W. Xia, Q. S. Tang, J. T. **Inductive heat property of Fe₃O₄/polymer composite nanoparticles in an ac magnetic field for localized hyperthermia.** *Biomed Mater*. 1(4):198-201. (2006). DOI: 10.1088/1748-6041/1/4/004