



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIEŒNCIA ANIMAL

FERNANDO LEONEL DA SILVA

Efeitos do inibidor de fosfodiesterase-5 (Tadalafil) em regeneração testicular
após estresse térmico.

RECIFE-PE
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIEŒNCIA ANIMAL

FERNANDO LEONEL DA SILVA

EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 (TADALAFIL) EM
REGENERAÇÃO TESTICULAR APÓS ESTRESSE TÉRMICO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal, na área de Morfofisiologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro de Silva Júnior
Co-Orientador: Prof. Dr. Sebastião Rogério de Freitas Silva

RECIFE-PE
Agosto/2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586e Silva, Fernando Leonel da
Efeito do inibidor de fosfodiesterase-5 (Tadalafil) na regeneração testicular após o estresse térmico / Fernando Leonel da Silva. – 2017. 58 f. : il.

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Júnior.

Coorientador: Sebastião Rogério de Freitas Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências.

1. Tadalafil 2. Fosfodiesterase-5 3. Choque térmico I. Silva, Fernando Leonel da, orient. II. Título

CDD 636.089

FERNANDO LEONEL DA SILVA

EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 (TADALAFIL) EM
REGENERAÇÃO TESTICULAR APÓS ESTRESSE TÉRMICO.

Dissertação de Mestrado na área de concentração em Morfofisiologia Animal da UFRPE

Aprovada em 07 / 08 /2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior
Presidente da Banca/ Orientador

Prof. Dr. Bruno Mendes Tenório

Prof. Dr. Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira (UFPE)

Prof. Dra. Fernanda da Chagas Tenório (UFPE)

Dedico:

A Jesus de quem sou aprendiz. Os que estiveram comigo na caminhada da vida, os que me apoiaram (Nilsinho e Renata), Renata, você participou de todas as etapas, Obrigado; Agradeço à mulher mais forte que já vi e que muito amo (Mãe), Meus irmãos (fonte de Aprendizado, apoio e amor), Meus Sobrinhos lindos, Família Lyra, Igreja de Cristo, a estrela das manhãs e os sonhos que vieram com ela (Vanessa eletherio)... todos estiveram ao meu lado e ainda hoje sei que estão... Muito Obrigado. Em especial para Helena, que antes de chegar já é tudo, lhe amo cada dia mais.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Especial ao Professor e Orientador Valdemiro Amaro da Silva Júnior.

À Secretaria do Programa Edna Izabel, por toda organização e apoio, bem como o Coordenador do Progrma Prof. Dr. Rinaldo Mota.

Aproveito para agradecer a farmácia Roval de manipulação por ceder gentilmente o Tadalafil para execução do experimento, em especial Prof. Dra. Catarine Michelle, diretora técnica da farmácia roval de manipulação, essencial para a cooperação técnico-científica.

Ao Prof. Dr. Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira e ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV- UFPE), onde realizamos nosso experimento.

À prof.^a Cristiane Moutinho Lagos e o Laboratório LAIA pela espaço cedido na execução das análises Imunológicas, bem como cooperação técnico científica.

Aos que contribuíram de maneira direta ou indireta nas fases de execução desta pesquisa: Vitor Caiaffo, Vinícius (CAV), Simone, Giselle, Jéssica, Rogério, Marília, Elizandra, Kaká, Moutinho e em especial Alluanan, UFRPE obrigado!

Ao Orientador, Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior, por não desistir da minha pessoa, pelo ensino que de modo peculiar me fez crescer.

“Eu não sou pobre, eu sou sóbrio, de bagagem leve. Vivo com apenas o suficiente para que as coisas não roubem minha liberdade...”

Mujica.

RESUMO

Drogas inibidoras das PDE's tem sido utilizada para tratamento da disfunção erétil, porém seu potencial terapeutico ainda é desconhecido e pouco explorado, dentre elas o Tadalafil, seu uso diário foi investigado em ensaios clínicos e demonstrado ser uma terapia capaz de inibir cadeias inflamatórias, a análise do calor aplicado diretamente sobre o testículo tem fornecido novas informações sobre os mecanismos desencadeadores da inflamação e dos possíveis danos do calor aos tecidos.

O objetido deste estudo foi avaliar o efeito do tadalafil na recuperação do parênquima testicular de ratos Wistar machos, submetidos ao estresse térmico testicular, para tal foram utilizados 54 ratos, Wistar. Distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, onde grupo controle sofreu injúria térmica e tratado com solução salina intraperitoneal e os grupo tratados com tadalafil em dose diária intraperitoneal de 0.9 mg/kg^{-1} e 1.8 mg/kg^{-1} . Estes animais foram submetidos a mesma condição experimental, esubmetidos aos procedimentos de eutanásia e perfundidos intraperiotenamente.

Foram dosados estresse oxidativo de Fígado e Baço, A citocinas IL-6 e TNF- α de tecido esplênico, níveis de testosterona plasmático e análise histopatológica dos testículos.

O peso corporal ou testicular não foi influenciado pela administração de tadalafil, no entanto foi eficaz na redução nos níveis de testosterona plasmático em todos os dias avaliados, responsável também por inibir formação de NO no fígado e baço. O Tadalafil em doses baixas exerceu efeito anti-inflamatório sobre os níveis de TNF- α (diminuindo) e IL-6 (aumento) no parênquima esplênico durante o período experimental. O Tadalafil retardou as lesões provocadas pelo estresse térmico no grupo de 7 dias com as duas doses aplicadas, e 15 dias com dose de 0.9 m/kg pós-estresse no parênquima testicular de ratos, evidenciadas sobre análise histopatológica. Sendo Efizaz e promissor fármaco, principalmente em lesões agudas, necessitando de mais estudos para comprovação e melhor compreensão.

Palavras chave: Choque térmico, testículo, tadalafil, ratos Wistar, fosfodiesterase-5

ABSTRACT

PDE inhibitors have been used for the treatment of erectile dysfunction, but their therapeutic potential is still unknown and little explored, among them Tadalafil, its daily use has been investigated in clinical trials and demonstrated to be a therapy capable of inhibiting inflammatory chains, the analysis of the heat applied directly to the testis has provided new information on the triggering mechanisms of inflammation and possible heat damage to tissues.

The objective of this study was to evaluate the effect of tadalafil on the recovery of the testicular parenchyma of male Wistar rats, submitted to testicular thermal stress, for which 54 Wistar rats were used. Randomly distributed in 3 groups, where the control group suffered thermal insult and treated with intraperitoneal saline and the group treated with tadalafil at a daily intraperitoneal dose of 0.9 mg / kg-1 and 1.8 mg / kg-1. These animals were submitted to the same experimental condition, submitted to euthanasia procedures and perfused intraperitoneally.

Oxidative stress of liver and spleen, cytokines IL-6 and TNF- α of splenic acid, plasma testosterone levels and histopathological analysis of the testis were measured.

Body or testicular weight was not influenced by the administration of tadalafil, but was effective in reducing plasma testosterone levels on all evaluated days, also responsible for inhibiting the formation of NO in the liver and spleen. Low-dose Tadalafil exerted an anti-inflammatory effect on the levels of TNF- α (decreasing) and IL-6 (increase) in the splenic parenchyma during the experimental period. Tadalafil delayed the thermal stress lesions in the 7-day group with the two doses applied, and 15 days with a dose of 0.9 m / kg post-stress in the testicular parenchyma of rats, evidenced on histopathological analysis.

Key words: Thermal shock, testis, tadalafil, Wistar rats, fosphodiesterase 5.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	ANATOMIA DO TESTICULO E ESCROTO	14
2.1	ESTRESSE TÉRMICO E FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES	14
2.2	AS PROTEÍNAS DE ESTRESSE TÉRMICO (HSPS)	17
2.3	AS HSPS E SUA IMPORTÂNCIA PARA A PROTEÇÃO CELULAR	17
2.4	FOSFODIESTERASE E SUA RELAÇÃO COM LESÕES TESTICULARES	18
2.4	TADALAFIL E SUAS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS	21
3	JUSTIFICATIVA	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	OBJETIVO GERAL	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
6	RESULTADOS	28
7	DISCUSSÃO	37
8	CONCLUSÃO	43
9	REFERÊNCIAS	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição do desenho experimental em ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).	25
Tabela 2.	Peso corporal (g), de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).	29
Tabela 3.	Peso testicular (g) de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).	29
Tabela 4.	Dosagem de testosterona plasmática de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).	35
Tabela 5.	Dosagem de oxido nítrico no tecido hepático de ratos Wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico, através da reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). (Média ± desvio padrão). p<0,005.	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura Química do tadalafil.
- Figura 2.** Análise histológica do Testículo de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular e animais tratados com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7 dias pós-estresse térmico.
- Figura 3.** Análise histológica do Testículo de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular e animais tratados com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 15 dias pós-estresse térmico.
- Figura 4.** Análise histológica do Testículo de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular e animais tratados com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 30 dias pós-estresse térmico.
- Figura 5.** Dosagem de testosterona plasmática de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).
- Figura 6.** Dosagem de óxido nítrico no tecido hepático de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).
- Figura 7.** Análise das Citocinas e óxido nítrico do baço de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância

PDEs - Fosfodiesterases

TNF- α - Fator de necrose tumoral

FSH - Hormônio folículo estimulante

ROS - Oxigênios reativos

HS - Estresse térmico

HSP - Proteína de estresse térmico

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

NO- Óxido Nítrico

1. INTRODUÇÃO

Os testículos são órgãos vitais a perpetuação da espécie, extra-abdominais e ficam submetidos a temperaturas entre 2° e 6°C abaixo da temperatura corporal (QUEIROZ, 2013; KASTELIC e COULTER, 2005). Vários mecanismos estão associados na regulação térmica testicular. O cone vascular, formado por veias do plexo pampiniforme circundando a artéria testicular, permite a troca de calor via contracorrente, regulação do fluxo sanguíneo e a perda de calor por irradiação (Queiroz, 2013).

O escroto possui pele fina e pobre em gordura subcutânea, sistemas sanguíneo e linfático bem desenvolvidos criando condições ideais para facilitar a regulação térmica, assim como as inúmeras glândulas sudoríparas presentes para eliminação do calor (KASTELIC e COULTER, 2005). Na temperatura elevada, os mecanismos fisiológicos alocados na termorregulação não são suficientes para manter a temperatura da gônada masculina, determinando sua degeneração (FLORENTINO, 2014).

O aquecimento dos testículos, comumente é causado por saunas e banhos quentes, cujo processo lesivo pode inibir a espermatogênese (MIEUSSET e BUJAN, 1995). Estudos apontam que o aquecimento testicular de forma leve e segura de fato suprime reversivelmente a espermatogênese em várias espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos e ratos (KANDEEL E SWERDLOFF, 1988; ROCKETT et al., 2001; LIU et al., 2012). As alterações morfológicas nos testículos após a exposição do escroto ao calor são marcadas por perda de células germinativas por meio das vias apoptóticas específicas dessas células (YIN et al., 1997; LUE et al., 1999; WANG et al., 2007).

As células testiculares são especialmente vulneráveis ao estresse térmico e sofrem morte por apoptose em resposta a temperaturas supra-escrotais através da expressão da proteína supressora de gene tumoral p53, um potente mediador bioquímico de apoptose induzida pelo estresse térmico (KUMAGAI, 2008). Além disso, o organismo dos animais reage ao calor pela indução ou aumento na síntese de proteínas denominadas “heat shock proteins” ou HSPs, logo o testículo é um órgão desenvolvido para manutenção da temperatura em modos ideais e muito sensível as alterações. (CONTI, 2010)

Evidências recentes indicam que os inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE-5) podem oferecer nova estratégia para o tratamento terapêutico de muitos distúrbios como insuficiência de memória associada a idade, dor, hipertensão pulmonar, esclerose múltipla e insuficiência cardíaca (JAIN et al., 2001; AMBRIZ-TUTUTI et al., 2005). Esses inibidores demonstram ainda efeitos protetores em lesões de órgãos relacionadas com queimaduras graves,

diminuindo o estresse oxidativo e inflamação (UTHAYATHAS et al, 2007; BLUM, 2009; GÖKAKIN et al, 2014). Bem como contribuem para a recuperação da disfunção erétil após prostatectomia e protegem o pênis contra mudanças fisiológicas (MONTORSI et al., 2014).

CADIRCI et al. (2011) mostraram em seus estudos que os grupos tratados com sildenafil apresentaram diminuição no grau de inflamação, indução da síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS) e síntese do óxido nítrico induzível (iNOS), gerando a produção de óxido nítrico (NO). Além disso, foi demonstrado que tem um imenso potencial para o tratamento da dor em animais e seres humanos, isto é, o sildenafil produziu efeito antinociceptivo em modelos animais de dor (KARAKOYUN et al., 2011; GOKAKIN et al., 2014). Nesse sentido, novas formulações desta droga vêm sendo utilizadas visando o prolongamento e melhor entendimento dos seus efeitos, como vardenafil e o tadalafil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA TESTICULAR

Os testículos são componentes vitais a reprodução e por conseqüência à perpetuação das espécies. A espermatogênese é um processo extremamente complexo, dependente de mecanismos que compreendem o código genético das células germinativas e uma rede de comunicação entre estas células germinativas e as células somáticas que estão presentes no testículo (VERHOEVEN et al., 2007). Esse processo é regulado por uma complexa e interligada rede de interação endócrina, parácrina e autócrina entre diversos tipos celulares (ROSER, 2008). Além dos fatores hormonais que estimulam e modulam a espermatogênese, se faz necessário, particularmente para o testículo com localização extra-abdominal, o controle delicado da temperatura entre 2 e 6°C abaixo da temperatura corporal (QUEIROZ, 2013).

A termorregulação testículo-escrotal é um fenômeno intrincado onde numerosos mecanismos locais desempenham papel fundamental. O cone vascular, formado pelas veias do plexo pampiniforme circundando a artéria testicular, permite a troca contracorrente de calor, a regulação do fluxo sanguíneo e a perda de calor por irradiação (BARTH, 1993).

O escroto penduloso aumenta a área de superfície que facilita a exposição do cone vascular ao meio ambiente e permite que os testículos fiquem distantes do corpo do animal

(BLANCHARD et al.,1992).

A pele escrotal é fina, pobre em gordura subcutânea e relativamente sem pêlos; contam ainda com os sistemas sanguíneo e linfático bem desenvolvidos, facilitando a perda térmica por irradiação e evaporação. A sudorese é uma perda de calor importante dada pelo escroto, graças à grande quantidade de glândulas sudoríparas presentes. O músculo cremáster e a túnica Dartos, cuja ação é comandada por nervos simpáticos lombares, relaxam e contraem, afastando ou aproximando os testículos da área inguino-abdominal, posicionando- os em resposta a temperatura do meio ambiente, o que facilita a preservação do gradiente de temperatura abdomino-testicular (KASTELIC e COULTER, 1993).

Os tecidos são susceptíveis a danos pelo calor. No entanto, os testículos são incomuns uma vez que, eles são danificados pela exposição de temperaturas normalmente encontradas dentro do abdômen, embora eles se originem dentro da cavidade abdominal e em alguns mamíferos e a migração para o escroto só ocorra durante o desenvolvimento fetal ou neonatal (SETCHELL, 1998).

