

## Atualidades na abordagem da degeneração testicular em garanhões

### *Updates on the approach to testicular degeneration in stallions*

Yamê Fabres Robaina Sanceler da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG, Brazil.

#### Resumo

A degeneração testicular é a enfermidade que mais impacta a eficiência reprodutiva de garanhões, porém seu diagnóstico precoce e tratamento ainda são desafios. Nesse sentido, o presente artigo tem por objetivo revisar a fisiopatologia da degeneração testicular, apresentar novas ferramentas utilizadas em seu diagnóstico e, principalmente, discutir terapias promissoras que visam minimizar os danos ocasionados por esta enfermidade ao parênquima testicular e à qualidade seminal de garanhões.

**Palavras-chave:** hipertermia testicular; processo degenerativo; terapias; testículo.

#### Abstract

*Testicular degeneration is the disease that most impacts the reproductive efficiency of stallions, but its early diagnosis and treatment are still challenging. This manuscript aims to revisit the pathophysiology of testicular degeneration, to present new tools used in its diagnosis and, mainly, to discuss therapies that have shown promise in mitigating damage to the testicular parenchyma and to quality seminal promoted by this disease in stallions.*

**Keywords:** testicular hyperthermia; degenerative process; therapies; testicle.

#### Introdução

Diferente de outras espécies domésticas de interesse zootécnico, os equinos são valorizados individualmente, por atingirem valores elevados de comércio e reprodução. Nesse contexto, os garanhões são peças importantes dentro da indústria equina, uma vez que possuem um elevado custo de criação até atingirem idade reprodutiva e, frequentemente, são mantidos em atividade até idade avançada. Por isso, alterações reprodutivas nesses machos resultam em importantes perdas econômicas aos criadores, uma vez que aumentam o custo por potro nascido, devido à necessidade de coberturas extras ou maior número de transportes de sêmen, exames e tratamentos, serviços veterinários, diárias dos animais em centrais ou haras, além dos custos de manutenção de éguas não prenhas, impactando esta cadeia produtiva como um todo.

Dentre as enfermidades que afetam a fertilidade nos machos domésticos, a degeneração testicular (DT) é a mais importante (Amann 1981a e 1981b), devido sua elevada prevalência e prejuízo na fertilidade. Ela consiste no processo de deterioração do parênquima do testículo com consequente perda de sua função.

Diversos fatores etiológicos podem resultar em degeneração testicular, como varicocele, torção testicular, trauma, infecções locais (como periorquite, orquite, epididimite), neoplasias testiculares, hérnia inguino-escrotal, deficiências nutricionais e uso de esteróides anabolizantes/antiinflamatórios (Turner 2007; Edwards 2008). No entanto, perturbações da homeostase térmica testicular como febre e hipertermia ambiental ou local são as causas mais frequentes (Blanchard et al., 1996).

A termorregulação ocorre pela ação de diversos mecanismos testiculares cujo resultado final é a redução da temperatura gonadal. Componentes do escroto combinados ao mecanismo de retirada de calor do sangue que irriga o parênquima testicular pelo plexo pampiniforme, garantem a homeostase térmica do testículo, mantendo este a uma temperatura entre 3 a 4° C abaixo da temperatura corporal (Waites, 1961).

Desta forma, fatores externos ou internos que interfiram no complexo mecanismo de termorregulação deste órgão, promovendo o incremento da temperatura testicular, resultam em um aumento do metabolismo celular, aumentando a necessidade tecidual de oxigênio e substratos orgânicos, como a glicose. Como o suporte sanguíneo ao testículo é limitado, em situações de aumento de demanda

<sup>1</sup>Correspondência: yame@ufv.br

Recebido: 24 de outubro de 2021

Aceito: 24 de novembro de 2021

de oxigênio ocorre hipóxia e hipoglicemia, gerando danos ao tecido (VanDemark e Ewing, 1963; Paul et al., 2008).

Além dos danos causados pelo déficit no suprimento de oxigênio e substratos orgânicos ao testículo, o estresse térmico promove aumento do metabolismo mitocondrial nas células do parênquima testicular, gerando uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, superior a capacidade antioxidante de degradação desse tecido (Aitken e Roman, 2008). Além disso, o insulto térmico por si só promove modificações em enzimas, proteínas, nas moléculas de RNA e DNA, modulando a expressão gênica de proteínas envolvidas em vias de apoptose (Yin et al., 1997 e 1998). O resultado da combinação de todos esses mecanismos é o dano e modificação da arquitetura tecidual, com perda da função gonadal (Sancler-Silva, 2017).

