



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**FOTOHIPERTERMIA COMO POSSÍVEL INDUTORA DE INFERTILIDADE EM
RATOS WISTAR MACHOS**

VANESSA NICOLAU DE LIMA

Brasília - 2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**“CASTRAÇÃO FOTOTÉRMICA”: FOTOHIPERTERMIA COMO POSSÍVEL
INDUTOR DE INFERTILIDADE EM RATOS WISTAR MACHOS**

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

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Animal.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Carolina Lucci, que me acolheu e me ajudou a crescer academicamente.

Aos meus pais, Rosane e Dielson, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e acreditaram em mim.

À minha esposa, Juliana Lis e nossas filhas, Natasha e Mel, meus maiores amores, motivos de todos os dias eu levantar e enfrentar mesmo as coisas mais difíceis sem desistir.

À minha sogra dona Ivani e minha cunhada Marcia, pelas ajudas no dia a dia, pelo carinho e cuidado.

Às amigas, Mariana Marzullo e Talita Ramos, e ao meu amigo, Andrei Buslik por todos os anos de amizade e conselhos.

Às amigas de laboratório, Marcella Motta, Cecibel León e em especial a Aline Ramos que realizou as ultrassonografias.

Aos laboratórios parceiros que tornaram possível a execução do projeto. Professor Dr. Andris Figueiroa Bakuzis do Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica (UFG), e aos alunos Ailton Antônio De Sousa Júnior e Marcos Vinícius Araujo. Professor Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza do Laboratório de Software e Instrumentação em Física Aplicada (UnB) e aos alunos Rodrigo Barbosa Nunes e Carlos Adir Ely Murussi Leite.

À professora Dr.^a Mônica Pereira Garcia por disponibilizar o EVOS.

Ao Biotério do Instituto de Biologia da UnB, principalmente ao veterinário responsável dr. Jivago por manter os animais.

Ao professor Dr. Sergio Moya do Centro de Investigación Cooperativa de Biomateriales, CIC biomaGUNE pela oportunidade de fazer parte do projeto Marie Curie HIGRAPHEN.

Ao programa de pós-graduação de Biologia Animal e as agências de fomento Capes, CNPq e FAP-DF pelo financiamento.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a efetividade da fototerapia (FHT) em testículos de ratos Wistar como indutor de infertilidade. Foram utilizados 25 ratos Wistar (16 semanas de idade). O tratamento FHT consistiu na injeção intratesticular de fluido magnético combinado com a irradiação por LED apenas nos testículos até atingir a temperatura 45 °C. Vinte oito testículos foram submetidos ao tratamento de FHT (grupo FHT). Oito testículos receberam apenas a injeção intratesticular do fluido magnético (Grupo NPM), e 14 testículos foram submetidos apenas a irradiação do LED. Os animais dos grupos NPM e LED foram eutanasiados 7 dias após o tratamento. Os animais do grupo tratamento FHT foram eutanasiados 7, 28 e 56 dias após o tratamento. Foram feitas ultrassonografias dos testículos semanalmente até o dia da eutanásia. Após a eutanásia os órgãos foram fixados para histologia, a cauda dos epidídimos foi macerada para avaliações espermáticas. Os testículos foram fixados para análise histomorfológica. A ultrassonografia dos testículos e epidídimos mostrou um aspecto geral com parênquima homogêneo, textura lisa e limites bem definidos. O volume testicular médio diminuiu significativamente da primeira semana (4,48 cm³) para a 2ª semana (3,70 cm³), e novamente da 4ª (3,63 cm³) para a 5ª semana (1,92 cm³). Em 17,5% dos casos apresentou uma região hiperecótica extensa adjacente aos testículos sugerindo processo inflamatório dos epidídimos, confirmado durante a eutanásia. A motilidade espermática mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos grupos tratados FHT28 e FHT56 (27,6% 24,2% respectivamente) quando comparados aos grupos FHT7 (91,5%), grupo LED (100%) e grupo NPM (100%). Houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides normais no grupo FHT7 (1%) em comparação ao grupo tratamento FHT56 (38%) e aos grupos controles NPM (67%) e LED (57%) e um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de patologias de cabeça no grupo tratado FHT7 (32%) em comparação com o grupo LED (15%) e aumento significativo ($p < 0,05$) no número de patologias de cauda no grupo tratamento FHT7 (68%) comparado aos grupos controles NPM (17%) e LED (28%). O número de espermatozoides na cauda do epidídimo não mostrou diferença estatística entre os grupos tratados e controle, apesar dos valores numéricos serem bem diferentes. Os parâmetros sanguíneos de hemograma e bioquímicos estavam dentro dos limites de normalidade para a espécie, ainda que vistas algumas alterações foram observadas, sem correlação com o tratamento. A histologia permitiu observar que o grupo LED apresentou estrutura dos túbulos seminíferos intacta com a presença de todas as células da linhagem germinativa. O grupo NPM apresentou alguns danos teciduais, com infiltrado dentro dos túbulos seminíferos provavelmente devido a algum efeito tóxico da nanopartícula. O grupo FHT7 apresentou túbulos com células danificadas, em alguns casos inchadas, sendo permitido identificar apenas células de Sertoli e espermatogônias e com nanopartículas visíveis no espaço intersticial. O grupo FHT28 apresentou túbulos seminíferos preenchidos com células desorganizadas com a maior parte dos túbulos vazios, mas na região da periferia do testículo alguns túbulos estavam preservados. No grupo FHT56 os danos estavam presentes nos túbulos seminíferos e no interstício, com vacúolos no epitélio tubular, com nanopartículas mais agregadas e melhor distribuída no tecido. Rim, fígado, baço e pulmão apresentaram característica microanatômicas íntegras. O uso da fototerapia associada a injeção intratesticular do fluido magnético afim de induzir infertilidade em ratos Wistar machos mostrou ser eficiente no curto prazo (56 dias), sem efeitos colaterais graves. No entanto, o efeito não foi completo, provavelmente por não ter havido homogeneidade da distribuição das nanopartículas em todo o testículo. Mais estudos são necessários no sentido de aperfeiçoar o método e obter um efeito de esterilização completo.

PALAVRAS CHAVE: Esterilização de machos; castração térmica; espermatogênese; túbulo seminífero, nanopartículas magnéticas, fototerapia.

ABSTRACT

The objective of the study is to investigate the effectiveness of photohyperthermia (FHT) in testes of Wistar rats as inducer of infertility. Wistar rats (16 weeks old) were used. The FHT treatment was consisted of an intratesticular injection of magnetic fluid combined with irradiation of LED light in the testes till reach the temperature of 45°C. Twenty-eight testes were submitted to FHT treatment (FHT group). Eight testes received intratesticular injection of the magnetic fluid (NPM Group), and 14 testicles were submitted only to LED irradiation. Animals from the NPM and LED groups were euthanized 7 days after treatment. The animals in the FHT treatment group were euthanized 7, 28 and 56 days after treatment. Ultrasonography of the testes was performed weekly until the day of euthanasia. After euthanasia the organs were fixed for histology, and the tail of the epididymides was macerated for sperm evaluations. The testes were fixed for histomorphological analysis. Ultrasonography of the testes and epididymides showed a general appearance with homogeneous parenchyma, smooth texture and well defined limits. The mean testicular volume decreased significantly from the first week (4.48 cm³) to the second week (3.70 cm³), and again from the 4th (3.63 cm³) to the 5th week (1.92 cm³). In 17.5% of the cases, there was an extensive hyperechoic region adjacent to the testis suggesting an inflammatory process of the epididymis, confirmed during euthanasia. Sperm motility showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the treated groups FHT28 and FHT56 (27.6% 24.2% respectively) when compared to the FHT7 (91.5%), LED (100%) and NPM group (100%). There was a significant ($p < 0.05$) decrease in the percentage of normal spermatozoa in the FHT7 group (1%) compared to the FHT56 treatment group (38%) and the control groups NPM (67%) and LED (57%) significant increase ($p < 0.05$) in the number of head pathologies in the treated group FHT7 (32%) compared to the LED group (15%) and significant increase ($p < 0.05$) in the number of tail pathologies in the FHT7 treatment group (68%) compared to NPM (17%) and LED (28%) control groups. The number of spermatozoa in the tail of the epididymis showed no statistical difference between the treated and control groups, although the numerical values were quite different. Hemogram and biochemical blood parameters were within the limits of normality for the species, although some alterations were observed, without correlation with the treatment. The histology allowed to observe that the LED group presented structure of the seminiferous tubules intact with the presence of all the cells of the germinative lineage. The NPM group presented some damage in the tissue, with infiltrate within the seminiferous tubules, probably due to some toxic effect of the nanoparticle. The FHT7 group presented tubules with damaged cells, in some cases swollen, being possible to identify only Sertoli cells and spermatogonia with visible nanoparticles in the interstitial space. The FHT28 group presented seminiferous tubules with disorganized cells, most of the tubules empty, but in the periphery of the testis some tubules were preserved. In the FHT56 group the damage occurred in the seminiferous tubules and the interstitium, with vacuoles in the tubular epithelium, nanoparticles more aggregated and better distributed in the tissue. Kidney, liver, spleen and lung presented intact microanatomic characteristics. The use of photohyperthermia associated with intratesticular injection of magnetic fluid to induce infertility in male Wistar rats was shown to be efficient in the short term (56 days) with no serious side effects. However, the effect was not complete, probably because there was no homogeneity in the distribution of the nanoparticle throughout the testis. Further studies are needed in order to improve the method and obtain a complete sterilization effect

KEY WORDS: Sterilization of males; thermal castration; spermatogenesis; seminiferous tubule, magnetic nanoparticles, photothermia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. Revisão de Literatura	8
2.1. Animais errantes.....	8
2.2. Sistema reprodutor masculino	9
2.2.1. Fisiologia do sistema reprodutor masculino	9
2.2.2. Espermatogênese.....	10
2.2.3. Termorregulação testicular	11
2.3. Métodos de esterilização de machos	12
2.4. Nanomateriais e nanobiotecnologia.....	13
2.5. Hipertermia	14
2.6. “Castração-Fototérmica”	16
3. Justificativa.....	17
4. Objetivos	18
4.1. Objetivos gerais	18
4.2. Objetivos específicos	18
5. Material e métodos	19
5.1. Comitê de ética.....	19
5.2. Nanopartícula magnética	19
5.3. Animais	19
5.4. Desenho experimental	19
5.5. Parâmetros avaliados	22
5.6. Processamento histológico.....	23
5.7. Análise estatística	23
6. Resultados	24
7. Discussão.....	41
8. Conclusão	46
9. Referências bibliográficas	47
Apêndice A – Ilustração do espectro eletromagnético	54

1. Introdução

Aproximadamente 75% da população mundial de cães vive em situação de abandono. Uma das maiores preocupações acerca desse número é o elevado grau de reprodução desses animais. E assim, acabam se tornando risco de saúde pública através de transmissões de doenças, desequilíbrio biológico por predação de animais de pequeno porte, contaminação ambiental por dispersão de lixo doméstico, ataques, mordidas, atropelamentos e poluição sonora.

O controle da população por meio da castração e educação das pessoas a respeito da posse responsável é o método mais indicado. Atualmente existem dois tipos de castração para machos: a castração cirúrgica e a castração não cirúrgica.

A castração cirúrgica, é o método de eleição, que consiste na retirada total dos testículos (orquiectomia). Mas, apesar de eficiente, apresenta alto custo, necessidade de ambiente controlado, profissionais especializados e risco de pós-operatório.

Já a castração química é realizada por meio de injeções intratesticulares a base de uma solução de glucanato de zinco. As vantagens desse método são o custo baixo, a possibilidade de esterilizar uma quantidade maior de animais em um único dia, simplicidade do processo e ausência de pós-operatório. No entanto, a castração química causa inflamação e desconforto nos animais, e ainda não apresenta relatos provando que esse método seja irreversível.

A nanotecnologia possibilita o uso de materiais em nanoescala em pesquisas biomédicas, buscando novos tratamentos para doenças, diagnósticos por imagem, engenharia de tecidos e administração de medicamentos. Nanomateriais, como nanopartículas metálica, permitem aquecer quando expostos a uma fonte de calor – hipertermia.

A aplicação de hipertermia seria um método alternativo de castração para machos, considerando que a produção de espermatozoides requer baixas temperaturas. Essa elevação temporária da temperatura testicular pode danificar células da linhagem germinativa causando a interrupção da espermatogênese. Já foi visto em um estudo realizado por Fahin (1975) que o aquecimento testicular é capaz de prejudicar a formação de gametas masculinos em ratos Wistar. Assim como, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, demonstraram que a magnetohipertermia testicular induzida por nanopartículas em ratos Wistar revelou danos à espermatogênese em um estudo a curto prazo (56 dias) (Rôlo, 2016)

Por tanto, utilizar uma injeção intratesticular de nanopartícula de ferrita de manganês zinco associada a uma irradiação de luz por LED gerando um aquecimento na região testicular

mostra ser um tratamento promissor como um possível método de castração por fotohipertermia.

2. Revisão de Literatura

2.1. Animais errantes

A estimativa mundial da população de cães é de 700 milhões (Hughes & Macdonald, 2013), e calcula-se que aproximadamente 75% desses animais se encontram em situação de abandono (WSPA, 2007). Há uma grande preocupação com relação ao aumento desse número, uma vez que cães e gatos atingem maturidade sexual por volta dos seis meses de idade, possuem acelerado grau de reprodução e apresentam gestações curtas, com cerca de 60 dias.

Se considerarmos que um casal de gatos possa produzir oito filhotes por ano, considerando uma proporção sexual de 50% e taxa de mortalidade ao longo de sete anos esse casal pode ser progenitor de 174 gatos. Esse número pode subir para 781 mil em sete anos se cada um desses gatos continuar se reproduzindo da mesma forma (Olson & Johnston, 1993). Essa superpopulação acaba se tornando um problema mundial que gera transtornos públicos (Nassar & Fluke, 1991), causando desequilíbrio biológico por predação de animais silvestres de pequeno porte, contaminação ambiental por dejetos espalhados de lixos nas ruas, proliferação de parasitas como pulgas, carrapatos e sarna, doenças que podem ser transmitidas ao homem, agressões, acidentes de trânsito e poluição sonora (ICAM, 2007).

Como medida de manejo de animais errantes, os Centros de Controle de Zoonose (CCZ) foram criados e utilizam a captura e eutanásia como método de redução dessa população (Schneider *et al.*, 1996). No entanto, esse procedimento não se mostra eficaz, pois além do extermínio em massa de animais sadios, apresenta custo elevado e vai contra os princípios humanitários dos direitos dos animais (Reichmann, *et al.*, 2000). Nos últimos anos, várias leis já foram criadas, como a Lei nº 12.916 de 16/04/2008, trazendo algumas mudanças nos CCZ. Além de não permitir a eutanásia de animais sadios, aumentou o prazo de permanência de animais no Centro para 90 dias. Antes dessa lei, os animais ficavam entre três a cinco dias à espera do dono para serem eutanasiados. Desta maneira, os CCZ passaram a atender apenas emergências, como ataques de animais agressivos, doentes ou que invadiram algum lugar privado.

Uma alternativa aos CCZ é a esterilização em larga escala aliada à conscientização da adoção responsável - aplicada em vários países (Bortoloti & D'Agostino, 2007).

Outra forma de controle para colônias de felinos e matilhas de determinados locais é a técnica denominada Captura, Esterilização e Devolução (CED), no intuito de oferecer melhor qualidade de vida para esses animais através da castração, vacinação e monitoramento dessas colônias, já realizada em países como Estados Unidos, Canadá e Reino Unido (Boone & Slater, 2014).