A temperatura é um dos importantes fatores ambientais que interfere na reprodução. Temperaturas corporais elevadas, durante períodos de alta temperatura ambiente ou pirexia por doenças, levam à degeneração testicular e reduzem a porcentagem de espermatozóides normais e férteis na ejaculação (JAINUDEEN e HAFEZ, 1995). É o fator de maior importância na espermatogênese dos machos de qualquer espécie e, quando muito elevada (da ordem de 34,5°C), é prejudicial tanto às etapas de formação dos espermatozóides como àqueles elementos já formados e em trânsito pelo epidídimo (MIES FILHO, 1975). Elevada temperatura testicular resultante de incompleta deiscência dos testículos (criptorquidismo), alta temperatura ambiental ou inflamação são prejudiciais para a espermatogênese em todos os mamíferos (FOOTE, 1978). Hansen (1999), Huang et al., (2000). Foote (1978).

O efeito marcante da exposição aguda ou crônica do testículo ao calor é a diminuição da sua massa, o perímetro escrotal e a motilidade espermática. Isso ocorre em ratos no período entre 1 a 2 dias após uma única exposição do testículo a uma temperatura de 41°C por 60 minutos ou 43°C por 30 minutos (SETCHELL e WAITES, 1972; FRIDD et al., 1975; MAIN et al., 1975; BARLETT e SHARP, 1987; GALIL e SETCHELL, 1988; MCLAREN et al., 1994; SETCHELL et al., 1996).

2.1 ESTRESSE TÉRMICO E FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Estresse oxidativo é definido como o acúmulo de espécies de oxigênio reativo (ROS) que são capazes de danificar as estruturas de DNA, carboidratos, lipídios, proteínas e componentes celulares. A função molecular das células é afetada pelo processo de oxidação que determina degeneração, alterando a atividade biológica essencial para a função celular, sua atividade é muito importante para homeostase celular (SILVA, 2006).

As implicações das ROS são importantes para diversos aspectos da vida moderna, desde a indústria alimentícia, impedindo a oxidação de alimentos, a áreas de ciências médicas, tais como neurologia, cardiologia e, mais recentemente, a reprodução. Isso torna cada vez mais claro que o processo de oxidação celular está relacionado muitas vezes com o processo de infertilidade (SILVA, 2006).

As células de Leydig e de Sertoli parecem ser mais resistentes ao calor, enquanto as células germinativas são mais termo-sensíveis do testículo. Todos os estágios da espermatogênese são susceptíveis ao calor, com o grau de lesão dependendo da extensão e da duração do insulto térmico. A regeneração da função espermática, após o dano causado pelo calor, depende da divisão contínua das espermatogônias, originada de um reservatório de linhagens de células altamente resistentes e do intervalo de tempo do término da injúria à restauração de espermatozoides normais no ejaculado, correspondente ao período de início da diferenciação na espermatogênese até a ejaculação (WAITES et al., 1990; SETCHELL, 1998).

A degeneração do epitélio seminífero pode ocorrer rapidamente e, se o período de hipertermia não for muito longo, a recuperação completa pode ocorrer em um período curto de tempo apresentando melhoria visível 60 dias após a remoção do agente causal (McENTEE, 2002). Nas lesões severos, em que a espermatogônia A é atingida pode ocorrer azoospermia (FONSECA e CHOW, 1995). No entanto, a regeneração do epitélio germinativo é possível e dependerá da sobrevivência das espermatogônias e das células de Sertoli. Se não for possível a regeneração, pode-se instalar fibrose ou calcificação nos testículos (THOMSON, 1990; McENTEE, 2002). A fase regenerativa é marcada por recuperação da concentração, da motilidade, do vigor e do número de espermatozoides morfológicamente normais, que, apesar da desorganização do epitélio germinativo durante a fase de degeneração, demonstra grande capacidade de recuperação devido à resistência das espermatogônias e das células de Sertoli (BARTH, 1993; FONSECA e CHOW, 1995; GABALDI, 2000). Diversos tipos de estresse metabólico, como exposição ao calor, a metais

pesados, a e a venenos que afetam a produção de ATP, determinam alterações na expressão de genes que resultam em acúmulo de proteínas de estresse térmico (HSP).

2.2 AS PROTEÍNAS DE ESTRESSE TÉRMICO (HSPs)

As proteínas de estresse térmico (HSPs) estão presentes em todos os organismos vivos, das espécies monocelulares até organismos de humanos, classificadas em famílias de acordo com seu peso molecular: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e pequenas HSPs, dentre estas a HSP27 (JOLLY e MORIMOTO, 2000). O nome de proteínas de estresse de calor originado a partir da observação de que a sua concentração aumenta após a exposição a estresse térmico (SAMBORSKI E GRZYMISŁAWSKI, 2015). As proteínas HSP90 e HSP60 são constitutivas, enquanto que a HSP70 e a HSP27, além de serem constitutivas, também são induzidas por estressores como calor, estresse oxidativo, isquemia, etc. (GARRIDO et al., 2001; VALENTIM et al., 2001; 2003).

As principais funções das HSPs são transportar proteínas para o interior da célula, guiar a conformação de proteínas do citosol, do retículo endoplasmático e da mitocôndria, degradar as proteínas instáveis, dissociar complexos protéicos, prevenir a agregação de proteínas, controlar a atividade de proteínas reguladoras e remodelar proteínas com conformação alterada (GARRIDO et al., 2001).

O organismo dos animais reage ao calor ou a outro estresse qualquer pela indução ou aumento na síntese de um grupo único de proteínas comumente denominadas como “heat shock proteins” ou HSPs. Embora não se conheça exatamente a função dessas proteínas, sabe-se que uma de suas funções é proteger o organismo contra impactos ambientais adversos, em especial a HSP, cujo peso molecular é 70 kDa, a qual desempenha um importante papel em situações de termotolerância. (HUANG et al., 2000).

2.3 PROTEÍNAS DE ESTRESSE TÉRMICO (HSPs) E SUA IMPORTÂNCIA PARA A PROTEÇÃO CELULAR CONTRA A EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE TÉRMICO

As chaperonas moleculares Hsp70 estão implicados numa ampla variedade de processos celulares, incluindo a biogênese protéica, a proteção do proteoma, a recuperação de proteínas a partir de agregados, facilitação da translocação de proteína através da membrana, ativação de proteases, liberação de enzimas lisossomais e proteolíticas, alterações

da estrutura do citoesqueleto e funções mais especializadas, como a desmontagem de complexos de proteínas específicas (CHOI et al., 2009; CLERICO et al., 2015). Estas proteínas ligam-se através do seu domínio de ligação ao substrato para sequências de polipeptídios curtos com motivos de reconhecimento que não são rigorosamente definidos, mas podem ser identificados por características comuns (CLERICO et al., 2015; MAYER e KITYK, 2015).

Nos seus processos biológicos, estas proteínas mostram a capacidade de proteger as células promovendo processo reparador nas proteínas danificadas ou, se necessário, eliminando as proteínas danificadas. Estes mecanismos são muito importantes na imunorregulação, porque podem suscitar a produção de citocinas e expressão da molécula de adesão de uma variedade de tipos de células que podem fornecer sinais de maturação através de interações mediadas pelo receptor (POCKLEY, 2003).

Na verdade, as chaperonas Hsp70 parecem ser inibidores potentes de precursores de morte celular e, assim, quando se tornam elevados no câncer, podem estimular indiretamente o crescimento do tumor (CALDERWOOD e GONG, 2016).

Os investigadores focam sobre o papel das HSP, tanto como um elemento de fisiopatologia em processos imunológicos e como um potencial alvo terapêutico em doenças autoimunes. Além disso, a ativação das Hsps em doenças inflamatórias é investigada e alguns estudos demonstram que a expressão de Hsp70 é estimulada, em tecidos com sinais inflamatórios, pelas células do sistema imunitário (TANAKA et al., 2007; SAMBORSKI e GRZYMISŁAWSKI, 2015). Sua expressão aumenta claramente quando fatores prejudiciais celulares aparecem, incluindo aqueles que acompanham o processo inflamatório (MULTHOFF et al., 2015).

As condições encontradas nas feridas geram um ambiente estressante para as células envolvidas no processo de reparação e inflamação. A indução da expressão de Hsp no tecido ferido demonstrou melhorar a cicatrização, mas eventos inflamatórios extensos podem ser responsáveis pela super expressão de HSPs em tecidos constituidores de quelóides (TOTAN et al., 2011).

As células diretamente expostas a altas temperaturas durante queimaduras, formam imediatamente uma zona de necrose coagulativa. As células menos afetadas na zona de estase ativam as vias de emergência, como uma resposta ao estresse térmico. Além disso, enfrentam um ambiente de agravamento da diminuição da perfusão, a falta de oxigênio, e uma resposta inflamatória maciça. Conseqüentemente, estas camadas de tecido podem tornar-se necróticas em um processo conhecido como progressão de queimaduras (ORGILL

et al., 2005; ORTNER et al., 2015).

2.4 FOSFODIESTERASES E SUA RELAÇÃO COM LESÕES TESTICULARES

As fosfodiesterases (PDEs) correspondem a enzimas que inibem a atividade dos segundos mensageiros nas células por hidrolisarem a ligação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e do GMPc. Estes nucleotídeos cíclicos são importantes reguladores intracelulares de diversos processos, tais como motilidade do músculo liso, sinais neuroendócrinos, homeostase de eletrólitos e fototransdução retinal. Os inibidores de PDEs podem elevar os níveis intracelulares do AMPc e GMPc, de acordo com a especificidade do substrato da PDE em particular que é bloqueada. Estas drogas estimulam a via do óxido nítrico (NO)-GMPc e, por conseguinte, promovem efeitos de relaxamento e vasodilatação (CORBIN et al., 2002; DU PLESSIS, JONGH e FRANKEN, 2004).

A importância fisiológica da PDE5 tem recebido considerável atenção devido a utilização do inibidor seletivo sildenafil (Viagra) no tratamento da disfunção erétil (ROSEN e KOSTIS, 2003; MONTORSI et al., 2004). O desenvolvimento de outras drogas tais como vardenafil (Levitra) e tadalafil (Cialis), que inibem especificamente a PDE5, mas diferem quanto ao perfil de inibição com relação a outras famílias de PDE têm sofrido investimento (SAENZ DE TEJADA et al., 2001; EARDLEY e CARTLEDGE, 2002).

A degeneração testicular pode ser definida como um processo que causa a deterioração da estrutura do testículo, com consequente perda da função testicular. Esta pode possuir diversos fatores etiológicos, tais como o calor, trauma testicular, exposição ao frio, toxinas, isquemia, deficiências nutricionais, administração exógena de andrógenos, infecções, doenças auto-imunes, obstruções do fluxo espermático, neoplasias e radiação (TURNER, 2007). Acredita-se que a manipulação da atividade das fosfodiesterases-5 (PDE-5) pode ter considerável potencial terapêutico em muitas lesões além do preconizado (TEIXEIRA, 2005).

Portanto, inibidores de PDE5 tornaram-se um ponto focal na busca de novos vasodilatadores para uso clínico. Um desses inibidores é o tadalafil, necessitando ainda de estudos no tocante dos efeitos desse fármaco nos vasos sanguíneos. No entanto, presume-se que as propriedades de vasodilatação do tadalafil são semelhantes aos do sildenafil em artérias isoladas, apesar das diferenças nos seus parâmetros farmacocinéticos (SUSSMAN, 2004).

novas vias de regulação molecular têm sido identificadas com objetivo de mapear os diversos tipos de transdução de sinais relacionados com a formação de moléculas sinalizadoras dentro da célula. Novos componentes de sinalização foram estabelecidos e suas funções vêm sendo continuamente descobertas. Estas funções são complexas, principalmente quando integrado ao metabolismo intermediário dos nucleotídeos cíclicos dependentes da transdução do sinal e seus componentes, incluindo as fosfodiesterases (PDE's) (CONTI et al., 1995, CONTI, 2000).

A PDE apresenta, em sua composição, três regiões sendo uma de domínio regulatório, uma de domínio inibitório e outra de domínio catalítico, estruturalmente conservadas em todas as PDEs estudadas (CONTI et al., 1995, SALANOVA et al., 1999). O domínio regulatório funciona como um sensor de sinais intracelulares, estimulado pelos segundos mensageiros (AMPc e Ca^{2+}). A recepção destes sinais produz uma mudança na conformação da PDE de maneira que o domínio inibitório exerce, não por muito tempo, efeito negativo sobre a catálise do segundo mensageiro. Por sua vez, o domínio catalítico, é o local onde esta enzima promove a hidrólise do segundo mensageiro quando estimulada pelo complexo cálcio-calmodulina (CONTI, 2000).

Existem algumas substâncias que podem interferir na regulação intracelular de AMPc e GMPc, as quais são denominadas de inibidoras das fosfodiesterases, que promovem aumento nas concentrações de nucleotídeos cíclicos intracelular (SALAM, 2003).

As xantinas, incluindo a cafeína e a teofilina presentes no café e no chá, são inibidores de PDEs utilizados em tratamentos de distúrbios cardiovasculares e pulmonares. Alguns inibidores de PDEs podem ser utilizados para modular o sistema endócrino, principalmente no controle de secreção hormonal e manipulação de sensibilidade de órgãos alvo aos hormônios (HADLEY, 1996, KUMARI, 1997).

2.5 TADALAFIL E SUAS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Desde a introdução do sildenafil em 1998, a disfunção erétil foi eficientemente tratada com medicamentos orais. O Tadalafil (Figura1) no mercado somado ao sildenafil, como mais um tipo de inibidor de fosfodiesterase 5 (PDE-5). (TEIXEIRA, 2005).

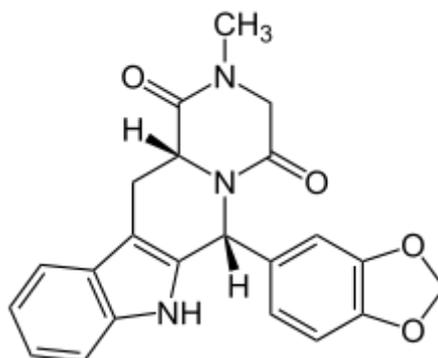


Figura 1: Estrutura química do tadalafil ($C_{22}H_{19}N_3O_4$).
 Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2016

Tadalafil é um inibidor de fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) utilizado para o tratamento da disfunção erétil (DE). Tadalafil é administrada antecipadamente à atividade sexual têm sido eficaz na melhora da função erétil durante aproximadamente 36 horas (CARSON et al, 2004; YOUNG et al, 2005). Devido a este longo período de eficácia, o uso diário de tadalafil foi investigado em ensaios clínicos e demonstrado ser uma terapia contra DE bem tolerada e eficaz (PORST et al., 2006; RAJFER et al., 2007) Cada vez mais utilizado por sua capacidade para inibir a degradação do guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a molécula também é o segundo mensageiro de óxido nítrico (WAYNE et al., 2008).

Os papéis reguladores clássicos atribuídos a cGMP são o estímulo ao relaxamento do músculo liso, a desgranulação de neutrófilos, inibição da agregação de plaquetas e a iniciação da transdução de sinal visual. Além disso, numerosas outras funções fisiológicas tem sido descobertos (CORBIN e FRANCIS, 1999). KO et al. (2009) demonstraram que o tadalafil atua inibindo a ação apoptótica e previne lesões por morte celular programada no hipocampo, podendo contribuir com o reparo de lesões em áreas da memória cerebral.

Além dos efeitos na DE, vem sendo utilizado como redutor da pressão arterial pulmonar através do seu efeito vasodilatador, incluindo contínua infusão intravenosa de prostaciclina, contínua inalação de óxido nítrico e prostaciclina aerosolizada, entre outros. (HUMPL et al., 2005; KO, et al., 2009).

A vasodilatação pulmonar com inibidores de PDE5 tem sido demonstrada em animais com hipertensão pulmonar experimental e em humanos com hipertensão arterial pulmonar primária e secundária (MICHELAKIS et al., 2002; 2003; GHOFrani et al., 2002).