A esterilização é uma das medidas de controle da população de cães e gatos mais eficientes, uma vez que evita o aumento do número desses animais nas ruas. Pesquisas a cerca de alternativas de esterilização são necessárias, principalmente relacionado ao controle de machos, considerando que cada macho é um reprodutor em potencial, já que a produção de espermatozoides é contínua desde a puberdade ao final da vida, pois cada macho não esterilizado contribui para o aumento do número de fêmeas gestantes (Oliveira *et al.*, 2011).

2.2. Sistema reprodutor masculino

2.2.1. Fisiologia do sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino dos mamíferos é constituído por: pênis, saco escrotal, 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 são responsáveis pela produção de hormônio sexual, definindo características do indivíduo do sexo masculino, e a espermatogênese, produzindo os espermatozoides (Reece *et al.*, 2015).

O compartimento tubular é composto pelos túbulos seminíferos que contêm dois tipos celulares, as células espermatogênicas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) produtoras de espermatozoides, e as células de Sertoli, que dão sustentação e suporte ao processo da espermatogênese (Figura 1). Essas células se unem umas às outras criando junções oclusivas, que separam os compartimentos basal e adluminal, conhecido como barreira hematotesticular. Essa barreira faz com que qualquer substância atravesse primeiro as células de Sertoli, impedindo assim uma resposta imune do corpo contra os gametas em desenvolvimento. Entre os túbulos seminíferos encontram-se as células de Leydig, que secretam testosterona, hormônio que incita a manifestação das características masculinas, da libido e possui um papel importante na espermatogênese (Tortora & Derrickson, 2010).

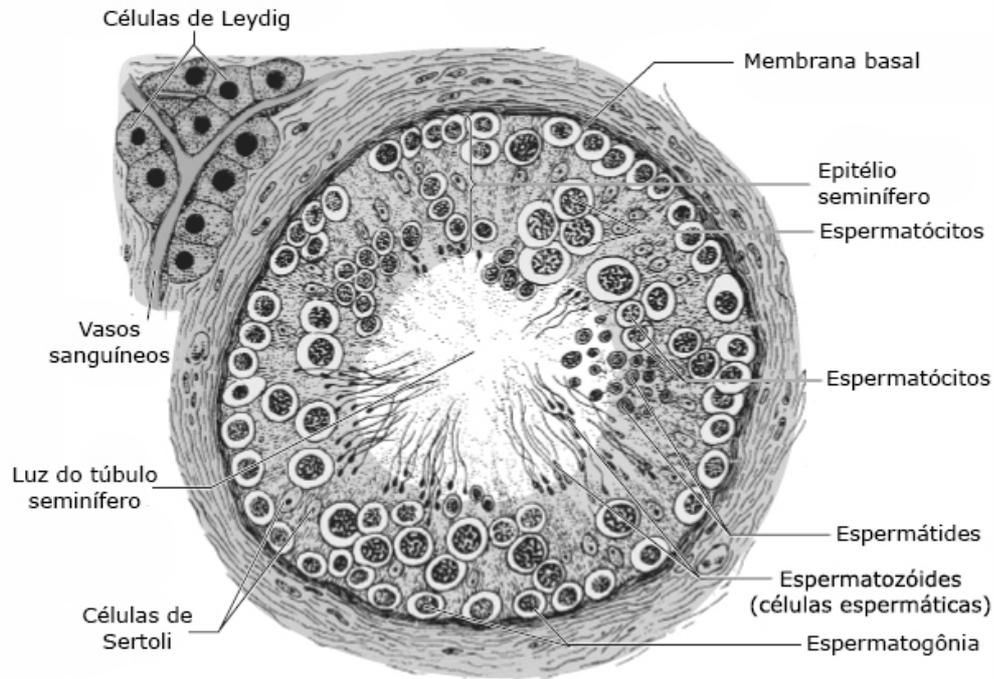


Figura 1: Epitélio seminífero

Adaptado de Faller & Shunke, 2004

2.2.2. Espermatogênese

A espermatogênese é uma sequência complexa que ocorre nos túbulos seminíferos, onde as células da linhagem germinativa se dividem a fim de produzir células-filhas e consequentemente se diferenciar em espermatozoides (Koeppen & Stanton, 2009). Esse processo pode ser dividido em três fases: proliferação de espermatogônias, meiose e diferenciação de espermatídeos em espermatozoides. Assim, inicia-se na puberdade e continua durante a vida adulta dos indivíduos do sexo masculino (Sharma & Agarwal, 2014).

Quando a maturidade sexual é atingida, as células espermatogênicas se organizam em estágios, com ciclos ordenados, conhecido como ciclo do epitélio seminífero. Assim que as espermatogônias do tipo B entram na espermatogênese em algum ponto do túbulo seminífero, após um intervalo de tempo um novo grupo de espermatogônias do tipo B entra na espermatogênese, desta forma as células espermatogênicas anteriores passam para um estágio mais avançado de desenvolvimento, que ocorre de forma sincronizada. Este ciclo garante que a espermatogênese se inicie e se propague de forma definida, dentro dos túbulos seminíferos os grupos de células espermatogênicas encontram-se em estágios específicos da espermatogênese. A duração do ciclo, assim como da espermatogênese é sempre constante em cada espécie, mas é diferente entre elas. A duração entre o ciclo do epitélio seminífero e a espermatogênese

apresenta uma relação bastante precisa, sendo o ciclo do epitélio seminífero um quarto da duração da espermatogênese (Schatten & Constantinescu, 2008; Reece et al., 2015).

A mitose é a primeira fase da espermatogênese e tem como função assegurar um grande número de células germinais, que são classificadas de acordo com o estado de diferenciação envolvendo as espermatogônias do tipo A e B. As células espermatogênicas de reserva são espermatogônias do tipo A, essas quando se dividem geram outra espermatogônia do tipo A e uma do tipo B. As espermatogônias do tipo A substituem as células precursoras enquanto as espermatogônias do tipo B passam por um número pré-determinado de mitoses (espécie-específico) e entram em meiose e a partir daí os espermatócitos primários são produzidos (Reece et al., 2015; Sharma & Agarwal, 2014).

No processo de meiose, os espermatócitos primários passam pela primeira divisão meiótica dando origem a dois espermatócitos secundários. Duas divisões sucessivas ocorrem nessa fase, a fim de produzir quatro espermátides esféricas haploides a partir de espermatócitos diploides. Essas espermátides sofrem diferenciação através do processo conhecido como espermiogênese, onde ocorre a diferenciação das espermátides em espermatozoides. Nesse processo, mudanças morfológicas ocorrem, como o alongamento da espermátide, condensação do núcleo e formação do acrossomo e a cauda se desenvolve (Sharma & Agarwal, 2014).

Os espermatozoides são desconectados das células de Sertoli, ocorrendo a espermição, em seguida esses espermatozoides vão para o lúmen dos túbulos seminíferos, e com a ajuda de um líquido secretado pelas células de Sertoli são empurrados pelos túbulos em direção aos epidídimos, pois ainda são incapazes de se movimentar (Tortora e Derrickson, 2009). E só então, nos epidídimos, ocorre a maturação completa dos espermatozoides, quando seus flagelos se tornam funcionais, e lá podem ficar armazenados durante vários meses (Koeppen & Stanton, 2009).

2.2.3. Termorregulação testicular

Nos mamíferos, para que a espermatogênese ocorra de maneira adequada, é necessário que a temperatura dos testículos esteja entre 3 °C a 4 °C abaixo da temperatura corporal. A localização dos testículos na bolsa escrotal é um mecanismo que assegura a baixa temperatura testicular (Kastelic *et al.*, 1997). Isto pode ser exemplificado por casos de criptorquidia, que se caracteriza por uma falha na descida dos testículos para o escroto, alojando-se, então, na cavidade abdominal. Animais criptorquídicos apresentam o testículo retido hipoplásico e não

funcional, com concentração espermática reduzida, apesar de mostrar aspectos sexuais secundários normais (Hafez & Hafez, 2004).

Dessa forma, o aumento na temperatura dos testículos leva à uma redução na produção de espermatozoides, assim como resulta numa diminuição da motilidade e aumento da porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais (Hansen, 2009). Tais efeitos também podem ser observados quando há elevação da temperatura testicular (Setchell, 2006).

O estudo de Fahim e colaboradores (1975) demonstrou que a fertilidade pode ser afetada temporariamente em ratos machos quando submetidos a fontes diferentes de calor. Para isso, foram utilizados 300 ratos machos, divididos em cinco 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 testicular aumentada a 60 °C durante 15 minutos por um aquecedor de ponto infravermelho concentrando a energia radiante de uma lâmpada de ciclo iodo de 750 watts focada nos testículos, Grupo IV que foram tratados com uma unidade de diatermia por micro-ondas irradiando energia a 2450 mega-ciclos por 1,5 ou 15 minutos e Grupo V que utilizou ultrassom 1.0 w/cm² aplicado uma ou duas vezes nos testículos. Depois de 10 meses de experimento os resultados obtidos mostraram que no Grupo II houve uma diminuição significativa de espermatozoides e espermátides em comparação com o Grupo controle. O Grupo III apresentou ausência de espermatozoides e 20-25% dos estágios da espermatogênese dentro dos túbulos seminíferos. No grupo IV indicou 100% de ausência da espermatogênese. No Grupo V, quando submetido a uma aplicação, houve redução no número de espermatozoides, espermátides e espermátides secundárias; quando expostos a duas aplicações, 100% dos túbulos seminíferos mostraram ausência dos estágios de espermatogênese.

2.3. Métodos de esterilização de machos

Os métodos de esterilização para machos visam interromper a produção de espermatozoides. Atualmente, estes métodos podem ser divididos em cirúrgico e não cirúrgico. A esterilização cirúrgica pode ser realizada de duas maneiras: orquiectomia (Cohen *et al.*, 1990) ou vasectomia (Oliveira *et al.*, 2012). A orquiectomia, consiste na retirada total dos testículos, ainda é o método mais seguro e efetivo (Reichmann *et al.*, 2000). Entretanto, apesar da sua efetividade, apresenta alto custo, uma vez que requer profissionais especializados, anestesia geral do animal, equipamentos médicos, ambiente controlado, risco cirúrgico e monitoramento pós-operatório (Oliveira *et al.*, 2012).

A vasectomia, por sua vez, é uma alternativa que visa eliminar o potencial reprodutivo através da oclusão dos ductos, mantendo a função testicular e as características masculinas. Comportamentos indesejáveis, no entanto, ainda continuarão a ocorrer, como por exemplo a competição por fêmeas, agressividade e marcação de território, pois a esteroidogênese não é afetada (Bowen, 2008).

Há mais de cinco décadas, várias drogas vêm sendo pesquisadas como possibilidade de esterilização de cães machos. Um tipo de esterilização não cirúrgica utilizando uma solução química de glucanato de zinco neutralizada pela arginina (Neutersol, Addison Biological Laboratory Inc.) injetada nos testículos, epidídimos ou ducto deferente causando a interrupção da espermatogênese foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos em 2003, causando esclerose nos testículos e conseqüentemente infertilidade (Massei & Miller, 2013).

O zinco é um elemento importante para espermatogênese em baixas concentrações, porém pode ser prejudicial em altas concentrações, inibindo a divisão e replicação das células germinativas (Fahim *et al.*, 1993). É uma alternativa vantajosa por poder ser realizada com um número menor de profissionais treinados, uma vez que não necessita de ambiente esterilizado, com apenas uma aplicação de injeção local e com tempo de anestesia reduzido (Levy *et al.*, 2008). No entanto, já foram relatadas reações adversas como inflamação nos testículos, edema, ulceração (Tepsumethanon *et al.*, 2005), dermatite, automutilação escrotal, inchaço do prepúcio, vômitos, diarreia, anorexia, letargia e leucocitose (Kutzler & Wood, 2006).

Estudos comparativos entre os métodos de castração cirúrgica e a injeção intratesticular de glucanato de zinco já demonstraram que algumas reações são mais severas que as relacionadas à castração cirúrgica (Levy *et al.*, 2008). A reação inflamatória no local da aplicação pode ser causada devido a uma ruptura da barreira hemato-testicular. Além disso, ainda há poucos estudos sobre seus efeitos colaterais e a sua efetividade a longo prazo é desconhecida (Oliveira *et al.*, 2012).

2.4. Nanomateriais e nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia é o ramo da tecnologia que vem se destacando desde a década de 1990 com o desenvolvimento de materiais em escala nanométricas, em especial nanopartículas (NP) devido as inúmeras aplicações tecnológicas e biomédicas, como sistema de “*drug-delivery*”, diagnóstico por imagem, direcionamento de células e terapia fototérmica (Pitsillides *et al.*, 2003; Oberdörster *et al.*, 2005; Doane & Burda, 2012). Barkalina e colaboradores (2014),

em uma revisão, destacaram os principais benefícios do uso da nanotecnologia, focando na avaliação dos efeitos do tratamento do câncer, e também destacando as pesquisas desenvolvidas em tratamentos para doenças cardiovasculares, neurológicas, gastrointestinais, doenças autoimunes, infecções e até mesmo doenças reprodutivas, como infertilidade.

As nanopartículas magnéticas vem sendo largamente estudadas, principalmente, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs), devido as aplicações clínicas, como administração de medicamentos, ressonância magnética e hipertermia. (Yu *et al.*, 2011). As nanopartículas de óxido de ferro podem apresentar um núcleo de nanopartícula inorgânica com cobertura na superfície que oferece biocompatibilidade, fornecendo, assim, estabilidade em condições fisiológicas (Berry, 2009). Para melhorar a biocompatibilidade e biodistribuição, os materiais utilizados para revestimento da superfície podem ser polímeros sintéticos, natural, como dextrano ou proteínas (Berry *et al.*, 2003; Berry *et al.*, 2004a; Berry *et al.*, 2004b) ou moléculas anfífilas, como ácidos graxos ou fosfolípidios, evitando aglomerações ou precipitações, aumentando a estabilidade com ambientes fisiológicos (Wang, *et al.*, 2001; Euliss *et al.*, 2003; Gupta & Gupta, 2005; Lu *et al.*, 2007; Laurent *et al.*, 2008;).

2.5.Hipertermia

A hipertermia é um procedimento terapêutico que aquece os tecidos acima da temperatura fisiológica normal, sendo, principalmente, uma alternativa para o tratamento de câncer por apresentar baixo efeito colateral (Matsumine, 2011), consiste em aumentos moderados de temperatura variando entre 41 °C e 46 °C, podendo ser obtida através de diferentes fontes de energia, incluindo campo magnético, lasers, pulso de radiofrequência e ultrassonografia (Fang & Chen, 2013). Essa elevação de temperatura causa morte das células por degradação da membrana da parede celular, desnaturação da proteína ou produção de espécie reativa de oxigênio (ROS), induzindo-as à apoptose (Christophi *et al.*, 1998; Harmon *et al.*, 1991; Sellins & Cohen, 1991). O tratamento por hipertermia acima de 46 °C pode resultar na morte celular em poucos minutos (Deatsch & Evans, 2014), e esse evento é conhecido como termoablação (Kumar & Mohammad, 2011).

A fotohipertermia tem a capacidade de converter energia luminosa em calor, afim de causar danos às células malignas, como câncer ou bactérias (Li & Gu, 2010; Fang & Chen, 2013). Pitsillides e colaboradores (2011) foram um dos pioneiros na utilização da fotohipertermia, conjugando nanopartículas de látex dopado com óxido de ferro com propriedade superparamagnéticas (SPIONs) e nanopartículas de ouro ligadas a um anticorpo

específico, resultando em uma técnica não invasiva, com pouco efeito colateral, além de não ter causado danos às células saudáveis. No entanto, a resposta óptica global é determinada pela combinação das nanopartículas com o tecido biológico, e as propriedades do tecido precisam ser entendidas, pois os tecidos biológicos apresentam várias estruturas, como múltiplos compartimentos: células, vasos sanguíneos e espaço intersticial, isso pode afetar as propriedades ópticas do tecido, fazendo com que a absorção e dispersão globais sejam diferentes. Os absorvedores comuns que absorvem no tecido são água, hemoglobina e melanina, e cada componente vai responder de acordo com o comprimento de onda e a absorção total vai depender da composição do tecido (Qin & Bischof, 2012).

O sucesso da fototerapia depende dos nanomateriais utilizados, assim como as propriedades de absorção, a janela de comprimento de onda entre o visível e o infravermelho pode variar entre 700 a 1100 nm, sendo denominada janela terapêutica ou janela de infravermelho próximo (NIR). Uma imagem ilustrativa da janela de comprimento de onda está demonstrada no apêndice A. Essa janela está ligada ao intervalo entre os absorvedores e o comprimento de onda NIR em meio biológico (Qin & Bischof, 2012). Os agentes fototérmicos mais utilizados são nanopartículas como: nanopartículas magnéticas, nanotubos de carbono e nanomateriais de ouro, como nanopartículas de ouro, nanobastões de ouro e nanoshells de ouro (Li & Gu, 2010; Fang & Chen, 2013).

As nanopartículas magnéticas (NPMs) são utilizadas associadas a um campo magnético externo com frequência alternada (AC) que respondem dissipando o calor (Wang *et al.*, 2010) e têm sido utilizadas para aplicações como administração de medicamentos (Kumar & Jain, *et al.*, 2008; Mohammad, 2011), ressonância magnética (Chertok *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2008) e hipertermia (Kumar & Mohammad, 2011). Na hipertermia as nanopartículas presentes no fluido magnético podem ser guiadas a um alvo específico, afim de permitir a absorção de energia por um campo magnético externo alternado afim de degradar as células malignas (Gupta & Gupta, 2005; Laurent *et al.*, 2008; Kumar & Mohammad, 2011).

Os nanotubos de carbono (NTCs) tem aplicações em bioconjugação, biossensibilização, administração de medicamentos e aplicações terapêuticas. Possuem a capacidade de absorver a luz NIR e convertê-la em energia térmica, sendo um ótimo agente fototérmico (Bianco *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007).

As nanopartículas de ouro são muito utilizadas na biomedicina para marcação, detecção, liberação molecular, entrega de medicamentos e hipertermia (Shah *et al.*, 2014), além de terapia imunocomprometedora (Zharov *et al.*, 2005; Bardhan *et al.*, 2010) e terapia gênica (Everts *et*

al., 2006). Costumam ser biofuncionalizadas com anticorpos, biomoléculas, antibióticos ou vetores adenovirais (Zharov *et al.*, 2005; Bardhan *et al.*, 2010). São excelentes agentes fototérmico devido às propriedades ópticas NIR e infravermelho (IR) (Alkilany *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2012). Após a irradiação de luz, as nanopartículas se ligam às membranas celulares gerando microbolhas capazes de causar danos ou morte celular (Zharov *et al.*, 2005). As nanopartículas de ouro, apresentam absorção óptica na região visível entre 500nm e 600nm (Li & Gu, 2010).

2.6. “Castração-Fototérmica”

Para que a espermatogênese ocorra de maneira adequada, é necessário que a temperatura dos testículos esteja abaixo da temperatura corporal. Quando os testículos são expostos a aumento de temperatura diretamente no local, verifica-se que a espermatogênese é afetada e consequentemente a produção de espermatozoides (Fahim *et al.*, 1975).

No estudo de curto prazo (56 dias) realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando a magnetohipertermia nos testículos de ratos Wistar, revelou, através de cortes histológicos, danos aos túbulos seminíferos com ausência das células da linhagem germinativa (Rôlo, 2016).

Considerando isso, a “castração-fototérmica” seria uma nova alternativa de esterilização para machos, ainda mais simples, com o aumento da temperatura testicular através de injeção intratesticular de nanopartículas magnéticas aplicadas à irradiação não-ionizante de LED no comprimento de onda de 810 nm.

3. Justificativa

Existe uma preocupação a cerca do elevado número de animais errantes e a elevada taxa de reprodução desses animais que conseqüentemente acabam se tornando preocupação de saúde publica devido, principalmente, a transmissão de doenças. O controle populacional realizado pelos Centros de Controle de Zoonoses através da captura e eutanásia se mostrou um método ineficiente ao longo dos anos, pois gera gastos públicos, ciclo de mortes continuas e vai contra os direitos humanitários dos animais. Sendo assim, várias leis vêm sendo criadas no intuito de mudar essa prática. A medida mais efetiva, ainda é a esterilização, porém a castração cirúrgica não supre a demanda, pois apresenta custo elevado, sendo necessário uma equipe de profissionais especializados e um ambiente cirúrgico controlado. A castração não cirúrgica (castração química) é a única alternativa à castração cirúrgica, já apresentou efeitos colaterais, em alguns casos, mais severos que os da castração cirúrgica, e além disso, não existem relatos provando a efetividade a longo prazo desse método. Dessa forma ainda há necessidade de desenvolver métodos alternativos. Considerando que a espermatogênese depende da baixa temperatura testicular para ocorrer de maneira adequada o uso da fotohipertermia como uma nova alternativa para o método de castração, pode ser uma solução viável devido ao baixo custo e a sua praticidade, pois não necessita centro cirúrgico e nem anestesia geral, apenas sedação para manter os animais imóveis. Também dispensa cuidados pós tratamento, como uso de antibiótico e anti-inflamatório por pelos menos 10 dias pós o tratamento.

4. Objetivos

4.1. Objetivos gerais

Investigar a efetividade da aplicação de fototerapia em testículos como indutor de infertilidade em ratos Wistar machos.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos a curto prazo da injeção intratesticular do fluido magnético e da fototerapia na estrutura testicular dos ratos;
- Avaliar os efeitos a curto prazo da injeção intratesticular do fluido magnético e da fototerapia sobre a produção espermática dos ratos.

5. Material e métodos

5.1. Comitê de ética

Esse projeto está aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), UnBDOC n° 75/2017.

5.2. Nanopartícula magnética

Foi utilizada uma nanopartícula magnética (NPM) de óxido de ferro, sintetizada no Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica, Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás na forma de um fluido magnético, previamente caracterizadas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) com 11 ± 3 nm de diâmetro (Figura 2).

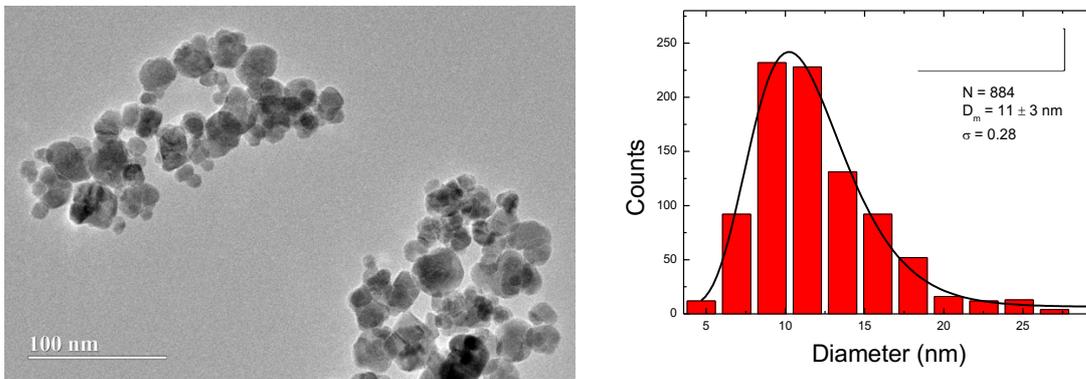


Figura 2: Micrografia eletrônica das nanopartículas de óxido de ferro e gráfico da distribuição das partículas.

5.3. Animais

Foram utilizados 25 ratos (N= 50 testículos) Wistar machos, com aproximadamente 16 semanas de vida, mantidos no biotério da Universidade de Brasília, alojados em gaiolas a temperatura ambiente sob um ciclo claro/escuro de 12 h com livre acesso a comida e água.

5.4. Desenho experimental

O experimento foi dividido de acordo com o número de testículos (N=50) (Figura 3). Os testículos submetidos a fototerapia (FHT) receberam a injeção intratesticular do fluido magnético em três pontos diferentes, para que o fluido possa ficar melhor distribuído por todo o testículo (Figura 4) e imediatamente receberam a incidência de luz do LED para produzir fototerapia testicular. Esses testículos foram subdivididos com relação ao dia da eutanásia, sendo formados os subgrupos FHT7 (N=8), FHT28 (N=10) e FHT56 (N=10), nos quais os animais foram eutanasiados após 7, 28 e 56 dias do tratamento, respectivamente. O grupo

tratamento FHT7/LED recebeu a injeção intratesticular do fluido magnético apenas nos testículos direitos e foram submetidos à fotohipertermia, enquanto o testículo esquerdo foi submetido apenas à luz do LED para serem avaliados como controle após receberem a mesma intensidade luminosa do testículo tratado, grupo controle LED (N=8). O grupo controle NPM (N=8) recebeu apenas injeção intratesticular do fluido magnético. Um grupo de animais teve ambos os testículos (N=6) submetidos apenas a incidência de luz do LED na superfície do escroto sem receber injeção do fluido magnético, grupo controle LED 45°.

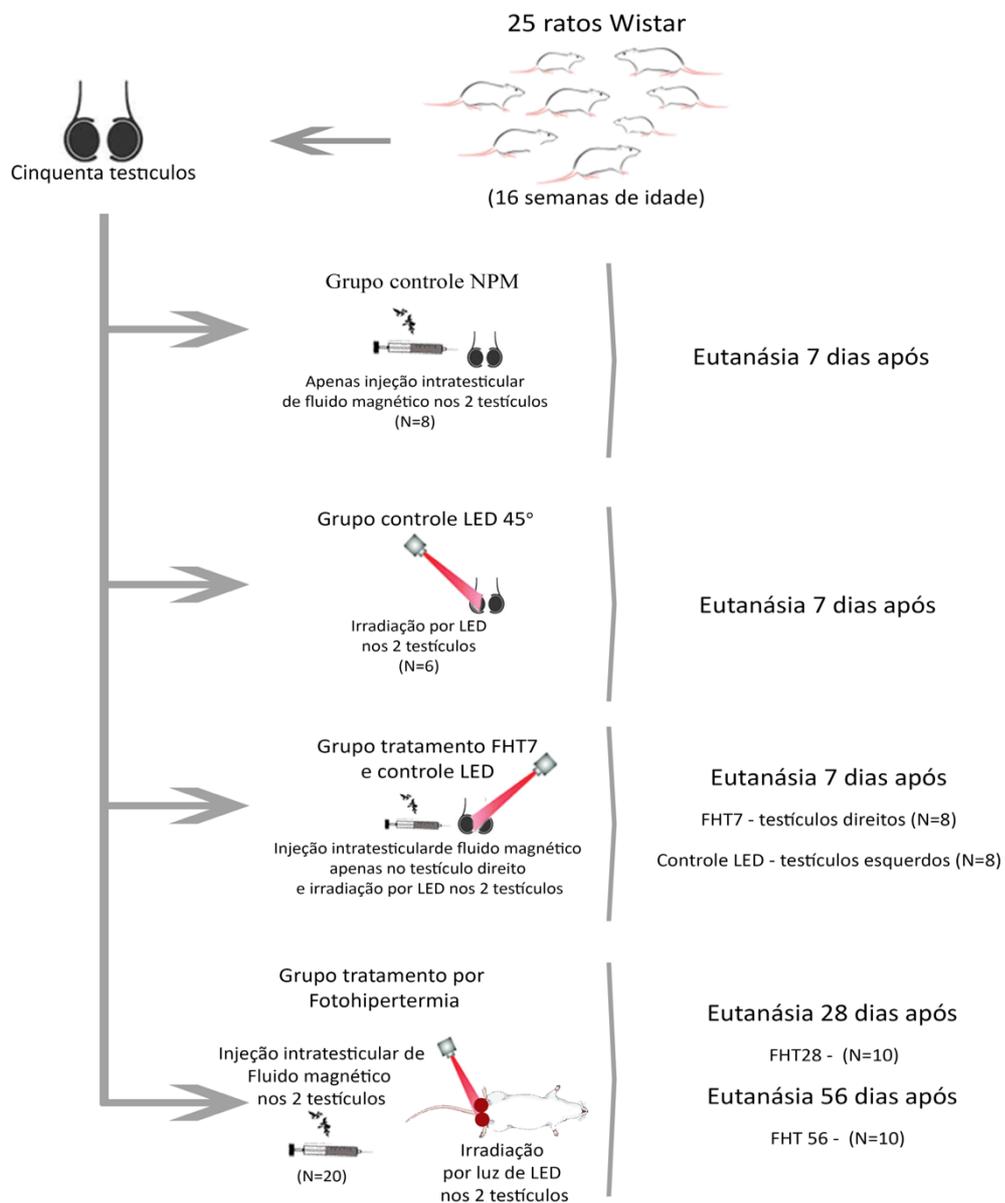


Figura 3: Desenho experimental. NPM: Nanopartículas magnéticas; FHT: Fotohipertermia. O N de cada grupo se refere ao número de testículos que foram submetidos a cada tratamento.



Figura 4: Injeção intratesticular da solução de nanopartícula magnética sendo injetada em três pontos distintos.

No dia do tratamento (D0) todos os animais foram pesados e anestesiados com Cetamina (Cetamin®, Syntec, 90 mg/kg) e Xilazina (Calmun®, Agener União, 10 mg/kg). Após a injeção do fluido magnético da NPM os animais do grupo FHT foram, imediatamente, submetidos a fotohipertermia sob irradiação de luz por LED (Figura 5). O tratamento consistiu em um sistema que manteve a temperatura estável em 45 °C utilizando a potência luminosa do LED para fornecer energia à amostra. Dessa forma, as nanopartículas absorveram a energia luminosa, convertendo em energia térmica, elevando a temperatura do composto e dos testículos¹. Além disso, uma câmera termográfica FLIR® (FLIR Systems, Wilsonville, USA) T420 foi utilizada para observar a alteração de calor da região testicular durante o procedimento.

¹ Essa parte foi realizada em colaboração com Rodrigo Barbosa Nunes (aluno de mestrado do Laboratório de Softwares e Instrumentação - IFD/UnB) e o Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza (Professor orientador)



Figura 5: Posicionamento do animal e dos termopares durante o procedimento de fotohipertermia testicular.

Após o tratamento todos os animais, exceto os tratados apenas com o LED, receberam uma dose de analgésico e anti-inflamatório (Banamine – 1,1 mg/Kg) via subcutânea e foram avaliados visualmente quanto a manifestações de dor e sinais de inflamação nas primeiras 8 h e diariamente durante a primeira semana.

5.5. Parâmetros avaliados

Os animais foram pesados diariamente e observados com relação a comportamento geral, sinais de dor e de inflamação. Cada animal foi submetido à coleta de aproximadamente 0,8 ml de sangue no dia anterior ao tratamento e no dia da eutanásia. O sangue foi utilizado para realização de hemograma completo e testes de função hepática (ALT, AST) e renal (Ureia e Creatinina).

Toda semana uma ultrassonografia da bolsa escrotal foi realizada para avaliar tamanho e aparência geral dos testículos e epidídimos.

Após sete dias da fotohipertermia ocorreram as eutanásias dos animais do grupo NPM, dos animais do grupo LED e dos animais do grupo FHT7/LED. Os animais do grupo FHT28 foram eutanasiados 28 dias após o tratamento. E os animais grupo FHT56 foram eutanasiados 56 dias após o tratamento. As eutanásias ocorreram por overdose de barbitúricos (Cetamina e Xilazina) e punção cardíaca.

De cada animal, foram retirados os dois testículos e epidídimos, fígado, baço, rins e pulmões. Os testículos foram separados dos epidídimos, medidos e pesados. A cabeça e a cauda dos epidídimos foram separadas, a cabeça foi fixada com fixador Bouin por 24 horas, assim como os testículos. As caudas dos epidídimos foram maceradas em 2 mL de solução salina aquecida (37 °C) em uma placa aquecedora para preservar a temperatura dos espermatozoides.