Esta droga vem revolucionando o tratamento da hipertensão pulmonar, que é uma

doença vascular agressiva e com baixa expectativa de vida. O mecanismo de ação desta droga atenua os sinais e sintomas da doença por aumentar o suprimento sanguíneo aos pulmões. A pressão sistólica, a hipertrofia ventricular e a muscularização das artérias pulmonares são reduzidas após esquema terapêutico (ZHAO et al., 2001; 2003).

Foi relatado que esta linha de fármacos ampliam a vasodilatação induzido por óxido nítrico em vasos humanos (CREMERS et al., 2003) e causa dilatação das artérias coronárias epicárdicas quando administrado a pacientes com doença arterial coronariana (HALCOX et al., 2002). Isoladamente nas artérias aorta, mesentéricas e coronárias, o sildenafil aumentou os níveis de GMPc e induziu o vasorelaxamento na ausência de óxido nítrico exógeno devido, provavelmente, a uma amplificação de ON/GMPc preexistente nesses vasos (BUVINIC e HUIDOBRO-TORO, 2001; MOCHIDA et al., 2002; SAKUMA et al., 2002). Portanto, inibidores de PDE5 tornaram-se um ponto focal na busca de novos vasodilatadores para uso clínico. Um desses inibidores é o tadalafil, necessitando ainda de estudos no tocante dos efeitos desse fármaco nos vasos sanguíneos. No entanto, presume-se que as propriedades de vasorelaxamento do tadalafil são semelhantes aos do sildenafil em artérias isoladas, apesar das diferenças nos seus parâmetros farmacocinéticos (SUSSMAN, 2004).

Dados experimentais mostraram que tadalafil, mas não sildenafil ou vardenafil, inibiu a vasoconstrição hipóxica pulmonar através da atenuação de hipóxia-induzida pela expressão de citocina na artéria pulmonar (TSAI et al., 2006). Foi relatado que o sildenafil amplia a vasorelaxamento induzido por óxido nítrico em vasos humanos (CREMERS et al., 2003) e causa dilatação das artérias coronárias epicárdicas quando administrado a pacientes com doença arterial coronariana (HALCOX et al., 2002). Isoladamente nas artérias aorta, mesentéricas e coronárias, o sildenafil aumentou os níveis de GMPc e induziu o vasodilatação na ausência de ON exógeno devido, provavelmente, a uma amplificação de ON/GMPc preexistente nesses vasos (BUVINIC e HUIDOBRO-TORO, 2001; MOCHIDA et al., 2002; SAKUMA et al., 2002). Portanto, inibidores de PDE5 tornaram-se um ponto focal na busca de novos vasodilatadores para uso clínico. No entanto, presume-se que as propriedades de vasodilatação do tadalafil são semelhantes aos do sildenafil em artérias isoladas, apesar das diferenças nos seus parâmetros farmacocinéticos (SUSSMAN, 2004).

Tadalafil, inibiu a vasoconstrição hipóxica pulmonar através da atenuação de hipóxia-induzida pela expressão de citocina na artéria pulmonar (TSAI et al., 2006). Seu efeito reparador vem sendo apresentado onde pesquisa recente descreve que o Tadalafil contribui no reparo da lesão testicular de isquemia por reperfusão após torção / destorção testículo de forma tempo e dose-dependente (WU et al., 2015; AKGÜL, et al.,

2011)

O sildenafil inibe a apoptose através do aumento do citocromo-c secreção e a relação de Bcl-2 / Bax através do óxido nítrico (KUKREJA, et al., 2005). O tadalafil por suas características farmacológicas pode superar os mesmos mecanismos (EROL, 2015). AKGÜL et al. (2011) avaliaram os efeitos de sildenafil, vardenafil, tadalafil e sobre a apoptose renal após obstrução ureteral, determinaram que todos os três inibidores da PDE5 foram eficazes na redução do número de células apoptóticas. Em outro estudo de lesão de reperfusão, que apresenta características parecidas com a lesão térmica também corrobora com esta conclusão. Em estudos anteriores, o aumento da expressão de iNOS e eNOS foi relatada durante a isquemia-reperfusão (I/R) testicular, e administração de tadalafil reduziu este aumento (COSENTINO, et al., 1985; USTÜN, 2008; EROL, et al., 2009; HANCI, et al., 2010). A maior expressão de eNOS e INOS provoca aumento de NO para níveis tóxicos, resultando na apoptose de células germinativas testiculares (ZINI, 1998; EROL, et al., 2009). Guzeloglu et al. (2011) relataram que os níveis de CAT aumentou no grupo tratado com o tadalafil, mas os níveis totais de capacidade oxidante não foram diferentes no grupo placebo. O tadalafil neste ensaio ainda exerceu efeito protetor sobre os tecidos, através do aumento da capacidade antioxidante e os pesquisadores determinaram assim que a necrose tubular renal, congestão e infiltração de células mononucleares na região intersticial foram mínimas em um grupo de ratos tratado com tadalafil.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos relatos sobre o efeito protetor da Tadalafil, sobretudo em torções testiculares pouco se sabe a cerca de sua ação na fisiologia da reprodução do macho, particularmente após exposição a situações de estresse pelo calor. Neste sentido, é válida a realização de estudos que aprofundem os conhecimentos sobre o perfil das alterações determinadas pelo aumento da temperatura testicular, assim como sobre o uso do tadalafil como uma possível terapia protetora e mantenedora da fisiologia reprodutiva masculina, com destaque para as situações de estresse térmico. O estudo visou obter o perfil das alterações reprodutivas ocasionadas pelo estresse térmico em ratos Wistar machos, bem como instituir uma terapia que favoreça a proteção e recuperação do parênquima testicular submetido ao estresse pelo calor, com melhoria da eficiência reprodutiva.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o desenvolvimento das alterações geradas pelo estresse térmico e o efeito do tadalafil na recuperação do parênquima testicular de ratos Wistar submetidos ao estresse térmico testicular.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Medir os pesos testicular e corporal nos grupos experimentais;

4.2.2 Determinar os níveis plasmáticos de testosterona;

4.2.3 Dosar os níveis de citocinas no baço em animais submetidos ao estresse térmico e tratados ou não com tadalafil.

4.2.4 Determinar os níveis de Óxido Nítrico no fígado e baço do animais tratados ou não.

4.2.5 Análisar histopatologicamente os testículos de Tatos Winstar, Tratados ou não com Tadalafil, pós estresse térmico testicular.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 54 ratos WISTAR (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), machos com 90 dias de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (50%) controladas e regime de iluminação cíclica (12h claro e 12h escuro). Os animais receberam dieta padrão (Purina Labina) e água *ad libitum*. Todos os experimentos utilizando animais foram conduzidos de acordo e após a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA/UFPE), registrada com o nº 0028/2016, o experimento foi realizado no Centro Acadêmico de Vitória (CAV- UFPE).

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL E ESTRESSE TÉRMICO

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos em cada fase (TABELA 1), ao todo foram três tempos, por até 7, 15 e 30 dias (formando um ciclo completo de espermatogênese, com dias de lesão aguda e sub crônica), a administração Tadalafil com dose diária de 0.9 mg/kg^{-1} e Tadalafil com dose diário de 1.8 mg/kg^{-1} via intraperitoneal e o

grupo controle (GC), estes submetidos a mesma condição experimental dos grupos tratados com a exceção da administração de uma solução veículo (Água Destilada) em substituição da droga.

Tabela 1. Descrição do desenho experimental em ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).

Grupos	7 dias	15 dias	30 dias	Total
Controle/ Heat Shock	6	6	6	18
HS+ Tadalafil 1 0.9 mg/kg⁻¹	6	6	6	18
HS+ Tadalafil 2 1.8 mg/kg-1	6	6	6	18
Total de animais	18	18	18	54

A pesagem dos animais era realizada diariamente, para acompanhamento do peso corporal e cálculo das doses das drogas. A princípio os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com Ketamina (Vetanarcol, 100 mg/kg) e Xilazina (Kensol, 5 mg/kg) para que os testículos e a cauda fossem imersos por 15 minutos em água na temperatura de 43°C de acordo com protocolo estabelecido por Queiroz et al. (2013). Posteriormente à exposição térmica, os animais foram transferidos para suas gaiolas e mantidos em temperatura ambiente até a recuperação da anestesia. Os animais de cada grupo foram perfundidos nos dias 7, 15 e 30 após a realização do estresse térmico testicular (Hs) para observação da influência do tadalafil sobre a recuperação da lesão testicular. Antes da realização da perfusão, cada animal foi heparinizado (125 UI/100g de peso corporal) e anestesiado conforme explicação anteriormente descrita.

5.3 COLETA DO MATERIAL

No final do período experimental, os animais foram heparinizados (125 UI / 100 g; Akzo Organon Teknika), anestesiados (Ketamina (Vetanarcol, 100 mg/kg) e Xilazina (Kensol, 5 mg/kg)) e submetidos a perfusão intracardíaca usando uma solução de NaCl a 0,9% e heparina (500 IU / l) e nitroprussiato de sódio (100 mg / l, Sigma). Depois disso, todos os ratos foram perfundidos com 4% de glutaraldeído (VETEC) em um tampão de fosfato de sódio (pH 7,2 e 0,01 M). Após a fixação, os testículos esquerdos foram removidos

e pesados usando uma balança (BEL Engenharia MARK 500 / BRA \pm 0,001 g) segundo protocolo estabelecido por ANTONIO et al. (2016).

5.4 HISTOPATOLOGIA TESTICULAR

Os testículos direitos foram coletados e pesados antes da perfusão com solução fixadora. Posteriormente, os mesmos foram clivados e fixados em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,01M). Posteriormente, os testículos foram recortados com uma espessura de 2 mm e re-fixados com a mesma solução de paraformaldeído. Os testículos esquerdos foram perfundidos com 4% de glutaraldeído (VETEC) em solução de tampão de fosfato de sódio (pH 7,4 e 0,01 M). Em seguida, os fragmentos foram imersos em tampão de fosfato, durante 2 h e posteriormente desidratados numa série de álcool crescente (70 - 100%) e embebidos em resina plástica composta de metacrilato de glicol (Leica). Os cortes histológicos 4 μ m de espessura foram corados com azul de toluidina e analisados morfológicamente. A análise histopatológica dos componentes testiculares foi realizada segundo protocolo estabelecido por SILVA-JÚNIOR et al. (2006) e TENORIO et al. (2012) e as leituras foram realizadas utilizando um microscópio óptico (Nikon 501, Tóquio, Japão).

5.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO EM HOMOGENEIZADO DE FÍGADO E DO BAÇO

A Avaliação do nível de peroxidação lipídica do tecido (PLx) foi tomada com o teste de substância reativa de ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Ohkawa et al., (1979); Utilizou-se uma solução de 1,51% de KCl para homogeneizar 250 mg de tecido de fígado e baço e 0,2 ml de 1,7% de sulfato de sódio (SDS), 1,5 ml de solução de ácido acético a 20% (pH 3,5), 0,8% de TBA e 0,6 ml de água destilada foram adicionados a 0,2 ml de homogeneizado de tecido. As misturas foram aquecidas a 95 ° C durante uma hora. Após arrefecimento com água da torneira, foram adicionados 5 ml da mistura de n-butanol e piridina (15: 1) e depois centrifugados a 4000 rpm durante 20 min. Esta camada orgânica foi medida a 532 nm de absorvência. O 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) foi utilizado como padrão externo, e o nível de peróxidos lipídicos foi expresso em nmol / mg de tecido úmido.

5.6 ANÁLISE DA TESTOSTERONA PLASMÁTICA

As amostras de sangue foram colhidas por punção na convergência das veias cava cranial e caudal, dessoradas por centrifugação e acondicionadas em recipientes plásticos Eppendorf (dois por amostra). O material sorológico foi conservado em freezer doméstico a -20°C . A avaliação da dosagem foi realizada, pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm, conforme descritos por Brown et al. (2004). Desta forma 66,7 μl do anticorpo (Polyclonal anti-testosterona R156/7, Coralie Munro, University of California, Davis, USA.) foi diluído em 5 mL de tampão (coating buffer; Na_2CO_3 , NaHCO_3 , H_2O ultra pura, pH ajustado para 9,6) e 50 μl desta solução de anticorpo foram adicionados em cada poço da placa (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp). Posteriormente, a placa foi coberta com selador plástico e mantida a 4°C por no máximo 12 horas. Em seguida foi elaborada a curva padrão, séries de diluições de 250 μl do padrão de concentração 600 pg/50 μl de testosterona (17-hydroxy-4-androsten-3-one, Steraloids, Sigma A6950) até a concentração de 2,3 pg/50 μl , em 250 μl de solução de ensaio de ELISA (NaH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; NaCl ; BSA - Sigma Aldrich, A7906; H_2O ultra pura, pH ajustado para 7,00). O hormônio conjugado com a enzima HRP (Testosterone-horserradish Peroxidase) também foi diluído (33,3 μl em 5 mL da solução de ensaio de ELISA). A solução de substrato para ELISA foi concluída com um combinando 40 μl 0,5M H_2O_2 , 125 μl 40 mM ABTS (Calbiochem, ABTSTM Chromophore, Diammonium Salt) e 12,5 mL de solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; H_2O ultra pura, pH ajustado para 4,00). Para cada poço contendo o material do estudo ou controle, foi adicionado 100 μl . As placas foram cobertas e incubadas em temperatura ambiente e sob agitação (Multi-Pulse Vortexer; modelo 099A VB4, 50 / 60Hz – Glass-Cols), até que a densidade óptica dos poços zero fique entre 0.9 e 1. Então, foi procedida a leitura no leitor de microplacas (TECAN). Para evitar maiores desvios as amostras foram lidas em duplicada mantendo o coeficiente de variação intra e inter-ensaio menor do que 10%. Os níveis plasmáticos da testosterona dos animais foram medidos em nMol/L, ng/mL e pela relação entre concentração e volume (CV%) do hormônio (SILVA JÚNIOR et al, 2006; TENORIO et al, 2011).

5.7. DOSAGEM DE CITOCINAS DE SANGUE PERIFÉRICO

A dosagem de citocinas nos sobrenadantes de sangue coletados a partir das células esplênicas, foi determinada através da técnica de Cytometric Bead Array System (CBA). A CBA foi utilizada para a mensuração quantitativa das citocinas TNF- α e IL-6, conforme

recomendado pelo fabricante em amostras de sangue periférico animal, as células do baço são lisadas e após a trituração são centrifugados a 4000 rpm durante 10, após é coletado o sobrenadante, após este procedimento, a análise foi feita em citômetro de fluxo (automático) e utilizado o software CellQuest Pro (Beckton Dickson).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dependendo da tendência normal dos resultados obtidos, utilizou-se testes paramétricos ou não paramétricos. Para os dados considerados normais foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações, visando analisar quais grupos diferiram entre si. Em todas as análises realizadas, os dados foram expressos através de estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$. Os gráficos foram confeccionados no programa Microsoft® Office Excel, 2013

6. RESULTADOS

6.1. AVALIAÇÃO DOS PESOS CORPORAL E TESTICULAR

De acordo com a Tabela 2 e 3, podemos observar que não ocorreu variação significativa entre os diferentes grupos experimentais com relação ao peso corporal e testicular.

Tabela 2. Peso corporal (g), de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados e não tratados com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média±desvio padrão).

Dias	Animais (n)	Controle HS (choque térmico) (Grupo 1)	HS + Tadalafil (0.9 mg/kg) (Grupo 2)	HS+ Tadalafil (1.8 mg/kg) (Grupo 3)	<i>p</i>
7	6	236,00± 32,49	225,833± 23,04	243,667± 44,56	0,675
15	6	250,83± 13,12	231,83± 18,90	242,50± 21,13	0,221
30	6	280,66± 27,20	270,66± 41,59	272,83± 45,08	0,896

Tabela 3. Peso testicular (g), de ratos wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico (Média ± desvio padrão).

Dias	Animais (n)	Controle HS (choque térmico) (Grupo 1)	HS + Tadalafil (0.9 mg/kg) (Grupo 2)	HS+ Tadalafil (1.8 mg/kg) (Grupo 3)	<i>p</i>
7	6	0,97 ± 0,10	0,95 ± 0,09	1,18 ± 0,09	0,015
15	6	0,58 ± 0,04	0,58± 0,47	0,57 ± 0,09	0,952
30	6	0,58± 0,10	0,58 ± 0,01	0,57 ± 0,09	0,952

6.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Nas figuras que seguem (figuras 2, 3 e 4), observamos as alterações histopatológicas, onde figura 2, refere-se a grupo tratados por 7 dias, Figura 3 com os animais tratados por 15 dias e Figura 4 com os animais tratados por 30 dias. De todas essas Imagens, **A** e **B** referen-se a grupo controle, **C** e **D** animais tratados com 0.9 mg/kg de Tadalafil e **E** e **F** com animais tratados com 1.8 mg/kg de tadalafil. Onde analisamos em legenda os achados encontrados.

De acordo com achados histopatológicos observados no parênquima testicular no 7º dia após a realização do estresse térmico os animais do grupo estresse térmico (HS- Heat Shock) apresentaram lesões no epitélio seminífero compatíveis com degeneração testicular. Pode ser observado espessamento de membrana basal, vacuolização de células de Sertoli, presença de células gigantes sinciciais oriundas de espermátides arredondadas, sendo observado no compartimento basal apenas células de Sertoli, em especial o grupo não tratado (Figura 2A e B). apresentou lesões semelhantes, porém mais extensas

No sétimo dia, o testículo dos animais tratados com 1.8 mg/Kg de tadalafil depois do estresse térmico possuía poucas áreas de lesões compatíveis com degeneração testicular pelo calor. Apesar da existência de alterações do epitélio germinativo como morte celular de espermátocitos foi possível observar em todo parênquima testicular, túbulos seminíferos preservados. Nesta dosagem a tadalafil parece ter exercido maior papel inibidor dos mecanismos desencadeados pelo estresse térmico testicular. (Figura 2 E e F).

Após quinze dias da realização do estresse térmico testicular nos animais do grupo controle, foi possível evidenciar condensação e descamação de espermátides arredondadas, espeçamento e deformação tubular, ligadas aos prolongamentos das células de Sertoli mais evidentes nesta fase do experimento (Figura 3 A e B).

Nos animais tratados com 0.9mg/Kg de tadalafil, apresentavam alguns túbulos seminíferos com lesões compatíveis a processo degenerativo tais como descamação celular e formação de sincício de espermátides arredondadas. Por outro lado, pode ser observado presença de túbulos seminíferos sem alteração na sua forma arredondada, presença de células em necrose e lesões extensas. (Figura 3 C; D).

Nos animais tratados com 1.8mg/Kg de tadalafil por quinze dias alguns túbulos seminíferos também apresentavam lesões compatíveis com o processo degenerativo, decorrente do estresse térmico testicular semelhante aos demias grupos, com túbulos mais preservados (Figura 3 E e F).

Após 30 dias da realização do estresse térmico testicular nos animais do grupo controle, o processo degenerativo do parênquima deste órgão se tornou bastante pronunciado com o agravamento das lesões reportadas anteriormente. O tecido apresentou muita área de necrose e parênquima testicular bastante espesso (Figura 4 A e B).

Os animais tratados com 0.9mg/Kg de tadalafil, apresentavam alguns túbulos seminíferos com lesões compatíveis a processo degenerativo tais como descamação celular e formação de sincício de espermátides arredondadas, necrose celular, porém se mantinha a forma arredonda dos túbulos. (Figura 4 C; D). Nos animais tratados com 1.8mg/Kg de tadalafil por 30 dias, alguns túbulos seminíferos também apresentavam lesões compatíveis com o processo degenerativo decorrente da aplicação de calor no tecido testicular, células em necrose, no entanto (Figura 4 E e F). observou-se aumento parcial das lesões, com células degeneradas e processo de necrose nos animais em todos os grupos, caracterizando efeito progressivo da lesão térmica no experimento.

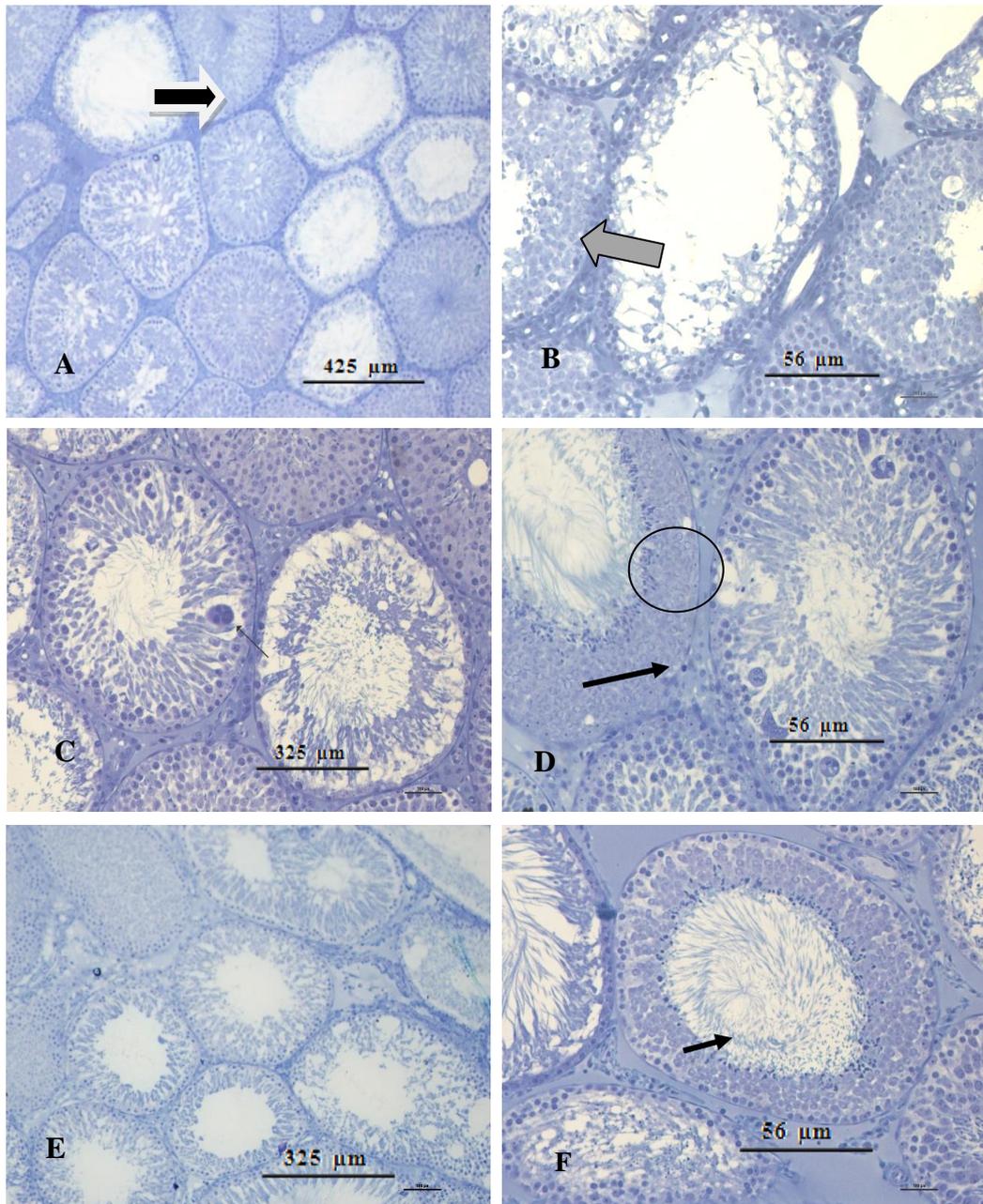


Figura 2. Fotomicrografias de testículos de Ratos Wistar adultos submetidos à choque térmico testicular aos 7 dias de idade tratados com tadalafil e grupo controle (Sofreram choque, porém sem tratamnto com a droga).

Figura 2A. Túbulo seminífero do grupo controle submetido a choque térmico com células em processo de degeneração. (seta). 20X.

Figura 2B. Detalhe túbulo seminífero do grupo controle submetido a choque térmico. Notar vacuolização no núcleo das células de Sertoli. (seta). 40X

Figura 2C. Túbulo seminífero do grupo tratado com 0.9 mg/Kg submetido a choque térmico com presença de células gigantes arredondadas (seta). 100X em imersão.

Figura 2D. Detalhe túbulo seminífero do grupo tratado com 0.9 mg/Kg submetido a choque térmico testicular. Observar a redução do epitélio germinativo, células gigantes (circulo) e células gigantes (seta). 40X.

Figura 2E. Túbulo seminífero do grupo tratado com 1.8mg/Kg de tadalafil submetidos a HC.

Figura 2F. Túbulo seminífero do grupo tratado com 1.8mg/Kg de tadalafil submetido a choque térmico. Seta mostrando manutenção da espermatogênese. 40X em imersão.

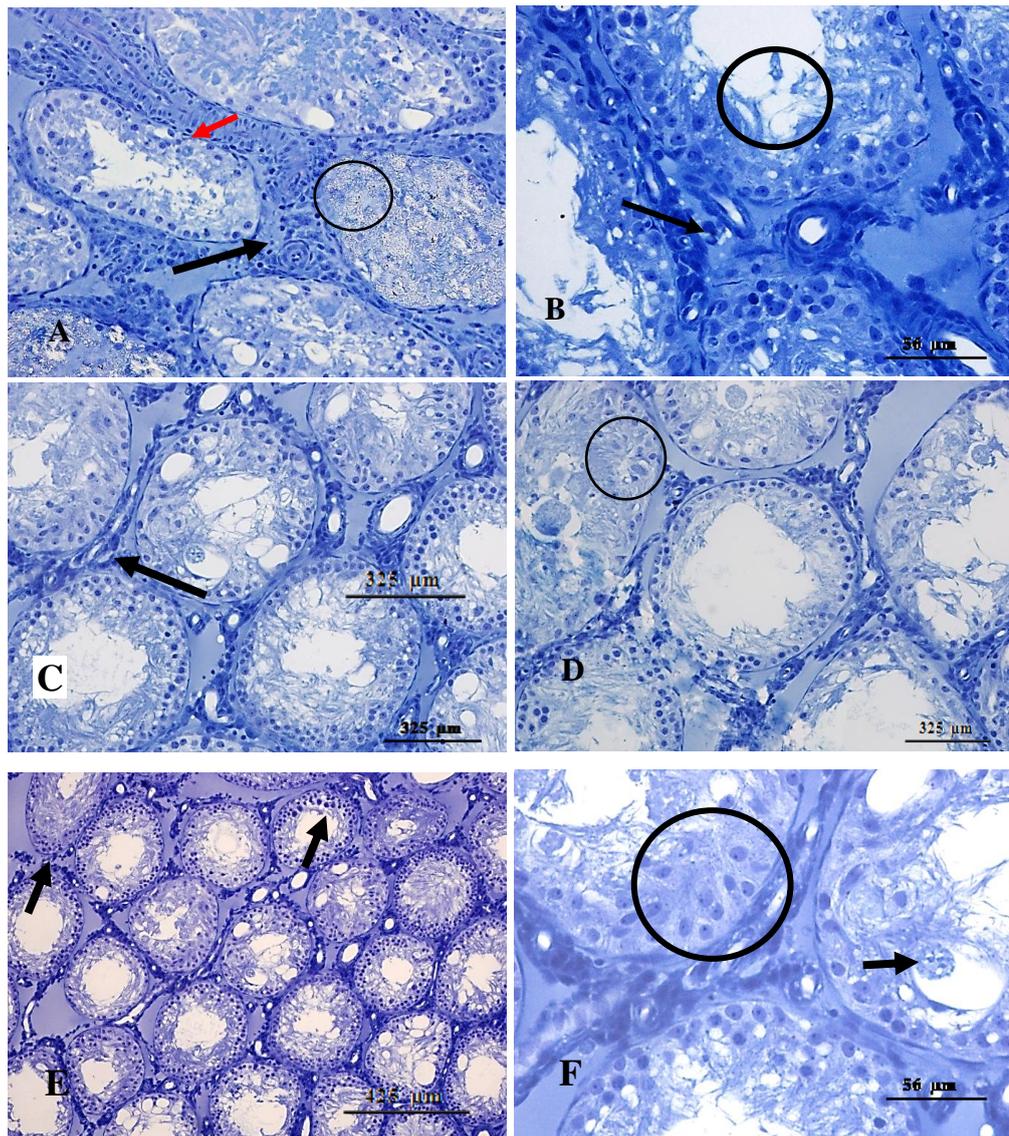


Figura 3. Fotomicrografias de testículos de Ratos Wistar adultos submetidos à choque térmico testicular aos 15 dias, mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Figura 3A. Túbulo seminífero do grupo controle submetido a choque térmico com células germinativas degeneradas, sinais de necrose (circulo) células em processo de descamação (seta vermelha). extravassamento de células de Leydig (seta preta). 40X.

Figura 3B. Detalhe túbulo seminífero do grupo controle submetido a choque térmico. Notar ausência de células germinativas próximas o lume tubular (circulo). Vacuolização no núcleo das células de Sertoli (seta). 100X em imersão.

Figura 3C. Túbulo seminífero do grupo tratado com 0.9 mg/Kg submetido a choque térmico e bastante vacuolização de células de Sertoli (seta). 40X.

Figura 3D. Detalhe túbulo seminífero do grupo tratado com 0.9 mg/Kg submetido a choque térmico testicular. processo de necrose e edema (circulo). 40X.

Figura 3E. Túbulo seminífero do grupo tratado com 1.8mg/Kg de tadalafil submetido a choque térmico. Notar túbulo seminífero com células ainda presentes (seta). 40X.

Figura 3F. Túbulo seminífero do grupo tratado com 1.8mg/Kg de tadalafil submetido a choque térmico. Notar túbulos seminífero com células germinativas gigantes (seta), e túbulo adjacente com o epitélio germinativo sem alterações aparentes (circulo). 100X em imersão.