Uma gota da suspensão foi imediatamente colocada em uma lâmina para avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis em microscópio biológico (Modelo E100, Nikon Instruments, Shanghai, China). Em seguida, 1 mL da suspensão resultante foi separado e adicionado a 1 mL de formalina 10%, fixados para posterior análise de morfologia espermática e para determinar concentração de espermatozoides na cauda dos epidídimos. Para morfologia espermática foram contadas 200 células de cada lavado epididimário. A determinação da concentração espermática foi feita em câmara de Neubauer (CBRA, 1998). Os demais órgãos foram pesados e fixados para análises histopatológicas conforme descrito abaixo.

5.6. Processamento histológico

Os órgãos destinados às análises histopatológicas foram fixados em solução de Bouin por cinco horas e em seguida lavados em álcool 50% (2-3 banhos de uma hora). As amostras foram então desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast® (Sigma). Foram feitos cortes com espessura de 5 µm, os quais foram montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (EVOS™ FL Auto Imaging System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A histologia dos testículos avaliou a estrutura geral do órgão, organização dos túbulos seminíferos e foram verificadas a presença de células da linhagem germinativa, integridade da lâmina basal e possíveis alterações no parênquima e estroma testicular. Os outros órgãos (baço, fígado, rins e pulmões) foram avaliados quanto à sua estrutura e integridade gerais.

5.7. Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos pela Média ± Desvio Padrão da Média. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e então foram comparados os controles e tratamentos pela Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, com um critério de significância de 5% ($p < 0,05$).

6. Resultados

Durante a fotohipertermia, não houve nenhum tipo de intercorrência. Antes do aparelho de emissão de luz do LED ser ligado, os termopares marcavam a temperatura externa dos testículos entre 29 °C a 31 °C, ao início do tratamento, a temperatura subia gradativamente até que atingisse 45 °C, a partir desse momento, o software controlava a potência do feixe de luz para que a temperatura fosse mantida. Uma pequena variação na temperatura entre os testículos do mesmo animal foi observada, possivelmente devido ao posicionamento dos animais em relação ao feixe de luz do LED, pois apesar de terem sido posicionados da mesma maneira, existe algumas pequenas diferenças anatômicas, e por isso um dos testículos acabou ficando mais próximo do feixe de luz, onde o aquecimento é maior. Nos animais do grupo tratamento FHT7 a diferença de temperatura se mostrou maior, uma vez que apenas o testículo direito recebeu a injeção do fluido magnético (Figura 6).

A câmera termográfica utilizada para observar a alteração de calor da região testicular durante o procedimento, marcou uma temperatura até 3 °C abaixo da temperatura obtida pelo termopar, e pôde mostrar que apenas a região dos testículos aqueceu durante o tratamento de fotohipertermia (Figura 7).

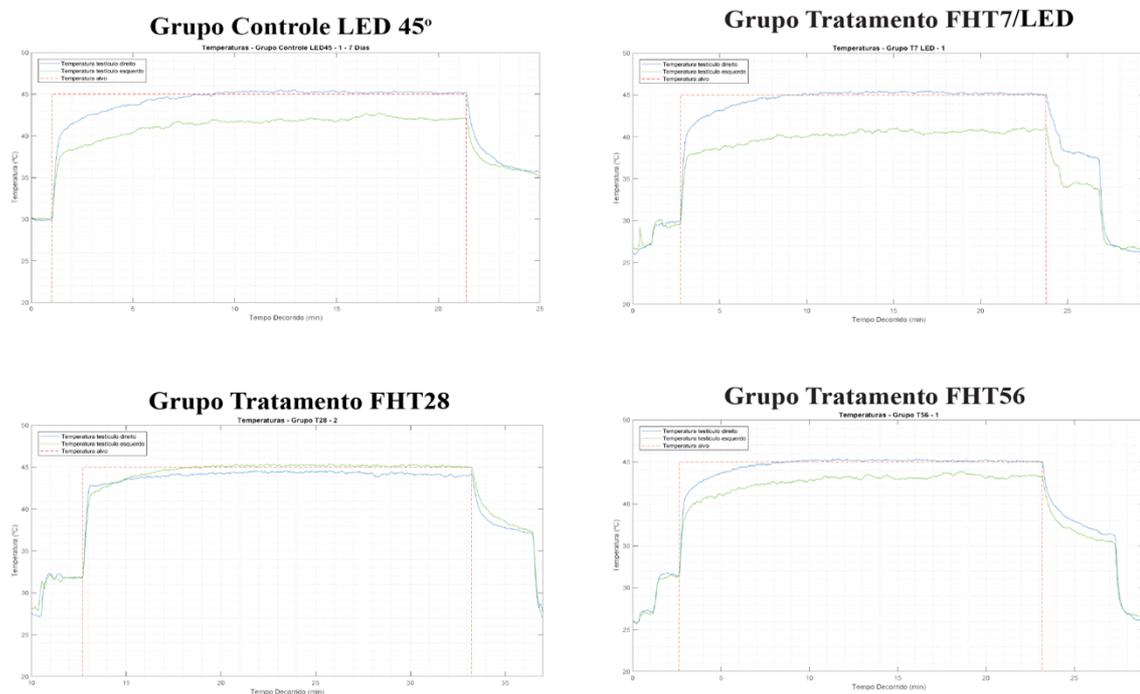


Figura 6: Gráficos demonstrando a temperatura do termopar nos grupos Controle LED 45 ° e os tratamentos FHT7/LED demonstrando a diferença de temperatura entre o testículo direito, que recebeu injeção do fluido

magnético e o testículo esquerdo que recebeu apenas a incidência de luz do LED na mesma intensidade luminosa, FHT28 e FHT56.

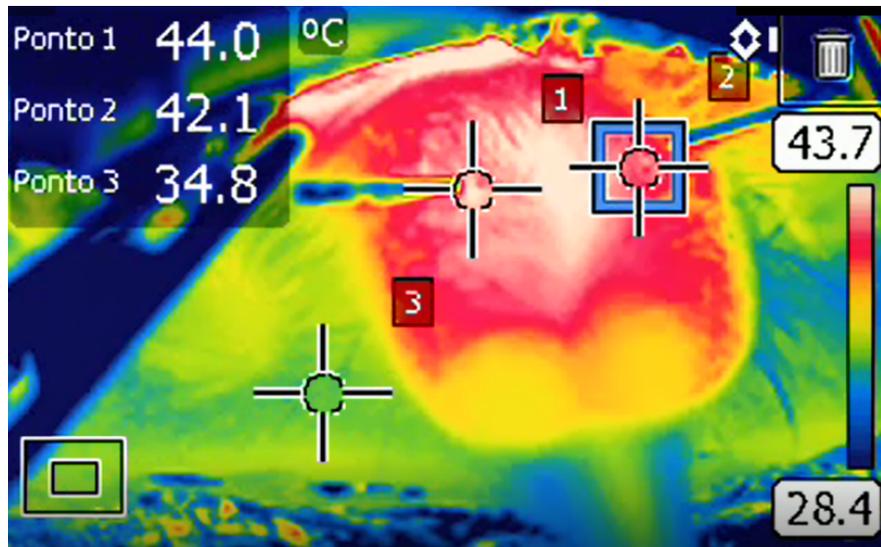


Figura 7: Imagem de fotohipertermia capturada pela câmera termográfica durante o tratamento. Ponto 1 mostra a temperatura do testículo esquerdo; Ponto 2 mostra a temperatura do testículo direito; Ponto 3 mostra a temperatura corporal em uma região próxima a incidência do LED.

Como não houve diferenças nos resultados dos testículos que foram submetidos somente à irradiação por LED, tanto dos animais do grupo controle LED 45 ° quanto dos animais do grupo FHT7/LED, os dados destes testículos foram agrupados e denominados de agora em diante como grupo controle LED.

Um dia antes do tratamento, os animais foram pesados e assim seguiu diariamente até o dia da eutanásia de cada grupo. Após o início do tratamento, alguns animais tiveram perda de peso inicial, porém sem importância fisiológica e sem correlação com o tratamento. Posteriormente os animais tiveram ganho de peso conforme o esperado durante o restante do experimento (Figura 8). Nenhum animal apresentou perda de apetite após o tratamento.

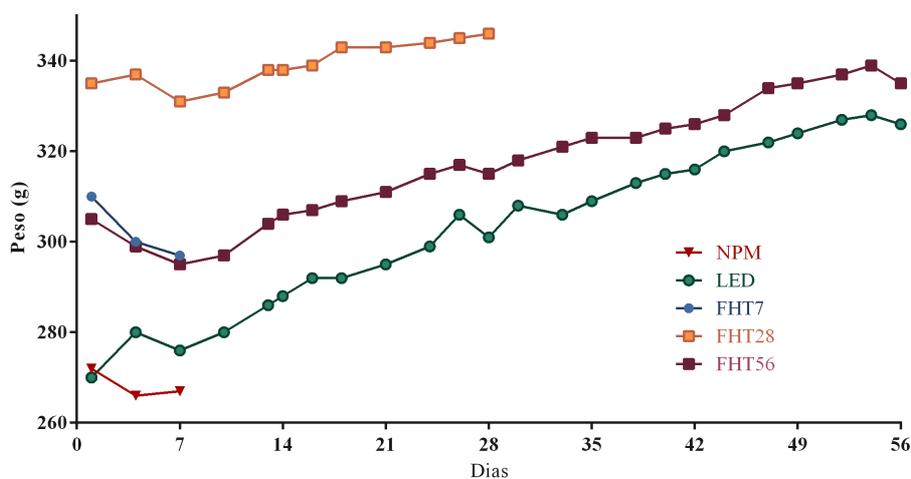


Figura 8: Peso corporal médio de todos os animais dos grupos tratamento FHT7, tratamento FHT28, tratamento FHT56, controle LED, controle nanopartícula (NPM).

Foi possível observar, que os animais que receberam a injeção intratesticular do fluido magnético, tanto dos grupos tratados com fototerapia quanto os animais do grupo controle NPM, apresentavam o testículo escurecido desde o momento da injeção até o dia da eutanásia (Figura 9), porém na maioria não demonstravam sinais de dor ou desconforto. Em 17,5% testículos houve inflamação visível a olho nu nos epidídimos a partir do 6º dia, apresentando um inchaço nos testículos e epidídimos e incomodo à apalpação. Um animal do tratamento FHT56 apresentou progressão do processo inflamatório até 13 dias após o tratamento, e após 20 dias do tratamento, essa inflamação começou a regredir, mas persistiu até o dia da eutanásia (Figura 10). No momento da eutanásia, os epidídimos que apresentaram inflamação, estavam muito aderidos à pele da bolsa escrotal e na hora da realização do macerado da cauda do epidídimo para coleta de espermatozoides havia presença de pus. Nestes casos, às vezes não foi possível realizar as avaliações espermáticas.



Figura 9: Aparência macroscópica dos testículos após injeção intratesticular do fluido magnético.

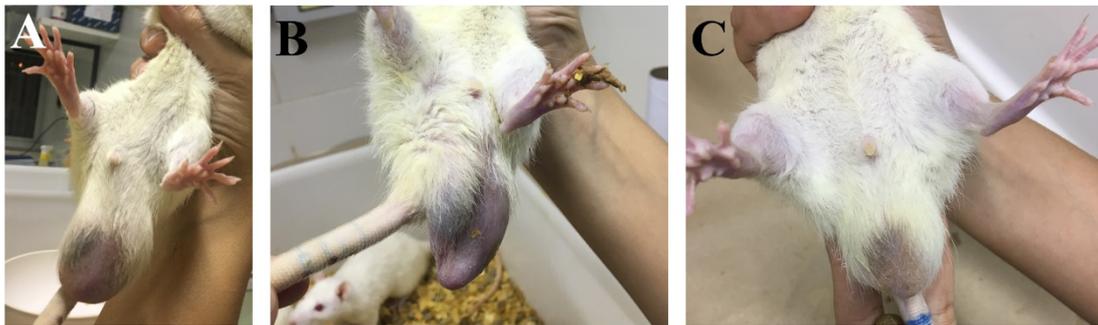


Figura 10: Processo inflamatório após injeção intratesticular do fluido magnético. A: Tratamento FHT56, 6 dias após injeção. B: Tratamento FHT56, 13 dias após injeção. C: Tratamento FHT56, 20 dias após injeção.

A ultrassonografia dos testículos e do epidídimo mostrou aspecto geral com parênquima homogêneo, de textura lisa e limites bem definidos. No grupo FHT, o volume testicular médio diminuiu significativamente ($P < 0,05$) a partir da primeira semana ($4,48 \text{ cm}^3$) para a 2ª semana ($3,70 \text{ cm}^3$), e novamente da 4ª ($3,63 \text{ cm}^3$) para a 5ª semana ($1,92 \text{ cm}^3$). Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a 2ª, 3ª e 4ª semanas e entre a 5ª, 6ª, 7ª e 8ª semanas (Figura 11). Os grupos controle LED e NPM só foram submetidos a ultrassonografia na primeira semana, devido ao dia da eutanásia.

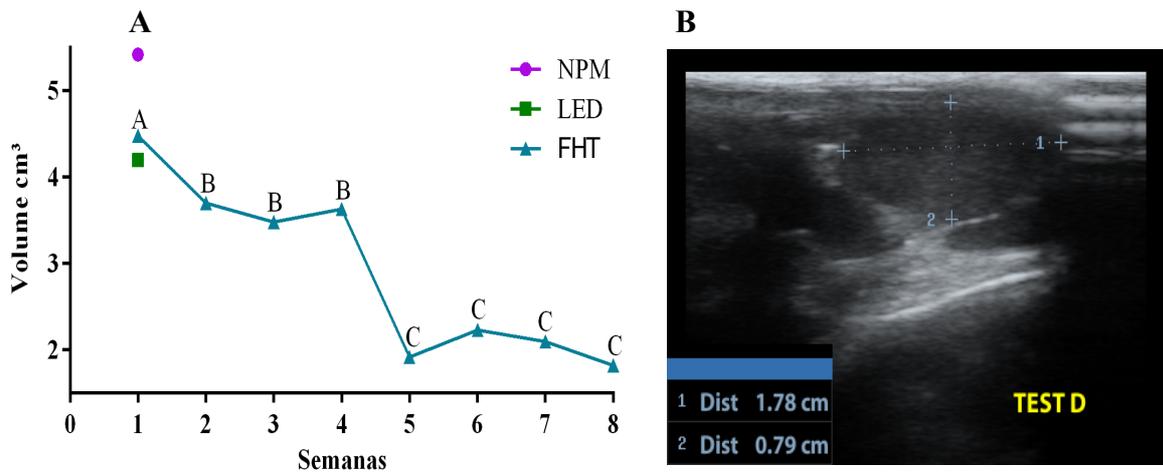


Figura 11: Ultrassonografia dos testículos e epidídimo. A) Gráfico do volume dos testículos dos animais dos grupos controle NPM e LED, e do tratamento FHT. B) Ultrassonografia de testículo com aspecto geral, parênquima homogêneo, textura lisa e limites bem definidos (marcado com +). TEST D: Testículo direito. ABC – Valores com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente ($P < 0,05$)

Em 17,5% dos casos, havia uma extensa área hiperecótica irregular adjacente aos testículos (figura 12), sugerindo um processo inflamatório no epidídimo, confirmado durante a necropsia, e que já havia sido observado na avaliação visual.