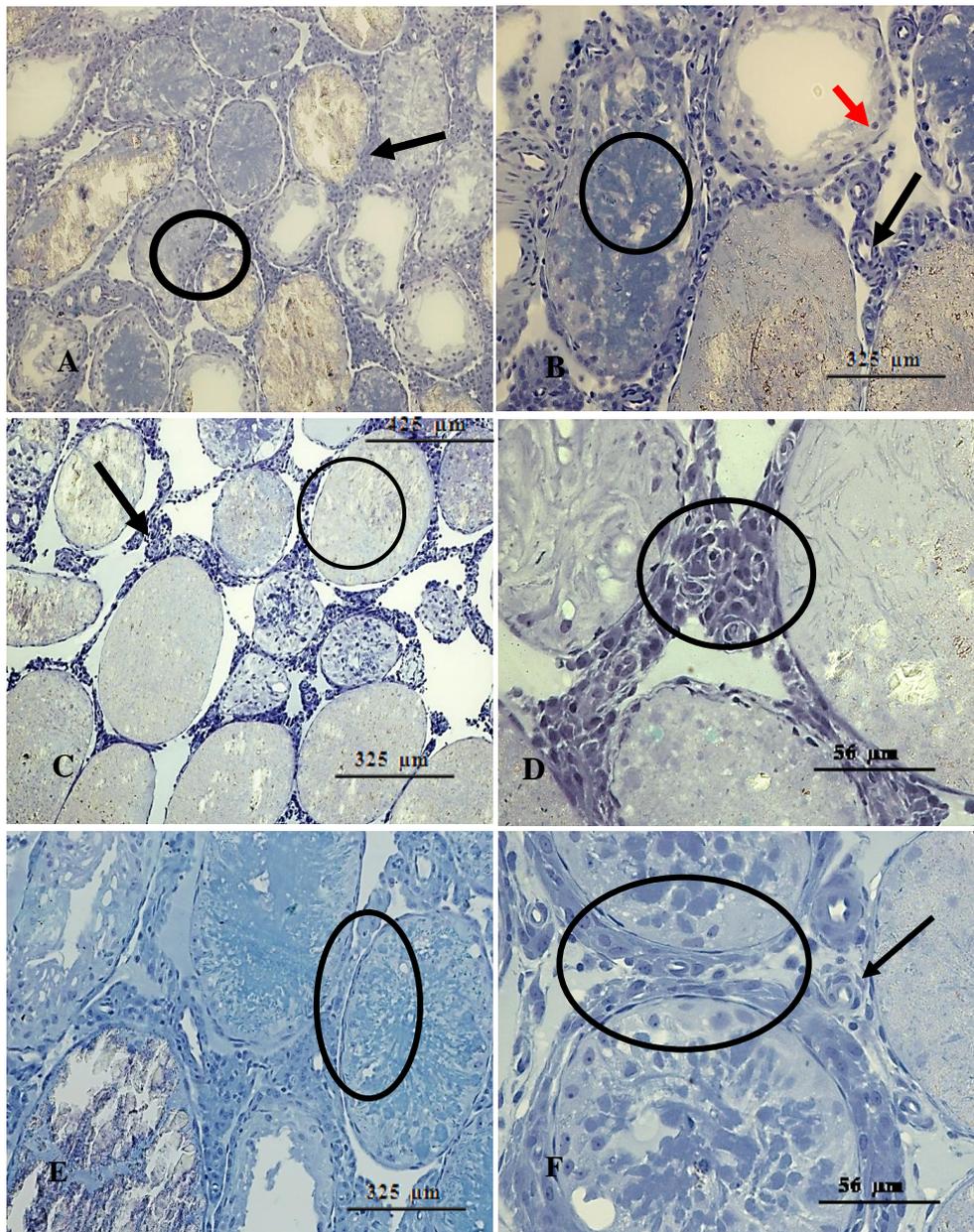


Figura 4. Fotomicrografias de testículos de Ratos Wistar adultos submetidos à choque térmico testicular aos 30 dias de idade tratados com tadalafil e grupo controle (Sofreram choque, porém sem tratamento com a droga).

Figura 4A. Túbulo seminífero do grupo controle submetido a choque térmico com espermátides em alongamento degeneradas com edema e células em processo de degeneração.(Circulo), alteração na morfometria circular das células espermáticas (seta) 20X.

Figura 4B. Detalhe túbulo seminífero do grupo controle submetido a choque térmico. Notar ausência de células germinativas próximas o lume tubular, espermátides em alongamento degeneradas com edema (circulo), células em processo de descamação e degeneração (seta vermelha), Estravasamento de células de Sertoli (seta preta). 40X.

Figura 4C. Túbulo seminífero do grupo tratado com 0.9 mg/Kg submetido a choque térmico com vacuolização de células de Sertoli (seta preta). Observar redução na população de células germinativas e células geminativas em processo de necrose (circulo) 40X..

Figura 4D. Detalhe túbulo seminífero do grupo tratado com 0.9 mg/Kg submetido a choque térmico testicular. Degeneração e edema (circulo). 40X.

Figura 4E. Túbulo seminífero do grupo tratado com 1.8mg/Kg de tadalafil submetido a choque térmico. Degeneração de espermatídes e vacuolização de núcleo de células de Leydig. (circulo) 40X.

Figura 4F. Túbulo seminífero do grupo tratado com 1.8mg/Kg de tadalafil submetido a choque térmico. Notar túbulos seminífero com células germinativas em necrose e túbulo e bastante células de Leydig presentes (circulo), porém formato arredondado preservado (seta) 100X em imersão.

6.3. DOSAGEM DE TESTOSTERONA PLASMÁTICO

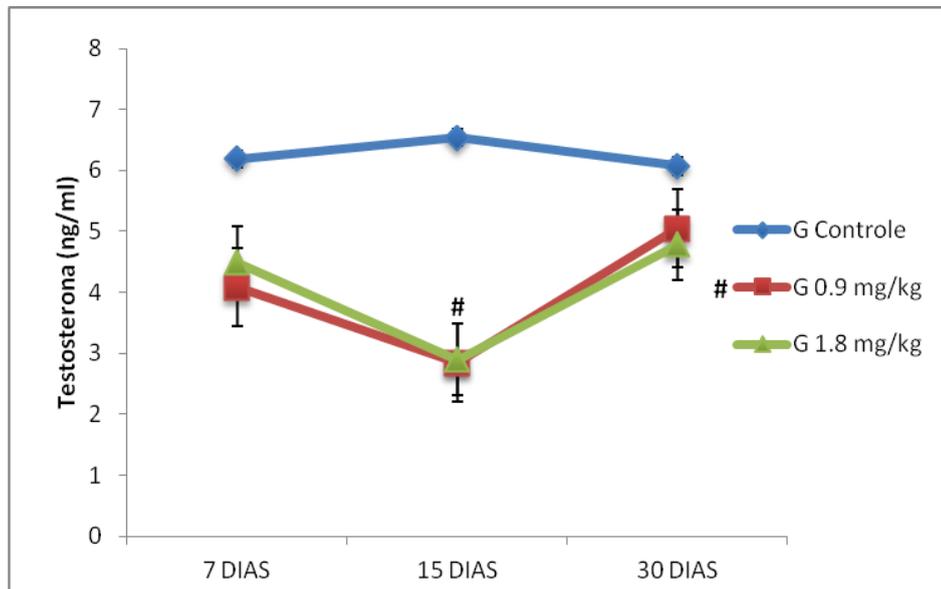


Figura 5. Dosagem de testosterona plasmática de ratos Wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil, e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico. Análise de Significância com # $p < 0,005$.

Tabela 4. Dosagem de testosterona plasmática (ng/ml) de ratos wistar tratados e não tratados com diferentes doses de tadalafil, pós- estresse térmico testicular e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse (Média \pm desvio padrão).

	Animais (n)	Controle HS (G1)	HS + Tadalafil (0.9 mg/kg) (G2)	HS+ Tadalafil (1.8 mg/kg) (G3)	<i>p</i>
7	6	6,19 \pm 2,71	4,08 \pm 1,60	4,49 \pm 2,99	0,332
15	6	6,54 \pm 2,22a	2,84 \pm 0,99b	2,90 \pm 1,12b	0,001
30	6	6,07 \pm 2,65	5,05 \pm 1,52	4,78 \pm 2,94	0,636

6.4. ESTRESSE OXIDATIVO DO FÍGADO E BAÇO

Na tabela 5 e figura 6 estão representados os valores oxido nítrico no tecido hepático de ratos Wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular e tratados com diferentes doses de tadalafil.

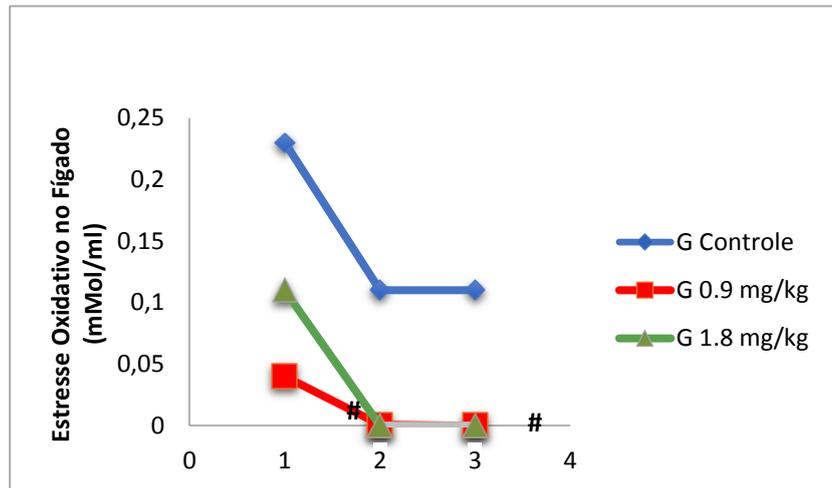


Figura 6A. Dosagem de oxido nítrico em tecido hepático de ratos Wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico, através da reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). # $p < 0,005$

Tabela 5. Dosagem de oxido nítrico no tecido hepático de ratos Wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil e avaliados com 7, 15 e 30 dias pós-estresse térmico, através da reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). (Média \pm desvio padrão). $p < 0,005$

	Animais (n)	Controle HS (G1)	HS + Tadalafil (0.9 mg/kg) (G2)	HS+ Tadalafil (1.8 mg/kg) (G3)	p
7	6	0,23 \pm 0,027	0,04 \pm 0,06	0,11 \pm 0,14	0,311
15	6	0,11 \pm 0,01a	0 \pm 0,00006 b	0,02 \pm 0,03b	0,001
30	6	0,11 \pm 0,13 a	0,00 \pm 0,00094	0 \pm 0 b	0,004

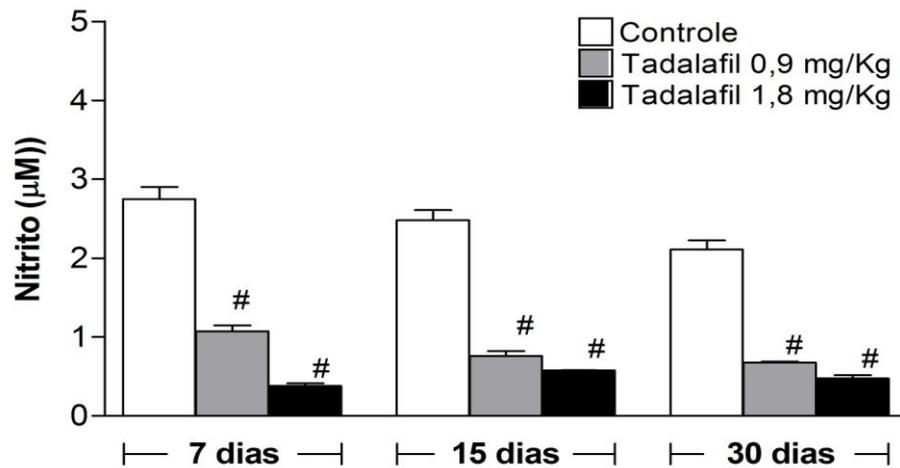


Figura 6B. Análise do óxido nítrico de células do baço de ratos Wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil por 7, 15 e 30 dias. # $p < 0,005$

6.5. ANÁLISES DAS CÉLULAS DO BAÇO: CITOCINAS

De acordo com os resultados da figura 7, foram analisados os níveis de TNF- α , IL-6 e Óxido Nítrico. De acordo com os resultados da **figura 7a**, os níveis de TNF- α nos grupos tratados com 0,9 e 1,8 mg/Kg de tadalafil foi significativamente inferior em todos os tempos estudados em relação aos animais submetidos ao estresse térmico testicular sem tratamento.

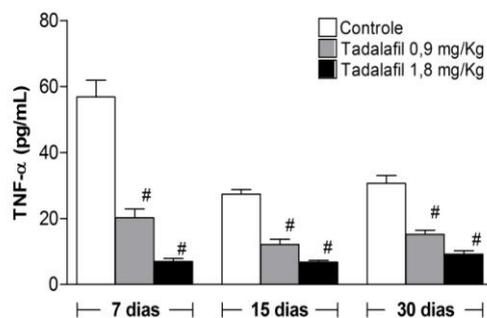


Figura 7a. Análise das citocinas tnf- α de células do baço de ratos Wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil por 7, 15 e 30 dias. # $p < 0,005$

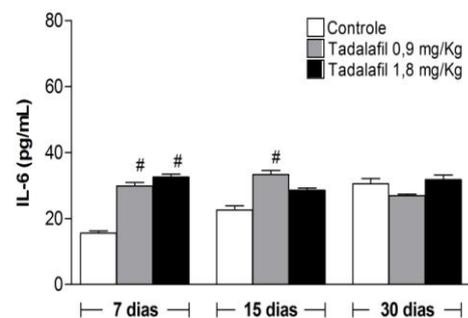


Figura 7b. Análise das citocinas IL-6 de células do baço de ratos Wistar controle e submetidos a estresse térmico testicular, tratados ou não com diferentes doses de tadalafil por 7, 15 e 30 dias. # $p < 0,005$

7. DISCUSÃO

De acordo com a Tabela 2, podemos observar que não ocorreu variação significativa entre os diferentes grupos experimentais com relação ao peso corporal. Todavia, é importante ressaltar que Colombo e Giovani, 2014 descrevem o efeito dilatador do Tadalafil, provocando aumento dos níveis e gastos metabólicos, corroborando com essa manutenção ou redução de peso corporal. (COLOMBO E GIOVANI, 2014).

De acordo com Jim et al (2016), camundongos deficientes de PED-5 tiveram um decréscimo de 30 a 40% no peso corporal entre a 1ª e 2ª semanas após o nascimento. A taxa de crescimento retornou ao normal após duas semanas, contudo, o peso dos camundongos adultos continuou abaixo do normal, apesar dos efeitos reparador do Tadalafil a inibição da PDE's pode reduzir o peso corporal

Como podemos observar na Tabela 3, não houve diferença no peso testicular nos diferentes tempos experimentais. A exposição aguda ou crônica do testículo ao calor promove alteração em sua massa, perímetro escrotal e a motilidade espermática. (Queiroz et al., 2013).

As lesões testiculares observadas neste experimento para os 7 e 15 primeiros dias pós- choque térmico estão de acordo com as observadas por John et al. 2001 e Queiroz et al, 2013. Segundo os autores citados anteriormente, em camundongos ou ratos adultos, o choque térmico testicular desencadeou a formação de vacúolos intratubulares, presença de células gigantes sinciciais de espermátocitos I, células germinativas e núcleos picnóticos e alguns núcleos apareceram com fragmentos apoptóticos.

Em lesão similar, utilizando a pentoxifilina para o tratamento das injúrias por choque térmico testicular, Queiroz et al (2013) relatou efeito reparador da droga inibidora de PDE não específica, baseada em análises morfológicas e morfométricas, diminuição da presença de células em necrose nos animais tratados, corroborando com os achados encontrados neste estudo.

Queiroz, 2013, com injúria térmica semelhante em ratos da mesma espécie, apresentou lesões profundas no parênquima testicular 30 dias pós estresse, no entanto aos 60 dias os animais já apresentavam reparo das células em todos os grupos.

Na tabela 4 (figura 5), no que se refere a análise do testosterona plasmática foi observado, no décimo quinto dia pós-estresse térmico, redução siginificativa na dosagem de testosterona plasmática, após este período os animais tratados com tadalafil voltaram a apresentar ganho em relação a este hormônio.

O tratamento da infertilidade masculina com terapia antioxidante é bastante promissor, mas deve ser utilizado com moderação, uma vez que as substâncias antioxidantes inibem a formação do ON e comprometem as suas funções fisiológicas (CARVALHO et al, 2017). O tadalafil demonstrou efeito antioxidante nas duas análises realizadas, sendo significativo no décimo quinto e trigésimo dia, mais análises sobre a dose e efeito são necessárias para esta, possível via farmacológica.

Em experimentos com camundongos, tratados por 4 semanas com 25mg/Kg de citrato de sildenafil, doses bem superiores do que as utilizadas em nosso experimento, os níveis de testosterona foram aumentados em decorrência do aumento mitocondrial da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol-P450 (SARAIVA, et al. 2009). A testosterona estimula a geração de superóxido e NO, para produzir peroxinitrito, que tem efeitos vasodilatadores diretos. Além disso, a influência do vasodilatador da testosterona é inibida pelo peroxinitrito, indicando que o último pode desempenhar um papel importante nos efeitos vasculares da testosterona. (PUTTABYATAPPA, et al. 2013). Nossos resultados apontam para diminuição do NO interligado a redução da testosterona.

Grupos tratados com diferentes doses de tadalafil durante 15 e 30 dias pós-estresse térmico, as reduções nos níveis de óxido nítrico foram extremamente significativas nas células hepáticas (tabela 5 e figura 6). Embora seja um radical derivado de oxigênio livre, o NO regula a gravidade do processo inflamatório, como diminuição da infiltração de leucócitos e citocinas inflamatórias, sua redução se torna importante para o reparo tecidual. (PHILLIPS L, et al., 2009). A produção ROS, repostas inflamatórias e peroxidação lipídica são importantes etapas no estabelecimento das injúrias testiculares. (ZIMMERMAN BJ, 1999; CUZZOCREA S, et al. 2001). Nossos resultados apontam para influência do tadalafil, administrado em baixas doses, na diminuição da testosterona plasmática, com seu uso prolongado.

Em modelos (Isquemia/ reperfusão) a utilização de inibidores da fosfodiesterase 5 parecem reduzir os níveis de óxido nítrico tecidual e conseqüentemente os danos teciduais decorrentes da formação de radicais livres, corroborando com nossos achados. No modelo de estresse térmico testicular, a utilização das doses de 0,9 e 1,8 mg/Kg de tadalafil via intraperitoneal proporcionou resultados similares aos observados no modelo de I/R testicular por BEHESHTIAN et al, (2008), no que diz respeito a redução nos níveis de ON tecidual.

Os inibidores de PDE5 foram desenvolvidos para o tratamento da disfunção erétil, mas estas moléculas podem ser usadas em outras doenças, como hiperplasia prostática benigna e hipertensão

(GALIÈ et al., 2005; GALIÈ et al., 2009). O efeito dos inibidores da PDE5 no óxido nítrico pós torção testicular é conflitante na literatura. Tadalafíl apresenta ainda efeito antioxidante em modelos de isquemia de ovários de ratas e injúrias em cérebros murinos (Arikan et al., 2010; Altaş et al., 2014) e sua ação reduz significativamente a produção de TNF- α em rins de ratos submetidos à experimento de isquemia renal (El-Sisi et al., 2016)

Beheshtian et al (2008) demonstraram efeitos benéficos da administração de sildenafil, modelo de rato I/R (isquemia/reperfusão) tais como: níveis aumentados de enzimas antioxidantes, diminuição dos níveis de peroxidação lipídica e apoptose das células germinativas. De acordo com a figura 7a, os níveis de TNF- α nos grupos tratados com 0,9 e 1,8 mg/Kg de tadalafíl foi inferior em todos os tempos estudados em relação aos animais submetidos ao estresse térmico testicular sem tratamento.

O TNF- α é uma potente citocina próinflamatória que, em determinadas doenças renais, induz, fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas e estimula a formação de radicais de óxido nítrico (Radeke et al., 1990; Baud e Ardaillou, 1995), mesmo após injúria térmica, promove aumento processo inflamatório o TNF- α se comportou com redução dos seus níveis, em todos os grupos analisados, a diminuição desta Citocina acompanhou a redução de testosterona ao longo do experimento.

Os valores de IL-6 aumentaram significativamente nos animais submetidos ao estresse térmico e tratados com 0,9 e 1,8 mg/Kg de tadalafíl nos 7 primeiros dias. Nos 15 primeiros dias pós-estresse térmico, os níveis de IL-6 ainda estavam superiores ao controle. Com 30 dias pós-estresse térmico não se constatou diferença nos níveis de IL-6 entre os grupos.

IL-6 é uma citocina envolvida no processo inflamatório e na estimulação da cicatrização de lesões (Liechty et al., 2000). Alguns estudos têm apontado que camundongos deficientes de IL-6 têm seu processo cicatricial prejudicado (Zi-Qing et al., 2003) e que a presença de IL-6 aumenta o percentual de cicatrização de modelos de feridas de córnea *in vitro* (Arranz-Valsero et al., 2014). Entretanto, o acúmulo exacerbado de IL-6 pode prejudicar o processo inflamatório pelo recrutamento excessivo que esta citocina promove em leucócitos polimorfonucleares e pode formar cicatrizes extensas *in vivo* (Kim et al., 2014; Liechty et al., 2000). No entanto, os níveis testiculares de IL-6 são aumentados na condição de lesão e inflamação (LI R, 2009; Zhang H et al, 2014)

Elevação dos níveis de IL-6 nos animais tratados com tadalafil pós-estresse térmico aos 7 e 15 dias fazem correlação aos dados histopatológicos para este período demonstram que o inibidor de fosfodiesterase-5, tadalafil, retardou as lesões testiculares decorrentes do estresse térmico testicular (figura 2).

De maneira geral, a redução dos níveis de nitritos tanto hepático, quanto esplênico é compatível com a redução das lesões testiculares observadas nos animais submetidos ao estresse térmico e tratados com diferentes doses de tadalafil, nos 15 primeiros dias pós lesão (figura 2). Desta forma é bastante provável que o tadalafil tenha atuado na redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) derivados do óxido nítrico, provavelmente pelo bloqueio da óxido nítrico síntase. (APRIOKU JS, 2013).

A administração intraperitoneal de tadalafil em ratos Wistar submetidos a estresse térmico produziu redução nos níveis de nitrito nas duas doses utilizadas durante o período experimental. A NOS (óxido nítrico sintase) catalisa a transformação em L-arginina em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adeninad nucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e Ca²⁺ sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO (HILL, et al., 2010). O NO é um radical livre e é quimicamente mais estável e menos reativa do que outras ROS, como superóxido ou peróxido de hidrogênio (JUAN G. REYES, 2012). Além disso, o NO na presença de ROS pode formar o peroxinitrito, oxidante altamente reativo (CALCERRADA, 2011). Níveis elevados de ROS afetam negativamente a produção e motilidade, viabilidade e função do espermatozoide, interagindo com lipídios da membrana, proteínas, DNA nuclear e mitocondrial (MORTE et al, 2008; Yeni et al, 2010)

Em testículos de macaco, a síntese de óxido nítrico endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS) após o estresse por calor, aumentou os níveis de iNOS em comparação com os controles, mostrando um aumento consistente na expressão do iNOS nas células germinativas (J. GUO et al, 2009). Desta maneira, o estresse térmico parece induzir a produção de NO e pode contribuir para o dano oxidativo em células germinativas. (JUAN G. REYES, 2012; APRIOKU JS, 2013). Demonstrando assim que o tadalafil foi agente provocador da diminuição do NO pós-lesão por calor e apresenta função preventiva de lesão com uso contínuo em baixas doses por até 15 dias.

8. CONCLUSÃO

1. O tadalafil não alterou o peso corporal ou peso testicular dos animais tratados em relação ao grupo controle.
2. O Inibidor de fosfodiesterase-5, promoveu redução nos níveis de testosterona plasmático em todos os dias avaliados, no 15º dia pós-estresse térmico esta redução foi significativa.
3. O tadalafil, em doses baixas, possui atividade inibidora na formação de NO hepático e Esplênico.
4. Tadalafil em doses baixas exerceu efeito anti-inflamatório por reduzir os níveis de TNF- α no parênquima esplênico durante o período experimental.
5. Os níveis de IL-6 no parênquima esplênico e hepático foram aumentados, conhecidem com a testosterona, ambos apresentaram seu momento de maior diferença em relação ao grupo controle no décimo quinto dia.
6. O Tadalafil influenciou na diminuição de lesões provocadas pelo estresse térmico no até o 15º dia pós-estresse no parênquima testicular de ratos, evidenciadas sobre análise histopatológica.
7. O tadalafil em baixas doses promoveu retardo nas lesões pós estresse térmico, até o 15º dia, ao 30º as lesões foram agravadas, ao mesmo tempo que IL-6 também apresentou aumento, sendo esta citocina inflamatória e prejudicial quando está em níveis muito elevados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anatomical Records**, v.94, p.238-248, 1946.
- AMANN, R.P., ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal Dairy Science**, v.45, p.774-781, 1962.
- AMORIM, M.J.A.L.; AMORIM JÚNIOR, A.A. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reprod.Nutr. Dev.** v. 45, p.1-10, 2006.
- APRIOKU JS. Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. **Journal of Reproduction & Infertility**. 2013;14(4):158-172.
- ARRANZ-VALSERO I, SORIANO-ROMANÍ L, GARCÍA-POSADAS L, LÓPEZ-GARCÍA A, DIEBOLD. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay. **Exp Eye Res**. 2014 Aug;125:183-92.
- ATTAL, J.,COURROT, M. Developpement testiculaire et etablisement de la spermatogeneses chez le taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys**, v.3, p.219-241, 1963.
- B. G. HILL, B. P. DRANKA, S. M. BAILEY, J. R. LANCASTER, AND V. M. DARLEY-USMAR, “What part of NO don’t you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 26, pp. 19699–19704, 2010.
- BAHRA PS, RAINGER GE, WAUTIER JL, NASH GB. Effects of pentoxifylline on the different steps during adhesion and transendothelial migration of flowing neutrophils. **Cell Biochem Funct.**; 19(4):249-57, Dec, 2001.
- BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalites in bulls. **Rev. Bras. Repr. Anim.**, 1(4):1-11, 1993.
- BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol Rev**, v.75, p.725-748, 1995.
- BEHESHTIAN A, SALMASI AH, PAYABVASH S, et al. Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. **World J Urol** 2008;26:197-202. <https://doi.org/10.1007/s00345-008-0243-6>
- BEHESHTIAN A, SALMASI AH, PAYABVASH S, KIUMEHR S, GHAZINEZAMI B, RAHIMPOUR S, et al. Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. **World J Urol**. 2008;26:197–202. [[PubMed](#)]
- BERNDTSON, W.E., IGBOELI, G., PARKER, W.G. 1987. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, 37: 60-74
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. Antioxidant and Radical Scavenging Properties of 8-oxo Derivatives of Xantine Drugs Pentoxifyline and Lysofilyline. **Biochemical and**

Biophysical Research Communications 288, 1212-1217 (2001).

BIGGIOGERA, M.; TANGUAY, R. M.; MARIM, R.; WU, Y.; T.E. & FAKAN, S. Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopic study. **Exp. Cell. Res.** 229, 77-85. (1996).

BILLING, H., FURRUTA, I., RIVIER, C. *et al.* Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stage. **Endocrinology**,; 136: 5-12. 1995.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; BRETZLAFF, K.N.; ELMORE, R.G. The causes and pathologic changes of testicular degeneration in large animals. **Vet. Med.**,86:531-6, 1992.

BROWN, J.; WALKER, S. E STEINMAIN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. **Conservation and Research Center**, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA, 2004. 93 p.

BRUEY, J.M., PAUL, C., FROMENTIN, A., HILPERT, S., ARRIGO, A.-P., SOLARY, E. & GARRIDO, C. Differential regulation of HSP 27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vitro. **Oncogene**, v. 19, p. 4855-4863, 2000a.

CALOGERO, A.E.; FISHEL, S.; HALL, J.; FERRARA, E. Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hiperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. **Hum. Reprod.**, v. 13, n. 4, p. 911-915, 1998.

CAO W, HUANG P, ZHANG L, WU HZ, ZHANG J, SHI FX. Acute heat stress increases HSP70 expression in the testis, epididymis and vas deferens of adult male mice. **Zhonghua Nan Ke Xue.** (3):200-6, 15,Mar;2009.

CARNEIRO, S.C.S. Ação da pentoxifilina nos dendrócitos dérmicos FXIIIa de placas de psoríase. **An. bras. dermatol.**, v.80 (Supl. 3), p.314-322, 2005.

CARVALHO ONOFRE FERREIRA DE, FERREIRA JOÃO DANILO DE JESUS, SILVEIRA NUSA DE ALMEIDA, FRENEAU GUSTAVO EDUARDO. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 2017 Jan [cited 2017 Oct 23] ; 38(1) : 33-38.

CHANDRA AK, CHATTERJEE A, GHOSH R, SARKAR M. Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. **Food Chem Toxicol.** 2010 Mar;48(3):972-9. Epub 2010 Jan 16.

CHEMINEAU P. Meio ambiente e reprodução animal 29/06/2004. **Org. FAO.** <http://www.fao.org/ag/Aga/AGAP/WAR/warall/v11650b/v1650b04.htm>

CHEN, M.; YANG, Z.; WU, R; NADLER, J. L. Lisofyline, a Novel Antiinflammatory agent, Protects Pancreatic β -Cells from Proinflammatory Cytokine Damage by Promoting Mitochondrial Metabolism. **Endocrinology** 143(6); 2341-2348, 2002.

CHENG C. Y. & MRUK D. D. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. **Nat Rev Endocrinol** 6, 380–395 (2010). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

- CHENG C. Y. & MRUK D. D. An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 44, 245–263 (2009). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
- CIMAROSTI, H., NETTO, C. A. & SALBEGO, C. G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p. 379-386, 2003.
- CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n.9, p.1317-1327, 2000.
- CONTI, M.; NEMOZ, G.; SETTE, C.;VICINI, E. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **The Endoc. Soc.**, v. 16, n. 3, p. 370-389, 1995.
- COULTER, G.H., FOOTE, R.H.. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. **Theriogenology.**, 11: 297-310, 1979.
- CUZZOCREA S, Riley DP, Caputi AP, et al. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol Rev.** 2001;53:135–59
- D.C. ARIKAN, V. BAKAN, E.B. KURUTAS, H. SAYAR, A. COSKUN, Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary, **J. Pediatr. Surg.** 45 (2010) 2203–2209.
- DAIANE DONIN, S., ROGÉRIO HEINEMANN., NEI MOREIRA. Estresse térmico e suas consequências sobre as características do sêmen de machos suínos. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.4, p.456-461, out./dez. 2007
- DING, A. H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology, Baltimore**, v.141, p. 2407-2412, 1988.
- DOKMECI, D., Testicular torsion, oxidative stress and the role of antioxidant therapy. **Folia Med (Plovdiv)**. 2006; 48(3-4):16-21.
- DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monotsh. Ver. Med.**, v.29, p. 650-652, 1974.
- DORSTYN L, KINOSHITA M, KUMAR S.. Caspases in cell death. In:Results and Problems in Cell Differentiation: Apoptosis Mechanismsand Role in Disease, ed Kumar S. **Springer- Verlag**, New York, 1–23, 1998.
- DU TOIT EF, ROSSOUW E, SALIE R, OPIE LH, LOCHNER A. Effect of sildenafil on reperfusion function, infarct size, and cyclic nucleotide levels in the isolated rat heart model. **Cardiovasc Drugs Ther.** 2005;19:23–31. 10.1007/s10557-005-6894-2 [[PubMed](#)]
- EARNSHAW WC, MARTINS LM, KAUFMANN SH. Mammalian caspases:structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.**Ann Rev Biochem** 68: 383–424, 1999.