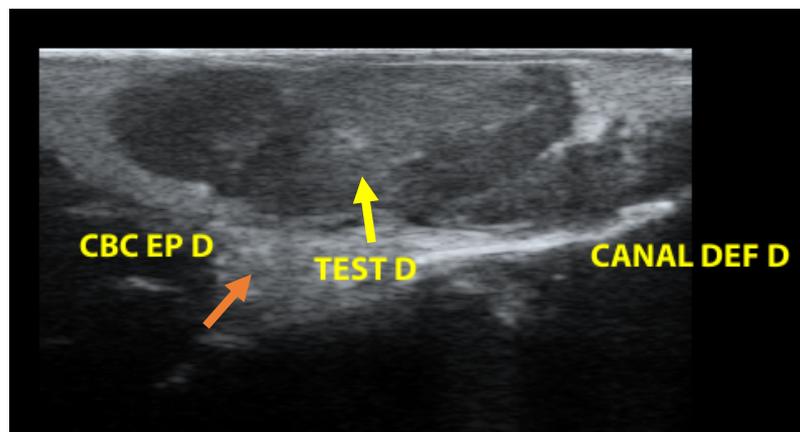


Figura 12: Extensa área hiperecótica irregular adjacente aos testículos, sugerindo um processo inflamatório no epidídimo. CBC EP D: Cabeça do epidídimo direito; TEST D: Testículo direito; CANAL DEF D: Canal deferente direito. A seta amarela aponta para o testículo. A seta laranja aponta para a região hiperecótica sugestiva de processo inflamatório.

As medidas e o peso dos testículos foram obtidos após eutanásia e estão apresentados na Tabela 1. Houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do peso dos testículos dos

tratamentos FHT28 e FHT56 comparados aos grupos controles NPM e LED. Assim como houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do volume testicular dos tratamentos FHT28 e FHT56 comparado aos grupos controle LED. O peso dos epidídimos não mostrou alterações significativas ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com fotohipertermia e os grupos controle NPM e controle LED.

Tabela 1 Médias (\pm DP) das medidas dos testículos e epidídimos de cada grupo.

	NPM	LED	FHT7	FHT28	FHT56
Peso testículos (g)	0,55 \pm 0,08 ^A	0,49 \pm 0,08 ^A	0,43 \pm 0,17 ^{AB}	0,30 \pm 0,06 ^B	0,30 \pm 0,06 ^B
Volume testículos (cm³)	3111 \pm 346 ^{AB}	4083 \pm 963 ^B	3165 \pm 743 ^{AB}	2595 \pm 863 ^A	2926 \pm 541 ^A
Peso epidídimos (g)	1,05 \pm 0,99	0,57 \pm 0,11	1,20 \pm 0,90	0,66 \pm 0,24	0,68 \pm 0,27

AB – Valores com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente entre os grupos ($P < 0,05$)

Os órgãos (fígado, baço, rim e pulmões) apresentaram aparência macroscópicas normal e similares em todos os grupos. E não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados e os grupos controles. O peso relativo está representado na tabela 2.

Tabela 2 Peso (g) (médias \pm DP) dos órgãos de cada grupo.

	NPM	LED	FHT7	FHT28	FHT56
Baço	0,54 \pm 0,30	0,32 \pm 0,35	0,45 \pm 0,16	0,38 \pm 0,03	0,33 \pm 0,04
Rim direito	0,39 \pm 0,01	0,34 \pm 0,04	0,38 \pm 0,04	0,35 \pm 0,02	0,35 \pm 0,03
Fígado	3,42 \pm 0,25	2,94 \pm 0,38	2,88 \pm 0,56	2,81 \pm 0,32	2,98 \pm 0,25
Pulmão	0,63 \pm 0,04	0,56 \pm 0,03	0,57 \pm 0,03	0,52 \pm 0,08	0,56 \pm 0,08

A porcentagem de espermatozoides móveis de todos os animais foi avaliada e mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos grupos tratados FHT28 (27,6%) e FHT56 (24,2%) quando comparados aos grupos FHT7 (91,5%), grupo LED (100%) e grupo NPM (100%) (Figura 13).

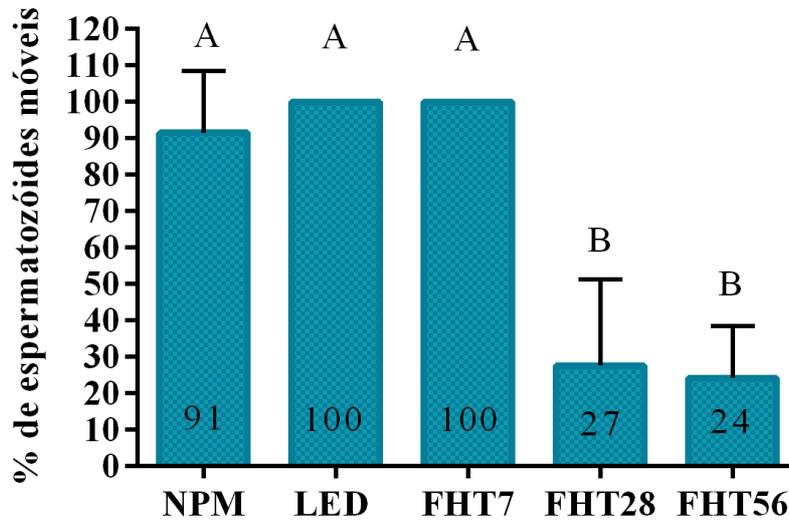


Figura 13: Espermatozoides móveis (%) nos grupos controles LED e NPM e nos grupos tratados FHT7, FHT28 e FHT56.

A, B – Letras diferentes mostram diferença significativa ($p < 0,05$)

Os dados de morfologia espermática mostraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides normais no grupo FHT7 em comparação ao grupo tratamento FHT56 e aos grupos controles NPM e LED. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de patologias de cabeça no grupo tratado FHT7 em comparação com o grupo LED e aumento significativo ($p < 0,05$) no número de patologias de cauda no grupo tratamento FHT7 comparado aos grupos controles NPM e LED (Figura 14).

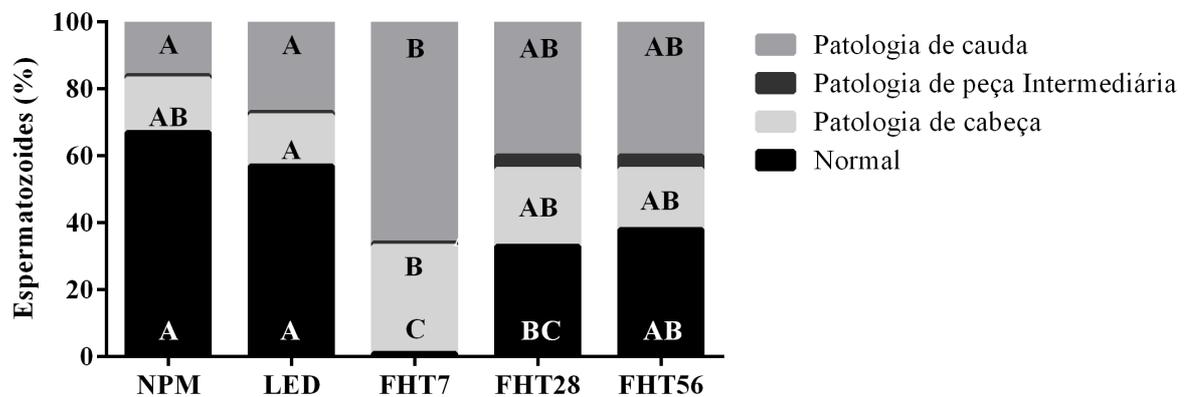


Figura 14: Morfologia espermática (%) do grupo controle LED e nos grupos tratados FHT28 e FHT56.

A, B, C – Letras diferentes mostram diferença significativa ($p < 0,05$)

A concentração espermática encontrados na cauda do epidídimo não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e os grupos controles, apesar da diferença numérica ter sido grande (Figura 15).

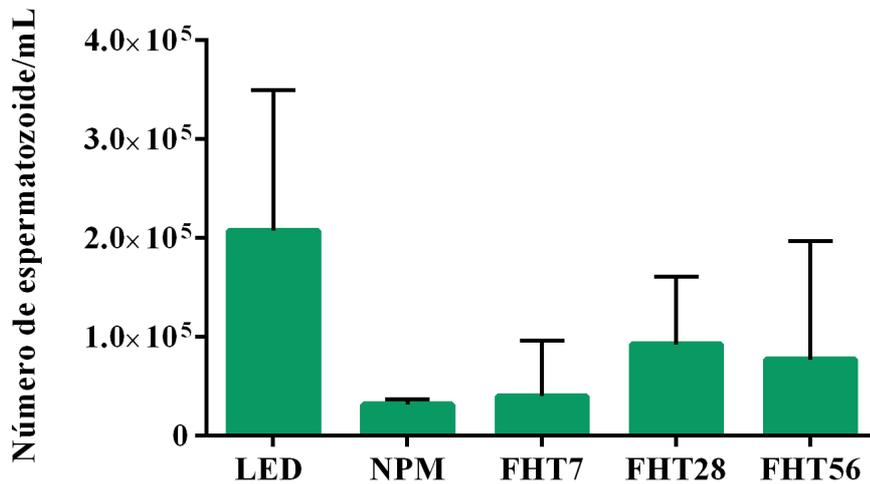


Figura 15: Concentração espermática do grupo controle LED e nos grupos tratados FHT28 e FHT56.

A média (\pm DP) dos parâmetros hematológicos da coleta sanguínea antes do início do experimento, de todos os animais dos grupos controle e tratamentos estão demonstrados na tabela 3, com os valores mínimos e máximos. Já na tabela 4 estão as médias (\pm DP) dos parâmetros hematológicos da coleta de sangue durante a eutanásia dos animais dos grupos controle e tratamentos, com seus valores mínimos e máximos. Todos os animais foram analisados individualmente de acordo com os limites de normalidade para a espécie. Tanto antes do início do tratamento quanto no dia da eutanásia todos os animais apresentaram parâmetros dentro dos limites de normalidade, à exceção de um animal do grupo FHT56 que apresentou valores de Hemoglobina abaixo do normal antes do tratamento, e nenhuma correlação com o tratamento foi observada.

Tabela 3: Análise sanguínea antes do início do tratamento (Média ± DP). Grupos controles LED e NPM e grupos tratamentos FHT7, FHT28 e FHT56.

	Limites de normalidade*	NPM	LED	FHT7	FHT28	FHT56
Leucócitos (10³/μL)	3,0 - 17,0	7,75±3,0 (5,6 - 9,9)	8,4±3,7 (4,4 - 11,7)	7,0±2,5 (4,3 - 10,4)	7,7±2,2 (5,7 - 11,3)	7,6±2,9 (4,0 - 11,3)
Hemácias (10⁶/μL)	5,0 - 10,0	8,62±1,0 (7,8 - 9,4)	8,3±1,2 (7,1 - 9,4)	7,9±1,2 (5,8 - 8,7)	8,3±0,8 (6,9 - 9,0)	8,0±1,9 (4,7 - 9,1)
Hemoglobina (g/dL)	11,0 - 19,0	16,05±1,9 (14,7 - 17,4)	16,2±2,4 (13,6 - 18,2)	15,6±2,3 (17,2 - 11,6)	16,2±1,8 (13,2 - 17,7)	15,5±3,6 (9,1 - 17,6)
Hematócrito (%)	35 - 57	44,5±5,7 (40,5 - 48,5)	44,9±5,9 (38,4 - 50,0)	42,5±6,0 (31,9 - 46,6)	43,7±4,3 (36,3 - 46,9)	36,2±14,4 (16,9 - 48,5)
VCM (fL)	46,0 - 65,0	54,6±0,3 (54,4 - 54,8)	54,2±1,5 (53,0 - 55,9)	54,1±2,1 (51,6 - 56,9)	52,9±0,7 (52,2 - 53,8)	53,1±0,8 (52,3 - 54,2)
MHC (pg)	18,0 - 23,0	18,6±0,1 (18,6 - 18,7)	19,6±0,7 (19,0 - 20,4)	19,8±0,4 (19,2 - 20,1)	19,6±0,4 (19,2 - 20,0)	19,3±0,3 (19,0 - 19,8)
CHCM (g/dL)	31,0 - 40,0	36,1±0,3 (35,9 - 36,3)	36,1±0,6 (35,4 - 36,6)	36,7±0,8 (35,4 - 37,6)	37,1±0,5 (36,4 - 37,9)	36,8±0,4 (36,3 - 37,3)
Plaquetas (10³/μL)	200 - 1500	688±327 (456 - 919)	540±468 (264 - 1080)	616±321 (202 - 980)	820±311 (364 - 1062)	808±392 (300 - 1136)

VCM – Volume Corpuscular Médio; MCH – Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

* Cubas *et al.*, 2014

Tabela 4: Análise sanguínea no dia da eutanásia dos animais (Média ± DP). Grupos controles LED e NPM e grupos tratamentos FHT7, FHT28 e FHT56.

	Limites de normalidade*	NPM	LED	FHT7	FHT28	FHT56
Leucócitos (10³/μL)	3,0 - 17,0	5,0±0,5 (4,6 - 5,3)	10,3±7,5 (5,2 - 18,9)	9,6±3,3 (6,9 - 12,7)	6,6±0,7 (5,5 - 7,3)	8,5±4,2 (4,7 - 15,4)
Hemácias (10⁶ /μL)	5,0 - 10,0	8,5±0,3 (8,3 - 8,7)	7,8±0,8 (7,0 - 8,6)	7,4±0,5 (6,9 - 8,2)	7,6±0,8 (6,6 - 8,7)	8,2±1,2 (6,5 - 9,4)
Hemoglobina (g/dL)	11,0 - 19,0	15,9±0,3 (15,7 - 16,1)	15,1±2,1 (12,7 - 16,7)	16,0±3,3 (13,2 - 21,6)	14,6±1,3 (13,6 - 16,1)	14,6±2,3 (11,8 - 16,8)
Hematócrito (%)	35 - 57	47,1±1,1 (46,3 - 47,9)	43,4±5,5 (37,1 - 47,2)	42,6±3,8 (38,2 - 48,2)	40,9±4,1 (36,8 - 45,4)	43,1±6,6 (34,8 - 49,5)
VCM (fL)	46,0 - 65,0	55,7±0,6 (55,2 - 56,1)	55,4±2,7 (53,2 - 54,6)	57,4±1,3 (55,5 - 59,0)	53,7±2,5 (50,0 - 55,4)	53,4±1,6 (50,8 - 54,8)
CHM (pg)	18,0 - 23,0	18,8±0,3 (18,6 - 19,0)	19,2±1,0 (18,2 - 20,1)	19,2±0,6 (18,3 - 19,7)	19,1±1,0 (17,9 - 20,5)	17,9±0,5 (17,0 - 18,2)
CHCM (g/dL)	31,0 - 40,0	33,8±0,2 (33,6 - 33,9)	34,7±0,6 (34,2 - 35,4)	33,4±0,7 (32,7 - 34,4)	35,6±0,8 (34,9 - 35,8)	33,8±0,6 (33,1 - 34,7)
Plaquetas (10³/μL)	200 - 1500	1034±42 (1004 - 1064)	868±401 (445 - 1243)	918±336 (333 - 1150)	786±382 (347 - 1155)	745±287 (299 - 997)

VCM – Volume Corpuscular Médio; MCH – Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

* Cubas *et al.* (2014)

Os resultados dos exames bioquímicos (média±DP) dos animais dos diferentes grupos antes do início do tratamento e no dia da eutanásia, estão demonstrados na tabela 6. Todos os animais foram avaliados individualmente de acordo com os limites de normalidade (Cubas *et al.*, 2014). Os parâmetros de ALT e Creatinina estavam dentro destes limites, já os valores de AST e Ureia estavam acima em sua maioria, tanto nos animais que receberam o tratamento quanto nos grupos controle, e tanto antes de qualquer procedimento quanto no dia da eutanásia, sugerindo não haver relação com o tratamento realizado.

Tabela 6: Análise bioquímica antes do tratamento e no dia da eutanásia dos animais (Média ± DP). Grupos controles LED e NPM e grupos tratamentos FHT7, FHT28 e FHT56.

		Limites de normalidade*	NPM	LED	FHT7	FHT28	FHT56
Antes	ALT (U/L)	17 - 224	59±6	68±23	57±8	59±12	53±3
	AST (U/L)	39 - 92	113±6	107±2	125±9	112±16	99±18
	CREA (mg/dL)	0,2 - 0,8	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0
	UREIA (mg/dL)	15 - 21	42±1	51±2	41±2	40±5	37±5
Depois	ALT (U/L)	17 - 224	59±6	68±23	57±8	59±12	53±3
	AST (U/L)	39 - 92	113±6	107±2	125±9	112±16	99±18
	CREA (mg/dL)	0,2 - 0,8	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0
	UREIA (mg/dL)	15 - 21	42±1	51±2	41±2	40±5	37±5

* Cubas et al. (2014)

A análise histomorfológica dos testículos dos animais do grupo controle LED (Figura 16) permitiu visualizar que a estrutura dos túbulos seminíferos se mantinha intacta, sem sinal de ruptura ou desorganização do epitélio seminífero, não havia processo inflamatório nem presença de células do sistema imune. Além disso, foi possível identificar a presença de todas as células da linhagem germinativa: espermatogônias, espermatócitos, espermátides nos túbulos seminíferos de maneira organizada, assim como a presença de espermatozoides na luz dos túbulos.



Figura 16: Microscopia de luz de testículos dos animais do grupo controle LED. A: Visão geral de túbulos seminíferos intactos. Barra = 400 μm . B: Túbulos seminíferos mostrando epitélio germinativo organizado. Ausência de processo inflamatório. Barra = 200 μm . C: Todas as células da linhagem germinativa identificadas em um túbulo seminífero, com espermatozoides na luz. Barra = 100 μm .

O grupo controle NPM (Figura 17) apresentou danos em alguns túbulos seminíferos, especialmente na região onde havia maior concentração de nanopartículas. Havia a presença das células da linhagem germinativa, e em alguns casos, haviam descamação das células germinativas no lúmen dos túbulos seminíferos e também dos epidídimos. Inflamação e necrose no interstício também foram vistos, além da presença de nanopartículas.

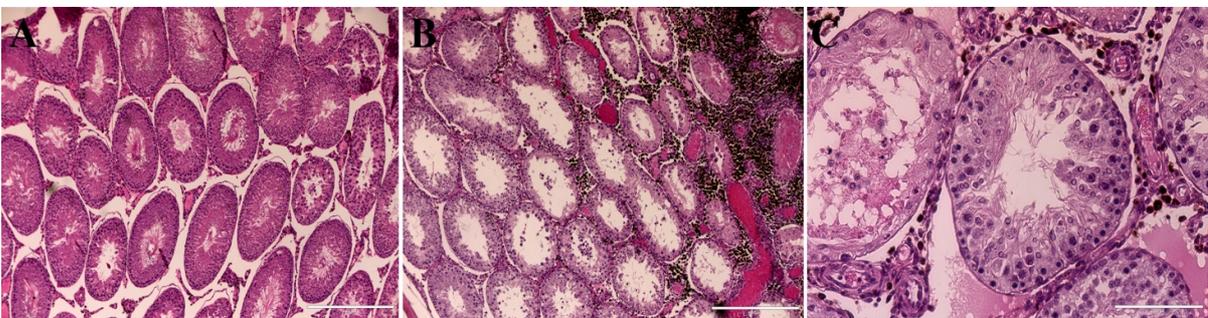


Figura 17: Microscopia de luz de testículos dos animais do grupo controle NPM. A: Túbulos seminíferos com estrutura intacta. Sem nanopartículas visíveis. Barra = 400 μm . B: Túbulos seminíferos danificados e presença de nanopartículas no interstício. Barra = 400 μm . C: Diferença entre túbulos seminíferos. A esquerda, túbulo seminífero com vacuolização, epitélio seminífero desorganizado e presença de descamação das células germinativas no lúmen do túbulo. A direita, túbulo íntegro com todas as células da linhagem germinativa. Barra = 100 μm .

O grupo FHT7 (Figura 18) apresentou, no geral, túbulos seminíferos danificados, com células gigantes, sendo possível identificar apenas células de Sertoli e espermatogônias no epitélio seminífero. Alguns túbulos apresentavam um infiltrado amorfo. A membrana basal dos

túbulos não apresentava definição. As nanopartículas são visíveis, sempre no espaço intersticial. Havia infiltrado inflamatório no interstício e presença de leucócitos.

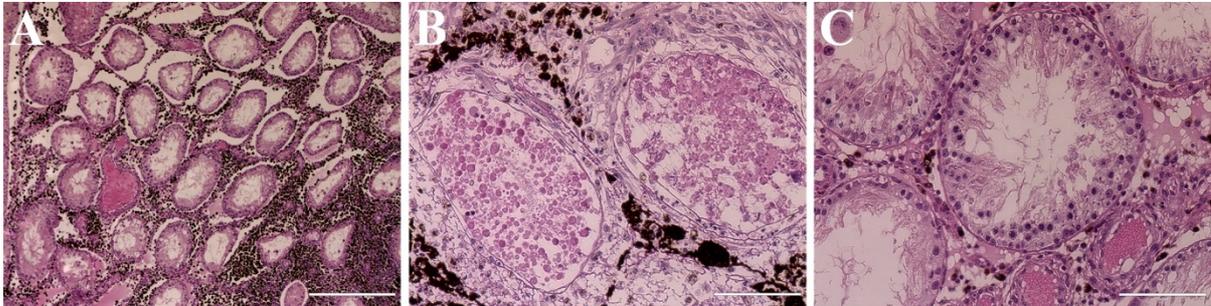


Figura 18: Microscopia de luz de testículos dos animais do grupo controle FHT7. A: Túbulos seminíferos danificados, com membrana basal mal definida. Barra = 400 μm . B: Túbulos com infiltrado amorfo. Barra = 100 μm . C: Túbulo mostrando epitélio seminífero onde apenas espermatogônias e células de Sertoli podem ser identificadas. Barra = 100 μm .

Foram observados no grupo tratado FHT28 (Figura 19) túbulos seminíferos preenchidos com células desorganizadas com a maior parte dos túbulos vazios. No entanto, na região da periferia dos testículos (aproximadamente 1/3 da área total) havia túbulos preservados, com presença das células germinativas íntegras e espermatozoide na luz dos túbulos. As nanopartículas apresentam-se na forma de agregados, principalmente na região central dos testículos. Em comparação ao grupo tratamento FHT7, os leucócitos foram encontrados em menor quantidade.

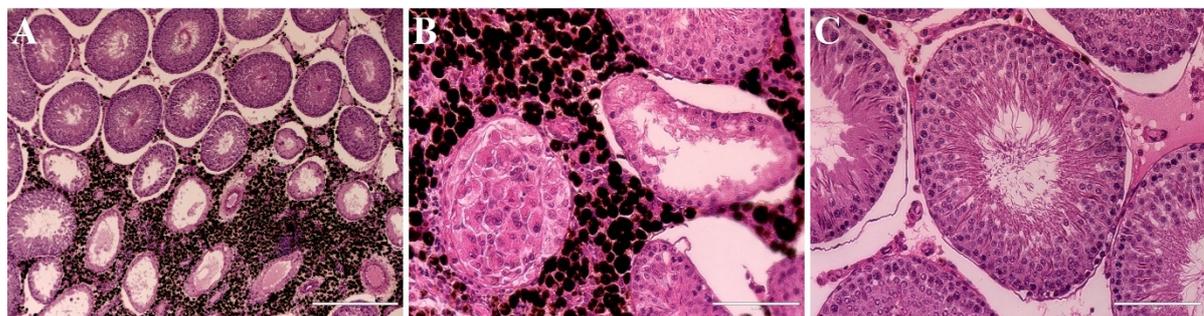


Figura 19: Microscopia de luz de testículos dos animais do grupo FHT28. A: Diferença entre os túbulos seminíferos da região da periferia dos testículos (íntegros) e da região central dos testículos (danificados) onde é possível visualizar as nanopartículas agregadas. Barra = 400 μm . B: Túbulo seminífero apresentando células inchadas preenchendo todo o lúmen e presença de nanopartículas no interstício. Barra = 100 μm . C: Túbulo intacto da região periférica do testículo, com células da linhagem germinativa e espermatozoides na luz. Não há presença de nanopartículas visíveis. Barra = 100 μm .

No grupo FHT56 (Figura 20) os danos estavam presentes nos túbulos seminíferos e no interstício. Os túbulos apresentavam necrose coagulativa, assim como perda da definição em alguns casos. Ausência de espermatozoides na luz dos túbulos, assim como ausência das células da linhagem germinativa nos túbulos na região central dos testículos, e também foram observados vacúolos no epitélio tubular. Já na periferia, assim como o grupo tratado FHT28, haviam túbulos intactos, com presença de espermatozoides na luz dos túbulos e células germinativas. As nanopartículas apresentavam aglomerados maiores na região central dos testículos, porém, pequenos aglomerados também eram vistos na região da periferia dos testículos.

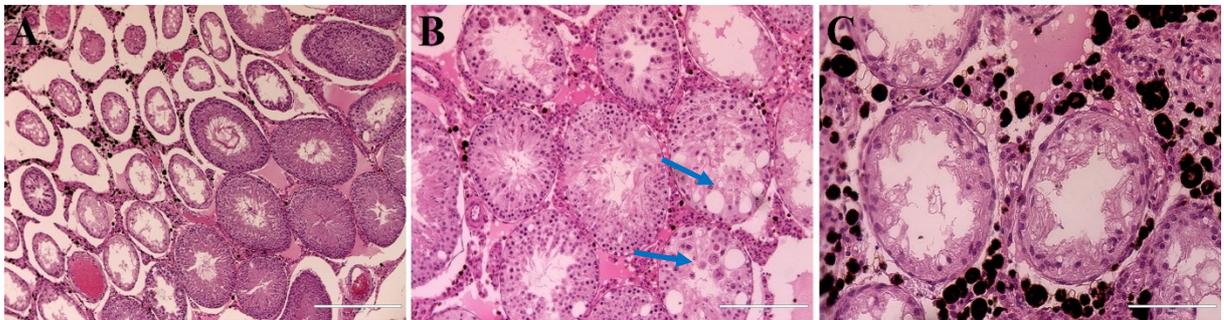


Figura 20: Microscopia de luz de testículos dos animais do grupo FHT56. A: Diferença entre os túbulos seminíferos da região central dos testículos, apresentando necrose coagulativa, desorganização das células germinativas e ausência de espermatozoides na luz dos túbulos, e da região periférica dos testículos, onde estão íntegros. Barra = 400 μm . B: Túbulos da região periférica dos testículos, com início de vacúolos no epitélio seminífero, mostrado pelas setas azuis. Nanopartículas visíveis em pequena quantidade. Barra = 100 μm . C: Túbulos da região central dos testículos, com necrose coagulativa. Presença de nanopartículas no interstício. Barra = 100 μm

A histologia dos epidídimos (Figura 21) mostrou espermatozoides nos túbulos dos animais do grupo controle LED. Nos grupos tratamentos FHT7, FHT28 e FHT56 também foram vistos espermatozoides, porém em menor quantidade. Foi observado que nos túbulos dos epidídimos do grupo controle NPM alguns túbulos apresentavam, além de espermatozoides, células descamadas soltas na luz, assim como visto nos túbulos seminíferos.

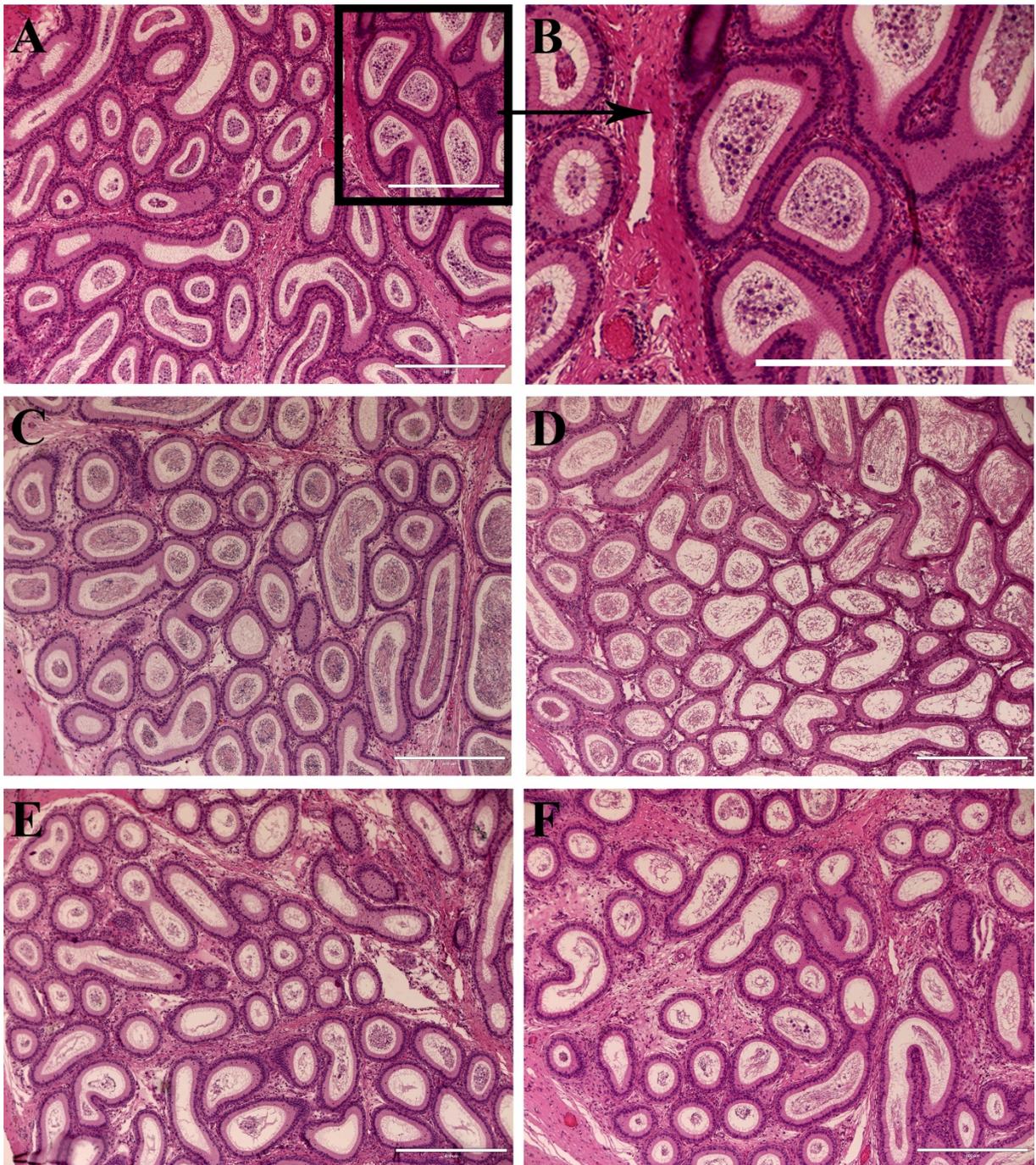


Figura 21: Imagens representativas da morfologia de cauda dos epidídimos de cada grupo. A: Controle NPM; B: Controle NPM, foto ampliada mostrando a descamação das células germinativas no lúmen tubular dos epidídimos; C: Controle LED; D: Tratamento FH7; E: Tratamento FHT28; F: Tratamento FHT56. Barras = 400 μm .

A análise histomorfológica dos órgãos, baço, rins, fígado e pulmões (Figura 22) apresentou característica microanatômicas íntegras tanto nos grupos tratados FHT7, FHT28 e FHT56, quanto nos grupos controles LED e NPM.