- EL-SISI AE, SOKAR SS, ABU-RISHA SE, IBRAHIM HÁ. Combination of tadalafil and diltiazem attenuates renal ischemia reperfusion-induced acute renal failure in rats. **Biomed Pharmacother.** 2016 Dec;84:861-869.
- Erol B, Tokgoz H, Hanci V, Bektas S, Akduman B, Yencilek F, et al. Vardenafil reduces testicular damage following ischemia/reperfusion injury in rats. **Kaohsiung J Med Sci.** 2009;25:374–380. 10.1016/S1607-551X(09)70530-3 [[PubMed](#)]
- EVENSON DP, JOST LK, MARSHALL D, ZINAMAN MJ, CLEGG E, PURVIS K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum Reprod**;14:1039 – 49, 1999.
- FONSECA, V.O.; CHOW, L.A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 47(5):707-16, 1995.
- FOOTE RH Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. **J Anim Sci**, v.47, suppl.2, p.1-11, 1978.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. **tese, doutorado.** Belo Horizonte: UFMG, ICB, 1991, 180p.
- GRAY'S ANATOMY: The Anatomical Basis of Medicine and Surgery, 45th edition (2010), 1600 pages, **Churchill-Livingstone**, [ISBN 0-443-07168-3](#) — the U.K version.
- G.E. **Marshall's physiology of reproduction.** 1ed., Londres: Churchill Livingstone, 4ed. v.2, 1990. p. 1-105.
- GABALDI, S.H. *Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal.* Botucatu, 2000, 85p. **Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária**, FMVZ - Universidade Estadual Paulista. Botucatu.. 85p, 2000.
- GALIÈ N, GHOFRANI HA, TORBICKI A, BARST RJ, RUBIN LJ, BADESCH D, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. **N Engl J Med.** 2005;353:2148–57. doi: 10.1056/NEJMoa050010. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
- GALIÈ N, BRUNDAGE BH, GHOFRANI HA, OUDIZ RJ, SIMONNEAU G, SAFDAR Z, et al. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. **Circulation.** 2009;119:2894–903. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.839274. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
- GARRIDO, C., GURBUXANI, S., RAVAGNAN, L. & KROEMER G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 286, p. 433-442, 2001.
- GOMES, W.R.; BUTTER, W.R.; JOHNSON, A.D. Effects of elevated ambient temperature on testis and blood levels and in vitro biosynthesis of testosterone in the ram. **Journal of Animal Science** 33 804-807 (1971).
- GUMIŃSKA A, SLOWIKOWSKA-HILCZER J, KUZAŃSKI W, SOSNOWSKI M, OSZUKOWSKA E, MARCHLEWSKA K, WALCZAK-JEDRZEJOWSKA R, NIEDZIELSKI K, KULA K. Features of impaired seminiferous tubule differentiation are associated with germ cell neoplasia in adult men surgically treated in childhood because of

cryptorchidism. **Folia Histochem Cytobiol.**;45 Suppl 1:S163-8, 2007.

H.H. RADEKE, B. MEIER, N. TOPLEY, J. FLOGE, G.G. HABERMEHL, K. Resch, Interleukin- 1 and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells, *Kidney. Int.* **37** (1990) 767–775.

HADLEY, A.J.; KUMARI, M.; COVER, P.O.; OSBORNE, J.; POYSER, R.; FLACK, J.D.; BUCKINGHAM, J.C. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat by the type 4 phosphodiesterase (PDE-4) inhibitor, denbufylline. **Br. J. Pharmacol.**, v.119, p. 463- 470, 1996.

HANSEN DG. Manejo del verraco destinado a la inseminación artificial: factores que afectan la fertilidad. In: Seminário Internacional de Suinocultura, 4, 1999, São Paulo, SP. Anais... Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, p.77, 1999.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M-T., LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal Reproduction and Fertility**, v.54, p.209-213, 1978.

HUANG SY., KUO YH., LEE YP., TSOU HL., LIN EC., JU CC., LEE WC. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boar. **Anim Reprod Sci**, v.63, p.231-240, 2000.

IKO, K.; TANEMURA, K.; GOTOH, H.; KUROHMARU, M.; HAYASHI, Y. Apoptosis-Like Cell Death in Experimentally-Induced Cryptorchidism in Adult Mice. **J. Vet. Med. Sci.** 59 (5): 353-359, 1997.

ISHIKAWA T, KONDO Y, GODA K, FUJISAWA M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice accelerates testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. **J Androl.** 2005;26(2):281–8. [[PubMed](#)]

ITOH, H. & TASHIMA, Y. A novel testis-specific 105-kDa protein related to the 90-kDa heat-shock protein. **Eur. J. Biochem.** **193**, p. 429–435, 1990.

ITOH, H. & TASHIMA, Y. Different expression time of the 105-kDa protein and 90-kDa heat-shock protein in rat testis. **FEBS Lett.** **289**, p. 110–112, 1991;

J, KULA K. Features of impaired seminiferous tubule differentiation are associated with germ cell neoplasia in adult men surgically treated in childhood because of cryptorchidism. **Folia Histochem Cytobiol.**;45 Suppl 1:S163-8, 2007.

J. Guo, Y. Jia, S. X. Tao et al., “Expression of nitric oxide synthase during germ cell apoptosis in testis of cynomolgus monkey after testosterone and heat treatment”. **Journal of Andrology**, vol. 30, no. 2, pp. 190–199, 2009.

JAINUDEEN MR, HAFEZ ESE. Distúrbios reprodutivos nos machos. In: **Hafez, ESE. Reprodução animal.** 6.ed. São Paulo: Editora Manole, p. 291-301, 1995.

JANNES P, SPIESSENS C, VAN DER AUWERA I, D’HOOGHE T, VERHOEVEN G, VANDERSCHUEREN D. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. **Hum Reprod.**; 13: 372–5, 1998.

JEFFREY J LYSIAK, et al The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the

- mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis (**Reprod Biol Endocrinol.** 2004; 2: 9. Published online 2004 Mar 10. doi: 10.1186/1477-7827-2-9 PMID: PMC404472.
- JI Q, JIA H, HAIBIN D, WEIYAN LI, LIDONG ZHANG. Protective effects of pentoxifylline on the brain following remote burn injury. **Burns.** Jun 21. [Epub ahead of print], 2010.
- JI Q, ZHANG L, JIA H, XU J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. **Ann Clin Lab Sci** 2004 **Autumn**;34: 427e36.
- JOLLY, C. & MORIMOTO, R. I. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. **J. National Cancer Institute**, v.92, p. 1564-1572, 2000.
- JUAN G. REYES, JORGE G. FARIAS, SEBASTIÁN HENRÍQUEZ-OLAVARRIETA, EVA MADRID, MARIO PARRAGA, ANDREA B. ZEPEDA AND RICARDO D. MORENO. The Hypoxic Testicle: Physiology and Pathophysiology 2012: 929285. **Published online** 2012 Sep 27. doi: 10.1155/2012/929285.
- KASTELIC, J.P.; COULTER, G.H. Scrotal and testicular thermoregulation in the bull and ram. Soc. for Theriogenology – **Proc. Annual Meeting, Florida**, p.67-72, 1995.
- KATO, H., KOGURE, K., LIU, X.H., ARAKI, T., KATO, K. e ITOYAMA, Y. Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Res.**, v. 679, p. 1-7, 1995.
- KHAN VR, BROWN IR. The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, and thymus of the adult and developing rat Cell Stress Chaperones. **Reproduction.** Jan;7(1):73-90, 2002.
- KIM MH, GOROUHI F, RAMIREZ S, GRANICK JL, BYRNE BA, SOULIKA AM, SIMON SI, ISSEROFF RR. Catecholamine stress alters neutrophil trafficking and impairs wound healing by β 2-adrenergic receptor-mediated upregulation of IL-6. **J Invest Dermatol.** 2014 Mar;134(3):809-17.
- KIMURA, M.; TATEISHI, N.; SHIOTA, T.; YOSHIE, F.; YAMAUCHI, H.; SUZUKI, M.; SHIBASAKI, T. Long-term exercise down-regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. **Neuroreport.** 2004 Mar 22;15(4):713-6.
- KIMURA, M.; SHIOTA, T.; Long-term exercise down-regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. **Neuroreport.** 22;15(4):713-6. Mar, 1996.
- KIMURA, H., NAKAMURA, T., OGAWA, T., TANAKA, S., SHIOTA, K. Transcription of mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) is regulated by both E2F-Rb-HDAC-dependent and independent pathways. **Nucleic Acids Res.** 31: 3101-3113, 2003.
- KOLETTIS TM, KONTARAS K, SPARTINOS I, MANIOTIS C, VARNAVAS V, KOUTOUZIS M, et al. Dose-dependent effects of sildenafil on post-ischaemic left ventricular function in the rat isolated heart. **J Pharm Pharmacol.** 2010;62:346–51. [[PubMed](#)]

KRAEMER, T. The influence of high ambient temperature on different parameters of semen, biochemical and endocrine parameters in bulls in a climatic chamber and in subtropical climate. **Berlin: FU Berlin**,. <<http://www.diss.fuberlin.de/2000/83/index.html>, 2000.

KUMAGAI, A.; KODMA, H.; KUMAGAI, J. et al. Xanthine oxidase inhibitors uppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol. Hum. Reprod.* n. 8, p. 118-123, 2002; John C. Rockett, Faye L. Mapp, Brian Garges, J. Christopher Luft, Chisato Mori, and David J. Dix. Effects of Hyperthermia on Spermatogenesis, **Apoptosis**, Genes Expression and Fertility in Adult Male Mice. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 65, 229 – 239, 2001.

KUMAGAI, A.; KODMA, H.; KUMAGAI, J. et al. Xanthine oxidase inhibitors uppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. **Mol. Hum. Reprod.** n. 8, p. 118-123, 2002;

JOHN C. ROCKETT, FAYE L. MAPP, BRIAN GARGES, J. CHRISTOPHER LUFT, CHISATO MORI, AND DAVID J. DIX. Effects of Hyperthermia on Spermatogenesis, Apoptosis, Genes Expression and Fertility in Adult Male Mice. **Biology of reproduction** 65, 229 – 239, 2001.

KUMAGAI A, KODAMA H, KUMAGAI J, FUKUDA J, KAWAMURA K, TANIKAWA H, SATO N, TANAKA T. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. **Mol Hum Reprod.**;8(2):118-23, Feb, 2002.

KUMARI, M.; COVER, P.O.; POYSER, R.H.; BUCKINGHAM, J.C. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat by three selective type-4 phosphodiesterase inhibitors: *in vitro* and *in vivo* studies. *Br. J. Pharmacol.*, v. 121, p.459-464, 1997.

L. BAUD, R. ARDAILLOU, Tumor necrosis factor in renal injury, *Miner. Electrol. Metab.* 21 (1995) 336–341.

Li R. *et al.* Expression of IL-1alpha, IL-6, TGF-beta, FasL and ZNF265 during sertoli cell infection by ureaplasma urealyticum. **Cell Mol Immunol** 6, 215–221, 10.1038/cmi.2009.29 (2009)

LIECHTY, KENNETH W., N. SCOTT ADZICK, TIMOTHY M. CROMBLEHOLME. DIMINISHED INTERLEUKIN 6 (IL-6) PRODUCTION DURING SCARLESS HUMAN FETAL WOUND REPAIR. **Cytokine**, Vol. 12, No. 6 (June), 2000: pp 671–676.

LUE, Y.H.; HIKIM, A.P.S.; RONALD, S.; SWERDLOFF, P.I.M.; TAING, K.S.; BUI, T.; LEUNG, A.; WANG, C. Single Exposure to Heat Induces Stage-Specific Germ Cell Apoptosis in Rats: Role of Intratesticular Testosterone on Stage Specificity. **Endocrinology**, 140. p1709-1717, 1999

M. ALTAŞ, M. ARAS, S. MEYDAN, E. NACAR, K.T. ULUTAŞ, Y. SERARSLAN, N. YILMAZ, Effects of tadalafil on ischemia/reperfusion injury in rat brain, **Acta Neurol. Belg.** 114 (2014) 33–40.

MALUSECKA E, NAKAI A, KRAWCZYK Z. *Acta Biochim* Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium. **Pol.**; 50(2):535-41, 2003.

MARTINS, R.D.; McMANUS, C.; *et al.* Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. **Rev. Brás. Zootc.**, v. 32, n. 6, suppl. 1 Viçosa, 2003.

MAXWELL, D. T.; JACOBSON, J. D.; KING, A.; CHAN, P. J. Effect of Pentoxifylline on Tumor Suppressor and Proto-Oncogene Apoptosis in Sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, vol. 19, No. 6, June 2002

McENTEE, K. Reproduction pathology of domestic mammals. 1ed., **California: Academic Press**, 1990. p.224-70

MEHLEN, P., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ARRIGO, A. P. Small Stress Proteins as Novel Regulators Of Apoptosis Heat Shock Protein 27 Blocks Fas/Apo-1- And Staurosporine-Induced Cell Death. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 16510-16514,1996.

MEHLEN, P., MEHLEN, A., GODET, J. & ARRIGO, A.-P. Hsp27 as a Switch between Differentiation and Apoptosis in Murine Embryonic Stem Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 31657-31665, 1997.

MEHLEN, P., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ARRIGO, A. P. Small Stress Proteins as Novel Regulators Of Apoptosis Heat Shock Protein 27 Blocks Fas/Apo-1- And Staurosporine-Induced Cell Death. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 16510-16514,

MEISTRICH, M.L.; ENG, V.W.S.; LOIR, M. Temperature effects on the kinetics of spermatogenesis in the mouse cell and Tissue Kinetics. **Spermatogen** 6379-393 (1973).

MEISTRICH, R.; BUJAN, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. **International Journal of Andrology** 18 169-184 (1995).

MIES FILHO A. Fisiologia do aparelho genital masculino: função espermatogênica e função endócrina do testículo. In: Mies Filho, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 3.ed. Porto Alegre: **Sulina**, p.99-133, 1975.

MIEUSSET, R., BUJAN, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. **Int J. Androl.** 1995; 18: 169-184.

MISRO MM, CHAKI SP, GAUTAM DK. Germ cell death and their removal during initial stages of testicular ischemia and cryptorchidism: a comparative analysis. **Indian J Exp Biol.** 2005;43(11):1080–7. [[PubMed](#)]

MONTELLA A, PIRINO A. [Morphological findings in cryptorchism in the adult male]. **Boll Soc Ital Biol Sper.**;66(3):215-22, Mar, 1990.

MORALES E, HORN R, PASTOR LM, SANTAMARÍA L, PALLARÉS J, ZUASTI A, FERRER C, CANTERAS M. Involution of seminiferous tubules in aged hamsters: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative morphological study. **Histol Histopathol.**;19 (2):445-55 Apr, 2004.

MOREIRA, P.E.; MOURA, A..A.A.; ARAÚJO, A.A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês Criados no estado do Ceará. **Rev. Bras..Zootc.** vol. 30, n. 6, Viçosa, 2001.