Foi possível visualizar na histologia de baço (Figura 22A) a presença de polpa branca e polpa vermelha, assim como trabéculas esplênicas. Nos rins (Figura 22B), as estruturas também estavam intactas, apresentando corpúsculos renais e os túbulos contorcidos proximais e distais. No fígado (Figura 22C) foi possível observar a presença de cordões de hepatócitos, apresentavam estrutura dentro da normalidade, com lóbulos hepáticos similares a hexágonos, com veia centro lobular, ramo da veia porta, apoiados em tecido conjuntivo. Os pulmões (Figura 22D) apresentavam alvéolos pulmonares, sacos alveolares, bronquíolos e vasos sanguíneos pulmonares.

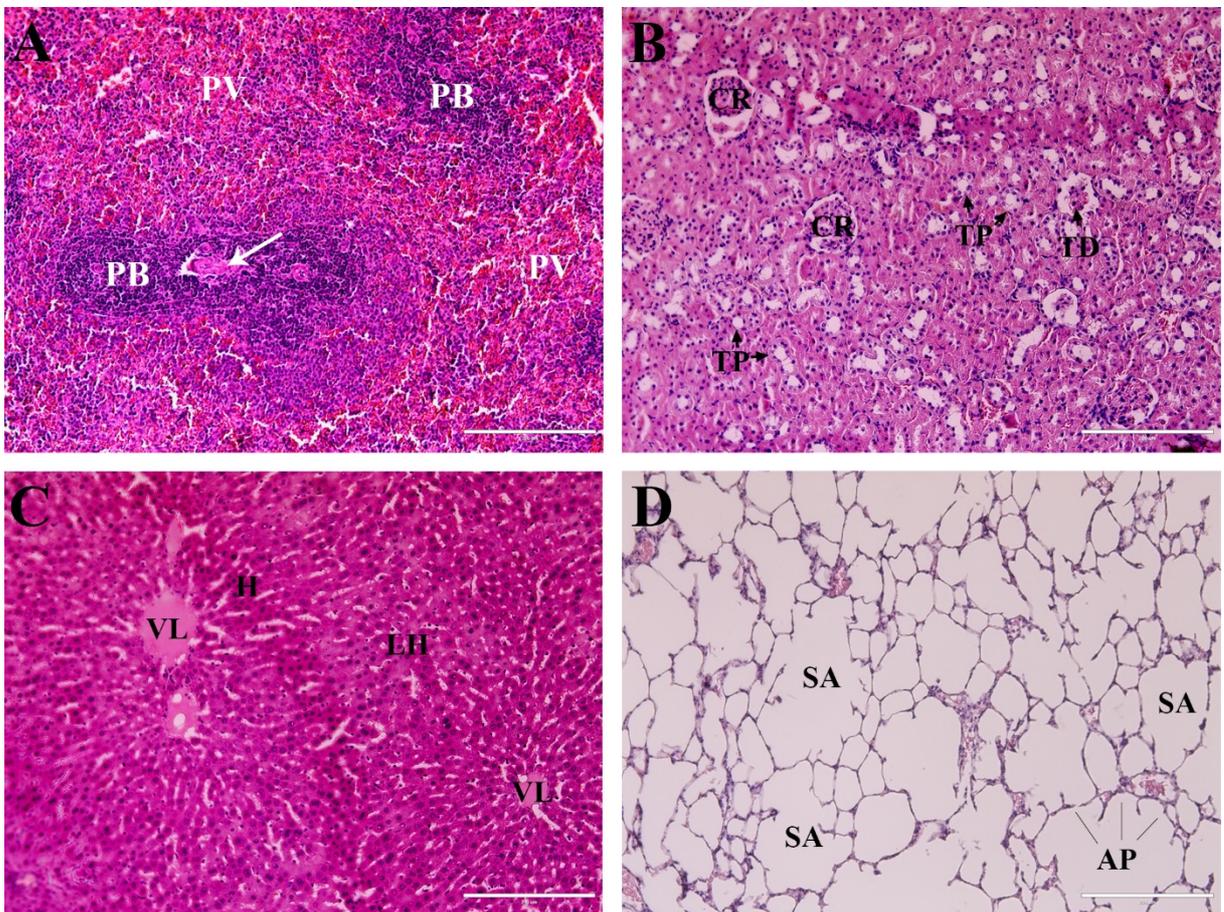


Figura 22: Aparência geral dos órgãos dos animais. A: Baço demonstrando polpa branca (PB), polpa vermelha (PV) e artéria central (seta); B: Rim com corpúsculos renais (CR) aparentes e túbulos contorcidos proximais (TP) e túbulos distais (TD); C: Fígado sendo possível observar cordões de hepatócitos (H), os lóbulos hepáticos (LH) e veia centro-lobular (VL); D: Pulmão com sacos alveolares (SA) e alvéolos pulmonares (AP). Barras = 200 μ m.

7. Discussão

O presente estudo mostrou que a fotohipertermia testicular é capaz de causar danos progressivos aos túbulos seminíferos e à espermatogênese sem afetar a saúde dos animais a curto prazo (56 dias). A temperatura desempenha um papel importante na função reprodutiva dos machos e vários estudos utilizando aumento de temperatura testicular mostram efeitos na espermatogênese (Fahim *et al.*, 1975; Setchell, 1998; 2006; Lue *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2010).

Foi possível observar que mesmo com o tratamento, os animais continuaram a ganhar peso normalmente até o dia da eutanásia. Foi visto no estudo de Patil *et al.* (Patil *et al.*, 2014), que após utilizar aquecimento testicular por imersão em água quente com diferentes temperaturas, 39 °C, 41 °C e 43 °C durante 20 minutos (repetidamente ao longo de 5 semanas), o peso dos animais de todos os três grupos tratados não apresentou diferença em comparação com o controle. Diferentemente de Rôlo (2016), que ao utilizar o tratamento de magnetohipertermia a 45 °C durante 15 minutos, após uma injeção intratesticular de fluido magnético semelhante ao nosso, diferindo apenas pela presença de zinco em nossa nanopartícula, observou perda de peso nos dois primeiros dias após o tratamento, possivelmente devido a um desconforto causado pelo inchaço e pelas lesões de pele gerados pela magnetohipertermia, tendo ganho de peso esperado para a idade dos animais a partir de então até o final do experimento.

No presente trabalho, 17,5% dos animais apresentaram inflamação nos epidídimos, detectados através do exame de ultrassonografia, também possível de visualizar macroscopicamente e na necropsia devido a um inchaço nos testículos e epidídimos. Esses animais demonstravam desconforto à palpação. No entanto, esse inchaço regrediu com o tempo e nenhuma outra alteração macroscópica como sinal de queimadura ou lesão na bolsa escrotal foi observada. No trabalho de Rôlo (2016), foi registrado um inchaço da bolsa escrotal na primeira semana, além disso, foi possível observar a formação de bolhas de queimadura na pele do escroto em alguns animais, que ao longo do tempo também regrediram. Cruz-Junior *et al.* (2015), utilizando insulação escrotal com bolsas térmicas nos testículos de carneiros afim de causar alteração na termorregulação testicular, mostrou que logo após a retirada das bolsas térmicas, houve inchaço da bolsa escrotal e aparecimento de lesões na pele, que regrediram até duas semanas após o término da insulação.

Após o tratamento de fotohipertermia, foi observada diminuição no peso e no volume testicular dos animais tratados de acordo com o tempo. Da mesma forma, Rôlo (2016) também descreve diminuição significativa das medidas de comprimento e espessura e no peso dos testículos após a magnetohipertermia testicular. Em Patil *et al.* (2014) foi observado que ratos

Wistar, com testículos expostos à temperatura de 39 °C, o peso dos testículos apresentou uma redução significativa em comparação com o controle. Porém, essa redução no peso dos testículos foi mais significativa nos animais dos grupos submetidos a 41 °C e 43 °C.

Em nosso estudo, as análises de espermatozoides não mostraram diferença significativa da concentração de espermatozoides na cauda dos epidídimos nos grupos tratados FHT7, FHT28 e FHT56 quando comparados aos grupos controles NPM e LED, apesar da diferença numérica ser bastante evidente. Isso pode ser devido a uma grande variação individual entre os animais. Já Patil *et al.* (2014) mostraram que o valor médio da contagem de espermatozoides do grupo controle foi maior que a média de contagem de espermatozoides dos grupos tratados com imersão em água quente em diferentes temperaturas. De acordo com Setchell (1998; 2006), o aumento de temperatura testicular, prejudica a espermatogênese, conseqüentemente provoca diminuição da concentração de espermatozoides, além de prejudicar a motilidade e a porcentagem de espermatozoides normais.

Na análise de motilidade de nosso estudo, foi revelado uma diminuição significativa nos animais tratados após 28 e 56 dias em comparação com os animais tratados após sete dias e os grupos controles NPM e LED. Além disso, houve uma diminuição significativa na porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais no grupo FHT7 e FHT28 em comparação aos grupos controles NPM e LED. No entanto, esta diferença desaparece no grupo FHT56. Em Patil *et al.* (2014) a porcentagem de espermatozoides com patologias foi significativamente maior nos grupos tratados com 41 °C e 43 °C em comparação com o grupo tratado à 39°C e o grupo controle. Utilizando insulação testicular para atingir hipertermia testicular em carneiros, Kastelic *et al.* (2017) puderam observar uma queda na motilidade espermática, assim como uma diminuição dos espermatozoides normais e aumento nas patologias de cabeça. Zhao *et al.* (2010), utilizando um modelo animal mais próximo ao nosso (camundongo), encontraram dados que corroboram o presente estudo. Estes autores, descrevem que quando os machos foram expostos a altas temperaturas ambientes (37 °C), e aumento do tempo de exposição ao calor, houve diminuição da motilidade espermática e aumento na porcentagem de espermatozoides anormais. Tanto a motilidade quanto a morfologia espermática são medidas importantes da capacidade de fertilização dos espermatozoides (Suarez & Pacey, 2006).

No nosso estudo, a análise histológica sugere comprometimento da espermatogênese, mostrando danos progressivos do epitélio seminífero ao longo do tratamento. Após sete dias da fotohipertermia testicular já era possível observar danos severos aos túbulos seminíferos. Aos 28 dias de tratamento foram vistas células inchadas e perda de definição dos túbulos seminíferos

em algumas áreas. Após 56 dias houve o aparecimento de vacúolos no epitélio tubular. Essa vacuolização do epitélio tubular é descrita por Creasy *et al.* (2013) em análises histológicas de animais com criptorquidismo. E também foi visto em Patil *et al.* (2014) que após exposição dos testículos a 39 °C, os túbulos seminíferos estavam comprometidos. A 41 °C, houve rompimento dos túbulos seminíferos em algumas áreas e havia diminuição da quantidade de espermatozoides na luz dos túbulos. Com a exposição a 43 °C, surgiram mais vacúolos e os túbulos mostraram número de espermatozoides mais escasso, as células intersticiais também estavam reduzidas. Nossos achados também estão de acordo com os dados descritos por Fahim *et al.* (1975), após estudo realizado com ratos Wistar machos expostos a aquecimento testicular com infravermelho (60 °C por 15 minutos) e micro-ondas (45°C por 15 minutos), mostrando prejuízo na espermatogênese e alterações morfológicas semelhantes. Outro estudo realizado por Fahim *et al.* (1977) com diferentes modelos animais (gato, cão, macaco, humano), utilizando aquecimento testicular por ultrassom (1watts/sq por 10 minutos) apresentaram redução de espermatozoides na luz dos túbulos e das espermátides em comparação aos animais do grupo controle. Em humanos houve fibrose. Em estudo realizado por Lue *et al.* (1999, 2000) demonstrou que testículos de ratos expostos a água quente a 43 °C por 15 minutos resultou em danos aos túbulos seminíferos e apoptose das células germinativas, revelando sensibilidade dessas células a elevadas temperaturas, sendo as espermátides e os espermatócitos mais sensíveis do que as espermatogônias. No presente trabalho, principalmente nos animais dos grupos tratados FHT7 e FHT56, também foi possível observar que espermátides e espermatócitos sofreram danos e desapareceram antes das espermatogônias.

Em nosso trabalho, também foram observados danos no grupo controle NPM como descamação de células germinativas no lúmen dos túbulos seminíferos e nos túbulos dos epidídimos e a vacuolização do epitélio tubular, possivelmente devido a algum efeito citotóxico do fluido magnético utilizado nas células germinativas. A nanopartícula utilizada continha zinco. Achados semelhantes também foram vistos no estudo de Talebi *et al.* (2013) utilizando camundongos que receberam 5, 50 e 300 mg/kg nanopartícula de óxido de zinco (ZNP - Sigma®) oralmente por 35 dias consecutivos. No grupo que recebeu 5 mg/kg foi possível identificar a presença de todas as células da linhagem germinativa, porém, foi observado o início da formação de vacúolos nos túbulos seminíferos. Já o grupo que recebeu 50 mg/kg começou a apresentar desorganização das células da linhagem germinativa e aumento da vacuolização no epitélio tubular. No grupo que recebeu 300 mg/kg foram observados túbulos

seminíferos descolados, vacúolos maiores no epitélio tubular e o aparecimento de células multinucleadas.

O zinco é um elemento utilizado em procedimentos de castração química, onde um composto é injetado diretamente nos testículos para causar esclerose testicular, especialmente na forma de gluconato de zinco (Fahim *et al.*, 1993). É interessante notar que as alterações observadas no presente trabalho são bastante semelhantes às descritas em estudos de castração química. As análises histológicas após 5 meses da injeção intratesticular de Testoblock® – solução de 0,1M de gluconato de zinco em cães (Oliveira *et al.*, 2007), revelaram diminuição no número de células germinativas, destruição dessas células em algumas áreas, além do surgimento de células gigantes multinucleadas, células soltas na luz dos túbulos e vacuolização dos túbulos seminíferos. Utilizando injeção intratesticular de Testoblock® em gatos, Fagundes *et al.* (2014) observaram após 120 dias da administração da solução de gluconato de zinco uma diminuição das células germinativas e em alguns casos até ausência dessas células. Havia danos nos compartimentos basal e adluminal e nos túbulos seminíferos. Algumas regiões dos testículos apresentaram túbulos aumentados, com lúmen expandido e com menos células germinativas e com espermátides danificadas. Segundo Nolte *et al.* (1995), a presença de vacúolos no epitélio tubular demonstra danos nas células de Sertoli, e são consideradas a principal resposta das células de Sertoli a muitos agentes químicos. O surgimento de células gigantes e multinucleadas é descrito por Holstein & Eckmann (1986) como indicativo da degeneração das espermátides.

As análises histomorfológicas dos órgãos baço, rins, fígado e pulmões mostraram que a nanopartícula não afetou a característica morfológica destes órgãos nos grupos tratados e no grupo controle NPM, assim como não foi vista a presença da nanopartícula nos tecidos. Em Rôlo (2016) a análise histomorfológica revelou aglomerado de nanopartículas no baço dos animais do grupo controle que recebeu apenas a injeção intratesticular de nanopartícula e no grupo tratamento após sete dias da magnetohipertermia testicular. Estudo realizado por Pham *et al.* (2018) afim de demonstrar a biodistribuição e toxicidade das nanopartículas a base de óxido de ferro (SPIONs) através de administrações sistêmicas em camundongos mostraram, através da análise histológica que os sinais de inflamação, foi uma resposta normal devido a entrada de um corpo estranho no organismo dos animais. Foram vistas patologias leves no fígado, que também foram observados nos animais do grupo controle, os pesquisadores associaram ao alojamento em gaiolas, sendo comumente relatado. Nas análises de cinética e

distribuição do estudo de Salimi *et al.* (2018) não foram observadas alterações significativas nas análises histológicas dos camundongos.