- MORTE MI, RODRIGUES AM, SOARES D, RODRIGUES AS, GAMBOA S, RAMALHO-SANTOS J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Anim Reprod Sci.** 2008;106(1-2):36–47. [[PubMed](#)]
- MOURA, A., E ERICKSON, B.H. 1997. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationship with testis size and number of Sertoli and germ cells in beef bulls. **J. Reprod. Fert.** 111: 183-190.
- MULLER, E., RODRÍGUEZ, H.M., BRADEN, S. *et al.*,. *Australia*, Bull. N°148, 1992. MURPHY BD, LALLI E, WALSH LP, LIU Z, SOH J, STOCCO DM, SASSONE-CORSIP. Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. **Mol Endocrinol.**;15 (8):1255-63, Aug, 2001.
- NAKAI, A., SUZUKI, M., TANABE, M. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. **EMBO J.** 2000; 19: 1545-1554.
- NASSAR, A.; MAHONY, M.; BLACKMORE, P.; MORSHED, M. Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline-induced hyperactivated motility or acrossome reaction in human sperm **Fertil. Steril.**, v. 69, n. 4, p. 748-754, 1998.
- NETTER, Frank H.. **Atlas de Anatomia Humana**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- OCHIAI, H.; ISHIDA, A.; OHTANI, T.; KUSUMI, K. Discovery of new orally active phosphodiesterase(PDE4) inhibitors. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, n. 9, p. 1098-1104, 2004.
- OCKAILI R, SALLOUM F, HAWKINS J, KUKREJA RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial KATP channels in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:1263–9. [[PubMed](#)]
- OSINOWO, O. A., MARRIE, B.N., EKPE, G. A. 1992. Preliminary study of postnatal growth and reproductive tract development in Yankasa rams. **Anim. Reprod .Sci.**, 27: 49-54.
- PALASZ. A. T., CATES, W. F., BARTH, A. D. *et al.*, 1994. The relation ship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. **Theriogenology**, 42: 715-729.
- PEREZ C. V. *et al.* Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. **Biol Reprod** 87, 122 (2012). [[PubMed](#)]
- PHILLIPS L, TOLEDO AH, LOPEZ-NEBLINA F, ET AL. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. **J Invest Surg.** 2009;22:46–55. <https://doi.org/10.1080/08941930802709470>. [[PubMed](#)]
- PINART E, SANCHO S, BRIZ M, BONET S. Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. **J Morphol.**; 239(3):225-43, Mar, 1999.
- POIREL O, LETTÉRON P, PESSAYRE D, FROMENTY B. Alcohol increases tumor necrosis factor alpha and decreases nuclear factor-kappab to activate hepatic apoptosis in

genetically obese mice.. **Hepatology**.;42(6):1280-90, Dec, 2005.

POLSON, J.B.; STRADA, S.J. cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 403-427, 1996.

PUTTABYATAPPA Y, Stallone JN, Ergul A, El-Remessy AB, Kumar S, Black S, Johnson M, Owen MP, White RE. Peroxynitrite mediates testosterone-induced vasodilation of microvascular resistance vessels. **J Pharmacol Exp Ther** 345: 7–14, 2013.

QUEIROZ, G. C. D.; TENORIO, B.; TORRES, S. M.; SILVA JUNIOR, V. A. Pentoxifylline: preventive and / or restorative effects of pentoxifylline on the spermatogenesis of adult wistar rats submitted to testicular thermal shock. Official journal of the Brazilian College of Animal Reproduction. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 45-54, 2013.

RADFAR, M.; LARIJANI, B.; HADJIBABAIE, M.; RAJABIPOUR, B. Effects of Pentoxifylline on oxidative stress and levels of EGF and NO in blood of diabetic type – 2 patients; a randomized, double - blind placebo – controlled clinical trial. **Biomedicine e Pharmacotherapy**., v.59, p. 302-306, 2005.

RENKE M, RUTKOWSKI P, TYLICKI L, ZIETKIEWICZ M, LARCZYŃSKI W, RUTKOWSKI B. Pentoxifylline old drug or new hope for nephrology?] **Przegl Lek.**;65(7-8):358-61, 2008.

ROBIN MA, DEMEILLIERS C, SUTTON A, PARADIS V, MAISONNEUVE C, DUBOIS S, POIREL O, LETTÉRON P, PESSAYRE D, FROMENTY B. Alcohol increases tumor necrosis factor alpha and decreases nuclear factor-kappab to activate hepatic apoptosis in genetically obese mice.. **Hepatology**.;42(6):1280-90, Dec, 2005.

ROCHA, D.M.C., DEBELJUK, L., FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult wistar rats. **Tissue & Cell**, v.31, p.372- 379, 1999.

ROCKETT, J.C.; MAPP F. L.; GARGES, B.; LUFT, J. C.; MORI, C.; DIX, D. J. Effects of Hyperthermia on Spermatogenesis, Apoptosis, Genes Expression and Fertility in Adult Male Mice. **Biology of Reproduction**, 65. 229 – 239, 2001.

RODNIGHT, R., NETTO, C. A. & SALBEGO, C.G. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunocontent and phosphorylation in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 107, p. 43-49, 2001.

RODRIGUEZ MG, RIVAL C, THEAS MS, LUSTIG L. Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord. **Asian J Androl**. 2006;8(5):576–83. [[PubMed](#)]

ROMEO C, IENTILE R, IMPELLIZZERI P, TURIACO N, TELETTA M, ANTONUCCIO P, et al. Preliminary report on nitric oxide-mediated oxidative damage in adolescent varicocele. **Hum Reprod**. 2003;18(1):26–9. [[PubMed](#)]

RUPASRI, A.; JAYAPRAKASH,D.; PETER, A.T.; SREENIVASA, M.S.; KUMAR, M.; SESHAGIRI, P.B. Pentoxifylline improves sperm capacitation and in vitro fertilization of oocytes in the golden hamster. **Theriogenology**, v. 44, p.553-562, 1995.

- RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D.L.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D., (eds). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, p. 1-40.
- SAAD, S.Y.; NAJJAR, T.A.; ALASHARI, M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. **Clinical and experimental Pharmacology and Physiology**. V.31, p.862-867, 2004.
- SALAM, O.; BAIUOMY, A.R.; EL-SHENAWY, S.; ARBID, M. The anti-inflammatory effects of the Phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. **Pharmac. Res.**, v. 47, p. 331-340, 2003.
- SALANOVA, M.; CHUN, S.; IONA, S.; PURI, C. Type 4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterases are expressed in discrete subcellular compartments during rat spermiogenesis. **Endocrinology**, v. 140, n. 5, p. 2297-2305, 1999.
- SALLOUM FN, OCKAILI RA, WITTKAMP M, MARWAHA VR, KUKREJA RC. Vardenafil: A novel type 5 phosphodiesterase inhibitor reduces myocardial infarct size following ischemia/reperfusion Vardenafil reduces testicular damage injury via opening of mitochondrial KATP channels in rabbits. **J Mol Cell Cardiol**. 2006;40:405–411. 10.1016/j.yjmcc.2005.10.002 [[PubMed](#)]
- SAMALI, A. & ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress Chaperon.**, v. 3, p. 228-236, 1998.
- SANDRA HELENA GABALDI & ALEXANDRE WOLF. a importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciêñ. Agr. Saúde. FEA**, Andradina, v. 2, n. 2, jul-dez, , p 66-70, 2002.
- SARAIVA, K. L. A., SILVA, A. K. S. E., WANDERLEY, M. I., DE ARAÚJO, A. A., DE SOUZA, J. R. B. AND PEIXOTO, C. A. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **International Journal of Experimental Pathology**, 2009, 90: 454–462. doi:10.1111/j.1365-2613.2009.00660.x
- SAVAS, C.; DINDAR, H.; ARAS, T.; YÜCESAN, S. Pentoxifylline improves blood flow to both testes in testicular torsion. **International Urology and Nephrology.**, v. 33, p. 81 – 85, 2002.
- SCIEGLIŃSKA D, WIDLAK P. Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes *Genes Cells.*; 12(4):487-99, Apr, 2007.
- SETCHELL, B. P. Heat and the testis. **Journal of Reproduction Fertility** 114, 179-194 (1996).
- SETCHELL, B. P. The effects of on the testes of mammals. **Anim. Reprod.**, v.3, n.2, p.81-91, April/June.2006.
- SETCHELL, B.P. The parkes lecture heat and the testis. **J. Reprod. Fertil.**, 114:179-194,1998.

SETCHELL, B.P.; WAITES, G.M.H. The effects of local heating of the testis on the flow and composition of rete testis fluid in the rat, with some observation on the effects of age and unilateral castration. **Journal of Reproduction and Fertility** 30 255-233, 1972.

SHARP, F. R., MASSA, S. M. & SWANSON, R. A. Heat shock protein protection. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 97-99, 1999.

SIBEL BEKTAS, KEMAL KARAKAYA, MURAT CAN, BURAK BAHADIR, BERRAK GUVEN, NILSEN ERDOGAN, SUKRU OGUZ OZDAMAR. The effects of tadalafil and pentoxifylline on apoptosis and nitric oxide synthase in liver ischemia/reperfusion injury. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences** (2016) 32, 339e347.

SILVA JÚNIOR, V. A.; VIEIRA, A.C.S.; PINTO, C.F.; PAULA, T.A.R.; PALMA, M.B. AMORIM, M.J.A.L.; AMORIM JÚNIOR, A.A. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reprod.Nutr. Dev.** v. 45, p.1-10, 2006.

SIMÕES MJ. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras.** 2008 Jan-Feb;23(1):29-35.

SOD-MORIAH, U.A.; GOLDBERG, G.M.; BEDRAK, E. Intrascrotal temperature, testicular histology and fertility of heat-acclimatized rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, 37. 263-268 (1974).

SOUZA, J.A.A.T., COSTA, F.A.L. Características do sêmen e correlação com outros parâmetros reprodutivos em ovinos deslanados. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SPIESS AN, FEIG C, SCHULZE W, CHALMEL F, CAPPALLO OBERMANN H, PRIMIG M, ET AL. Cross-platform gene expression signature of human spermatogenic failure reveals inflammatory-like response. *Hum Reprod.* 2007;22(11):2936–46. [[PubMed](#)]

SUMIKO KIMURA AND KOHEI SHIOTA. Sequential Changes of Programmed Cell Death in Developing Fetal Mouse Limbs and Its Possible Roles in Limb Morphogenesis. **Journal of Morphology** 229:337-346, 1996.

TANAKA T. Germ cell-specific heat shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. **Eur. J. biochem.** 267, 3073-3078, 2000.

TANELI F, VATANSEVER S, ULMAN C, YILMAZ O, GIRAY G, GENÇ A, TANELI C. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. **Acta Histochem.** 2005;106:459–66. 10.1016/j.acthis.2004.11.001 [[PubMed](#)]

TAPANAINEM, J.S., TILLY, J.L., VIHKO, K.K. *et al.* Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. **Mol Endocrinol** 1993; 77: 643-650

TATSUYA ISHII., SHINGO MATSUKI., YOSHIHITO IUCHI., FUTOSHI OKADA., SHINJIRO TOYOSAKI., YOSHIHIKO TOMITA., YOSHITAKA IKEDA., JUNICHI

- FUJI. Accelerated impairment of spermatogenic cells in sod1-knockout mice under heat stress. **Acta** Vol. 39, No. 7 , Pages 697-705 (doi:10.1080/10715760500130517), 2005.
- TERUYA R, FAGUNDES DJ, OSHIMA CT, BRASILEIRO JL, MARKS G, YNOUYE CM, SIMÕES MJ. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras**. 2008 Jan-Feb;23(1):29-35.
- TESARIK, J.; MENDOZA, C.; GRECO, E. The effect of FSH on male germ cell survival and differentiation in vitro is mimicked by pentoxifylline but not insulin. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 6, n. 10, p. 877-881, 2000.
- THOMSON, R.G. **Patologia veterinária especial**. São Paulo: Ed. Manole.V 2
- THORPHY, T.J. Phosphodiesterases isoenzymes: molecular targets for novel antiasthma agents. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 157, p.351-370, 1998.
- TOLOSA, E.M.C. et al. Coloração para sistema nervoso. In : TOLOSA, E.M.C. et al. (Ed.). **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. cap. 5, p. 148-150.
- TOLOSA, E.M.C. et al. Coloração para tecido conjuntivo. In : TOLOSA, E.M.C. et al. (Ed.). **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. cap.4, p. 121-123.
- TOLOSA, E.M.C. et al. Técnica histológica. In : TOLOSA, E.M.C. (Ed.). **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. cap. 2, p. 43- 52.
- TURNER TT., BANG HJ., LYSIAK JL., J UROL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical. **repair**; 172 (6 Pt 2):2574-8, 2004.
- TURNER, R.M.O. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in STALLIONS. **CLIN. TECH. EQUINE PRACT**. N. 6, P. 278-284, 2007.
- USTÜN H, AKGÜL KT, AYYILDIZ A, YAGMURDUR H, NUHOGLU B, ERSAGUN KARAGUZEL, et al. Effect of phosphodiesterase 5 inhibitors on apoptosis and nitric oxide synthases in testis torsion: an experimental study. **Pediatr Surg Int**. 2008;24:205–11. 10.1007/s00383-007-2058-8 [[PubMed](#)]
- VADIRAJA B.B. & MADYASTHA K.M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA, **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 285: 262-266, 2001
- VALENTIM, L. M., GEYER, A. B., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., WORM, P.V.,RODNIGHT, R., NETTO, C. A. & SALBEGO, C.G. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunoccontent and phosphorylation in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 107, p. 43-49, 2001.
- VALENTIM, L. M., RODNIGHT, R., GEYER, A. B., HORN, A. P., TAVARES, A. A.,CIMAROSTI, H., NETTO, C. A. & SALBEGO, C. G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p. 379-386, 2003.

- VALLE, A.; FUENTES, A.; PUERTA, M. Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo Suizo nacidos en el trópico. **Rev. Fac. Agron.**, v. 22, p. 52-61, 2005.
- WAITES, G.W.H.; SETCHELL, B.P. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G.E. **Marshall's physiology of reproduction**. 1ed., Londres: Churchill Livingstone, 4ed. v.2, 1990. p. 1-105.
- WIDŁAK W, BENEDYK K, VYDRA N, GŁOWALA M, SCIEGLIŃSKA D, Acta Biochim Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium. **J Pol.**; 50(2):535-41, 2003.
- WIDLAK W, VYDRA N, MALUSECKA E, DUDALADAVA V, WINIARSKI B, Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes **Genes Cells. J Pol.**; 12(4):487-99, Apr, 2007.
- WOLF BB, GREEN DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. **J Biol Chem** 274: 20049–20052, 1999.
- YENI D, GUNDOGAN M, CIGERCI IH, AVDATEK F, FIDAN AF. Seasonal variation of oxidative stress parameters in ram seminal plasma. **J Anim Vet. Adv.** 2010;9:49–55.
- YILDIZ H, DURMUS AS, ŞİMŞEK H, YAMAN M. Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion. **Clinics**. 2011;66(1):137-142. doi:10.1590/S1807-59322011000100024.
- YIN, Y.Z., HAWKINS, K.L., DEWOLF, .C. et al.,. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. **J. Androl.**, 18:159-165, 1997.
- YU BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**. 1994; 74: 139-161.
- ZAITONE S, HASSAN N, EL-ORABI N, EL-AWADY EL-S. Pentoxifylline and melatonin in combination with pioglitazone ameliorate experimental non-alcoholic fatty liver disease. **Eur J Pharmacol** 2011;662:70e7.
- ZHANG H, YIN Y, WANG G, LIU Z, LIU L, SUN F. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. **Scientific Reports**. 2014;4:4260. doi:10.1038/srep04260.
- ZHANG, X.; SHARMA, R.K.;AGARWAL, A.; FALCONE, T. Effect of Pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. **Journal of assisted Reproduction and Genetics**,v. 22, p. 415 – 417, 2005.
- ZHU DJ, XIA B, BI Q, ZHANG SJ, QIU BS, ZHAO C. Functional protection of pentoxifylline against spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: necrosis and apoptosis effects. **Chin Med J (Engl)**. 5;121(23):2444-9, Dec, 2008.
- ZI-QING LIN, TOSHIKAZU KONDO, YUKO ISHIDA, TATSUNORI TAKAYASU,

NAOFUMI MUKAIDA. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. **Journal of Leukocyte Biology** Volume 73, June 2003, p. 721.