As análises hematológicas mostraram que a avaliação individual dos animais estava em sua maioria de acordo com os limites de normalidade para a espécie descritos em Cubas *et al.* (2014). Já os resultados dos exames bioquímicos estavam acima do limite para os dados de Ureia e AST em todos os animais, incluindo animais dos grupos controles NPM e LED. Existe uma grande variação nos limites de normalidade utilizados como valores de referência para ratos, o que dificulta a discussão destes parâmetros individualmente. Os valores de Ureia e AST que estão aumentados, podem ser considerados dentro dos limites de normalidade caso sejam usadas outras referências, ALT 63 – 175 (Quesenberry & Carpenter, 2012) e Ureia 26 – 58 (Lima *et al.*, 2014). No entanto, o mais importante a ser ressaltado é que não foi visto correlação dessas alterações com o tratamento realizado.

8. Conclusão

O uso da fotohipertermia associada a injeção intratesticular de nanopartícula de óxido de ferro afim de induzir infertilidade em ratos Wistar machos mostrou ser eficiente no curto prazo (56 dias), sem efeitos colaterais graves. No entanto, o efeito não foi completo, provavelmente por não ter havido homogeneidade da distribuição das nanopartículas em todo o testículo. Mais estudos são necessários no sentido de aperfeiçoar o método e obter um efeito de esterilização completo. Após o aperfeiçoamento do método, ainda serão necessários estudos de longo prazo para confirmar se o tratamento causa a infertilidade irreversível e avaliar a saúde dos animais.

9. Referências bibliográficas

ALKILANY, A. M., THOMPSON, L. B., BOULOS, S. P., SISCO, P. N., & MURPHY, C. J. Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2): 190–199, 2012.

BARDHAN, R., CHEN, W., BARTELS, M., PEREZ-TORRES, C., BOTERO, M. F., MCANINCH, R. W., JOSHI, A. Tracking of Multimodal Therapeutic Nanocomplexes Targeting Breast Cancer in vivo. *Nano Letters*, 10(12): 4920–4928, 2010.

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.

BERRY, C. C., WELLS, S., CHARLES, S. & CURTIS, A. S. G. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials* 24: 4551–7, 2003.

BERRY, C. C., WELLS, S., CHARLES, S., ATCHINSON, G. & CURTIS, A. S. G. Cell response to dextran derivatised iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 25: 5405–13, 2004a.

BERRY, C. C., CHARLES, S., WELLS, S., DALBY, M. J. & CURTIS, A. S. G. The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. *Int. J. Pharmaceutics* 269: 211–25, 2004b.

BERRY, C. C. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42(22), 2009.

BIANCO, A., KOSTARELOS, K., PARTIDOS, C. D., & PRATO, M. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical Communications*, 7(5): 571, 2005.

BOONE, J. D., & SLATER, M. A generalized population monitoring program to inform the management of free-roaming cats. *Alliance for Contraception in CATS & DOGS*, 1–11, 2014.

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.

BOWEN, R. A. Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. *Animal Reproduction Science*, 105(1–2): 139–143, 2008.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal. 2ªEd., Belo Horizonte, 1998.

CHERTOK, B., MOFFAT, B. A., DAVID, A. E., YU, F., BERGEMANN, C., ROSS, B. D., & YANG, V. C. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*, 29(4): 487–496, 2008.

CHOI, W. I., SAHU, A., KIM, Y. H., & TAE, G. Photothermal Cancer Therapy and Imaging Based on Gold Nanorods. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(2): 534–546, 2011.

CHRISTOPHI, C., WINKWORTH, A., MURALIHARAN, V., & 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.

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.

CRUZ JÚNIOR, C.A., LUCCI, C. M., PERIPOLLI, V., SILVA, A. F., MENEZES, A. M., MORAIS, S. R. L., ARAÚJO, M. S., RIBEIRO, L. M. C. S., MATTOS, R. C., MCMANUS, C. Effects of testicle insulation on seminal traits in rams: Preliminary study. *Small Ruminant Research*, 130: 157-165, 2015

CUBAS, Z.S; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens, Medicina Veterinária. 2ªed, Roca, 2014.

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

DOANE, T. L., BURDA, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.* 41: 2885–2911, 2012.

EULISS, L. E., GRANCHAROV, S. G., O'BRIEN, S., DEMING, T. J., STUCKY, G. D., MURRAY, C. B., & HELD, G. A. Cooperative assembly of magnetic nanoparticles and block copolypeptides in aqueous media. *Nano Letters*, 3(11): 1489–1493, 2003.

EVERTS, M., SAINI, V., LEDDON, J. L., KOK, R. J., STOFF-KHALILI, M., PREUSS, M. A., et al. Covalently Linked Au Nanoparticles to a Viral Vector: Potential for Combined Photothermal and Gene Cancer Therapy. *Nano Letters*, 6(4): 587–591, 2006.

FAGUNDES, A. K. F., OLIVEIRA, E. C. S., TENORIO, B. M., MELO, C. C. S., NERY, L. T. B., SANTOS, F. A. B., ALVES, L. C., DOUGLAS, R. H., SILVA-JUNIOR, V. A. Injection of a chemical castration agent, zinc gluconate, into testes of cats results in the impairment of spermatogenesis: A potentially irreversible contraceptive approach for this

species? *Theriogenology*, 81(2): 230–236, 2013.

FAHIM, M. S., FAHIM, Z., HARMAN, J., THOMPSON, I., MONTE, J., HALL, D. G. Ultrasound as a new method of male contraception. *Fertility and Sterility*, 28(8): 823–831, 1977.

FAHIM, M. S., FAHIM, Z., HALL, D. G., & HARMAN, J. Heat in male contraception hot water 6°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.

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

HAFEZ, B., HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7ªed. São Paulo, Manole, p. 513, 2004.

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

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.

HOLSTEIN, A. F., ECKMANN, C. Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules. *Andrologia*, 18(1), 5–16, 1986.

HONG, R. Y., FENG, B., CHEN, L. L., LIU, G. H., LI, H. Z., ZHENG, Y., & WEI, D. G. Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3): 290–300, 2008.

HUGHES, J., & MACDONALD, D. W. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. *Biological Conservation*, 157: 341–351, 2013.

ICAM. Humane Dog Population Management Guidance, 2007.

JAIN, T. K., RICHEY, J., STRAND, M., LESLIE-PELECKY, D. L., FLASK, C. A., & LABHASETWAR, V. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: Drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*, 29(29): 4012–4021, 2008.

JIN H, YANG P, CAI J, WANG J, LIU M. Photothermal effects of folate-conjugated Au nanorods on HepG2 cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94: 199–208, 2012.

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.

KASTELIC, J. P., WILDE, R. E., RIZZOTO, G., THUNDATHIL, J. C. *Veterinarni Medicina*, 62(08): 437– 442, 2017.

KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. Berne & Levy – Fisiologia. 6^a ed. Elsevier, 2009.

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

KUTZLER, M., WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 66: 514 –25, 2006.

LAURENT, S., FORGE, D., PORT, M., ROCH, A., ROBIC, C., VANDER ELST, L., & MULLER, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 110(4): 2574–2574, 2010.

LEVY, J. K., CRAWFORD, P. C., APPEL, L. D., & CLIFFORD, E. L. Comparison 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.

LIMA, C.M; LIMA, A.K; MELO, M.G.D; DÓRIA, G.A.A; LEITE, B.L.S; SERAFINI, M.R; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C; ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*, 10 (3): 1-9, 2014.

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.

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.

LU, A. H., SALABAS, E. L., & SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis,

protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(8): 1222–1244, 2007.

NOLTE, T., HARLEMAN, J. H., JAHN, W. Histopathology of chemical induced testicular atrophy in rats. *Exp. Toxic Pathol.*, 47: 267–286, 1995.

MATSUMINE, A., TAKEGAMI, K., ASANUMA, K., MATSUBARA, T., NAKAMURA, T., UCHIDA, A., SUDO, AKIHIRO, S. A novel hyperthermia treatment for bone metastases using magnetic materials. *Int Japan Clinical Oncology*, 16: 101–108, 2011.

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.

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.

OBERDÖRSTER, G., OBERDÖRSTER, E., & OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7): 823–839, 2005

OLIVEIRA, E. C. S., MOURA, A. R., SILVA-JUNIOR, V. A., PEIXOTO, C. A., SARAIVA, K. L. A., SÁ, M. J. C., DOUGLAS, R. H., MARQUES-JUNIOR, A. P. Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. *Theriogenology*, 68: 137–145, 2007.

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

OLSON, P., & JOHNSTON, S. Animal welfare forum: Overpopulation of unwanted dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.*, 202(6): 921–8, 1993.

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.

PHAM, B. T. T., COLVIN, E. K., PHAM, N. T. H., KIM, B. J., FULLER, E. S., MOON, BARBEY, R., YUEN, S., RICKMAN, B. H., BRYCE, N. S., BICLEY, S., TANUDJI, M., JONES, S. K., HOWELL, V. M., HAWKETT, B. S., Biodistribution and clearance of stable superparamagnetic maghemite iron oxide nanoparticles in mice following intraperitoneal administration. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(105): 1–23, 2018.

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.

QIN, Z., BISCHOF, J. C. Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating. *Chem. Soc. Rev.*, 41: 1991–1217, 2012.

QUESENBERRY, K.E; CARPENTER, J.W. Ferrets, Rabbits and Rodents - Clinical Medicine and Surgery. Elsevier, 3^a ed., 2012.

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.

REICHMANN, M. D. L. A. B., FIGUEIREDO, A. C. C. DE, PINTO, H. D. B. F., & NUNES, V. D. F. P. *Manual Técnico do Instituto Pasteur - Controle de populações de animais de estimação*. Instituto Pasteur, Vol. 6, 2000.

RÔLO, J. L. P. Avaliação dos efeitos de dois fluidos magnéticos na reprodução de ratos wistar machos (Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SALIMI, M., SARKAR, S., ALIZADEH, A. M., SABER, R., MORADI, F., DELAVARI, H. Biodistribution, pharmacokinetics, and toxicity of dendrimer-coated iron oxide nanoparticles in BALB/c mice. *International Journal of Nanomedicine*, 18(13), 1483–1493, 2018.

SCHNEIDER, M. C., DE ALMEIDA, G. A, SOUZA, L. M., DE MORARES, N. B., DIAZ, R. C. Controle da Raiva no Brasil 1980 a 1990. *Revista Saúde Pública*, 30(2): 196–203, 1996.

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

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

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

SHARMA, R., AGARWAL, A. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction*. (A. Zini & A. Agarwal, Eds.). Springer-Verlag New York, 2014.

SHAH, M., BADWAIK, V. D., DAKSHINAMURTHY, R. Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1): 344–362, 2014.

SCHATTEN, H; CONSTANTINESCU, M.C. Comparative Reproductive Biology. John Wiley & Sons. Edição 2008.

SUAREZ, S. S. PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1): 23–37, 2006.

TALEBI, A. R., KHORSANDI, L., MORIDIAN, M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Journal Assist. Reprod. Genet.*30(9): 1203–9, 2013.

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.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. Princípios de anatomia e fisiologia. 12^a. edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2010.

YANG, W., THORDARSON, P., GOODING, J. J., RINGER, S. P., BRAET, F. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*, 18(41): 412001, 2007.

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.

WANG, Y.X. J., HUSSAIN, S. M., & KRESTIN, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology*, 11(11): 2319–2331, 2001.

WSPA. Surveying roaming dog populations: guidelines on methodology. *Companion & Working Animals Unit*, 2007.

ZHAO, J., ZHANG, Y., HAO, L., WANG, J., ZHANG, J., LIU, S., REN, B. Effects of a mild heat treatment on mouse testicular gene expression and sperm quality. *Animals Cells and Systems*, 14(4): 267– 274, 2010.

ZHAROV, V. P., GALITOVSKAYA, E. N., JOHNSON, C., & KELLY, T. Synergistic enhancement of selective nanophotothermolysis with gold nanoclusters: Potential for cancer therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 37(3): 219– 226, 2005.

Apêndice A – Ilustração do espectro eletromagnético

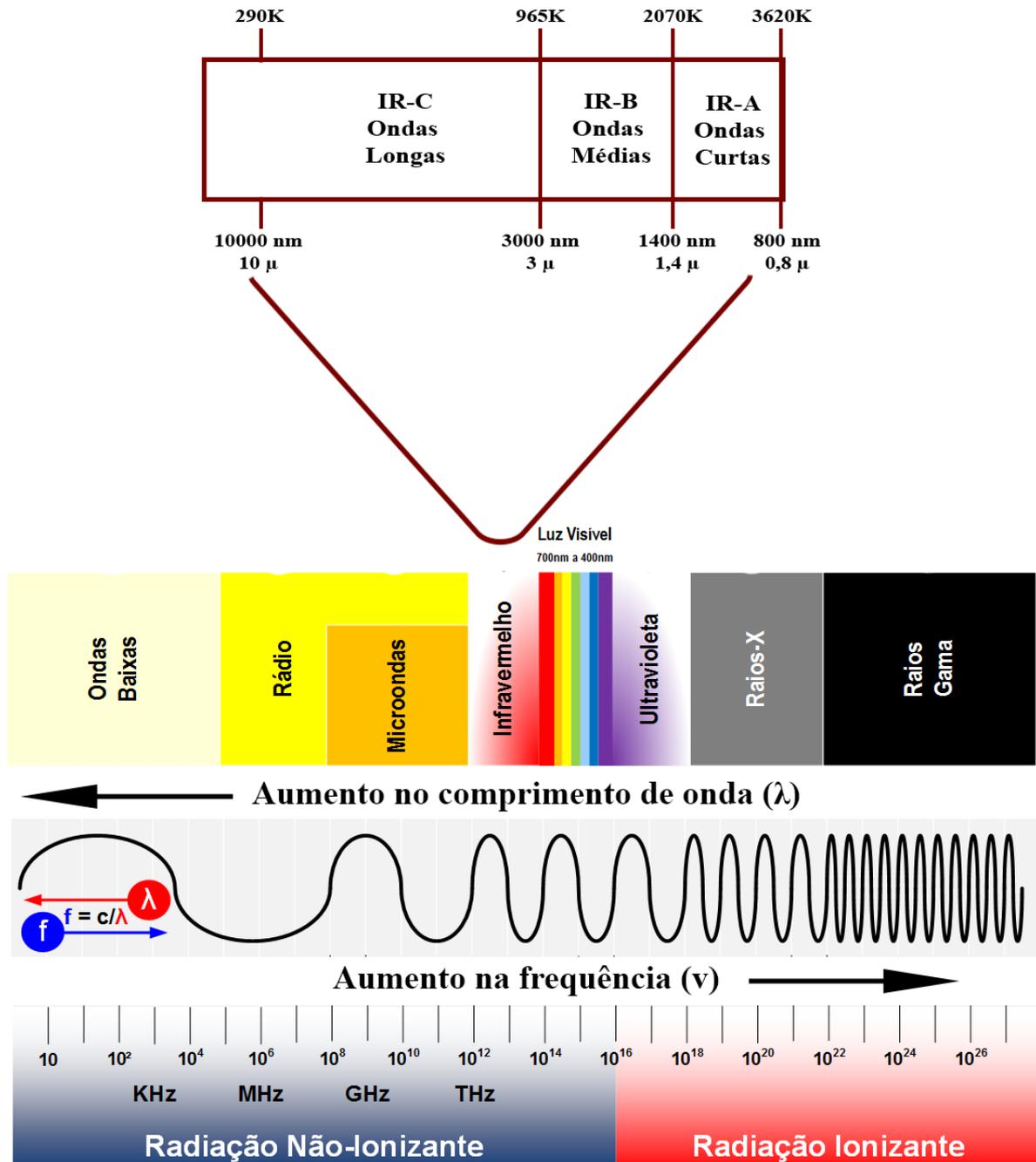


Imagem adaptada de:

<https://www.akarilampadas.com.br/aplicacoes/principios-infravermelho.php>

<http://labcisico.blogspot.com/2013/03/o-espectro-eletromagnetico-na-natureza.html>