Estudos em humanos (Shill, 1982; Moein et al., 2005; Oliva et al., 2009) e ratos (Queiroz et al., 2013; Yao et al., 2016) com alterações testiculares, demonstraram o efeito benéfico da pentoxifilina na melhoria de parâmetros espermáticos e testiculares. Esse efeito é atribuído ao mecanismo de ação deste fármaco em aumentar a microcirculação de órgãos, mediante ação na deformabilidade de hemácias, viscosidade sanguínea e vasodilatação, aprimorando, assim, o suporte sanguíneo e refletindo em melhorias da função testicular (Ward e Clissold, 1987; Collingridge e Rockell, 2000). Além da atenuação dos danos causados à gônada masculina pelas propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas deste medicamento (Rieneck et al., 1993; Neuner et al., 1994; Nouri et al., 2016).

Recentemente estes efeitos benéficos também foram demonstrados em garanhões com degeneração testicular induzida (Sancler-Silva et al. 2017; Sancler-Silva et al. 2018; Sancler-Silva et al., 2020), uma vez que garanhões tratados com pentoxifilina apresentaram menores danos ao parênquima testicular e à qualidade seminal.

A suplementação oral com a L-carnitina (Coskun et al., 2013) e o ácido docosa-hexaenóico (Roqueta-Rivera et al., 2010; Zararsiz et al., 2011) resultou em efeitos benéficos na regeneração do parênquima testicular e qualidade seminal, após danos testiculares em ratos. Nos equinos, o ácido docosa-hexaenóico (Brinsko et al., 2005) e a L-carnitina (Morris e Gibb, 2016) apresentaram resultados positivos na qualidade seminal, no entanto, carecem estudos controlados que comprovem esses benefícios em garanhões com distúrbios testiculares.

## Revisão de literatura

### Mecanismos de termorregulação testicular

Nos cavalos, a espermatogênese normalmente ocorre a uma temperatura intra-testicular média de 3 a 4° C abaixo da corporal. Para isso ocorrer, a termorregulação testicular e epididimária dependem de uma combinação de mecanismos (Figura 1) relacionados à bolsa escrotal, plexo pampiniforme, túnica dartos e músculo cremaster (Setchell, 1991).

Baseado em dados obtidos de ovinos (Waites, 1961), o sangue contido em vasos da superfície escrotal troca calor com o ambiente através da evaporação da umidade escrotal, facilitada pela pouca quantidade de gordura subcutânea e intensa atividade de glândulas sudoríparas nessa região (Amann, 2011). O sangue resfriado retorna via plexo pampiniforme, que através de um mecanismo de contracorrente, retira calor do sangue que penetra no testículo via artéria testicular, conduzindo-o a uma temperatura média de 34° a 35° C (Amann, 1981a).

A troca de calor vascular por si só não poderia regular ativamente a temperatura do testículo. Para que isso ocorra adequadamente, o calor produzido no testículo deve ser perdido pelo escroto, para que o sangue venoso retorne a uma temperatura inferior que o fluxo arterial, permitindo troca de calor entre a artéria e o plexo pampiniforme (Waites, 1961; Amann, 1981a).

A pele do escroto é mais delgada do que a existente em outras partes do corpo e, especialmente na espécie equina, há raros ou nenhum pelos e uma quantidade abundante de glândulas sudoríparas, responsáveis por produzir grande quantidade de secreção apócrina que ao evaporar retira calor desta região (Setchell et al., 1994).

A temperatura testicular é ainda influenciada pela posição do testículo em relação à parede abdominal e esse posicionamento está sobre o controle das musculaturas dartos e cremaster. A túnica dartos é uma camada singular de músculo liso associada a tecido conjuntivo fibro-elástico em contato íntimo com a derme do escroto. Essas fibras musculares são sensíveis à temperatura do ambiente devido a grande quantidade de receptores térmicos que possuem (Dellmann e Brown, 1982). Em situações de temperaturas amenas ambas as musculaturas se contraem, reduzindo a área de troca de calor com o meio

ambiente e aproximando o testículo da cavidade abdominal aquecida. Em temperaturas elevadas as musculaturas relaxam promovendo o relaxamento do escroto e testículo, permitindo maiores trocas de calor entre este e meio ambiente (Amann, 2011).

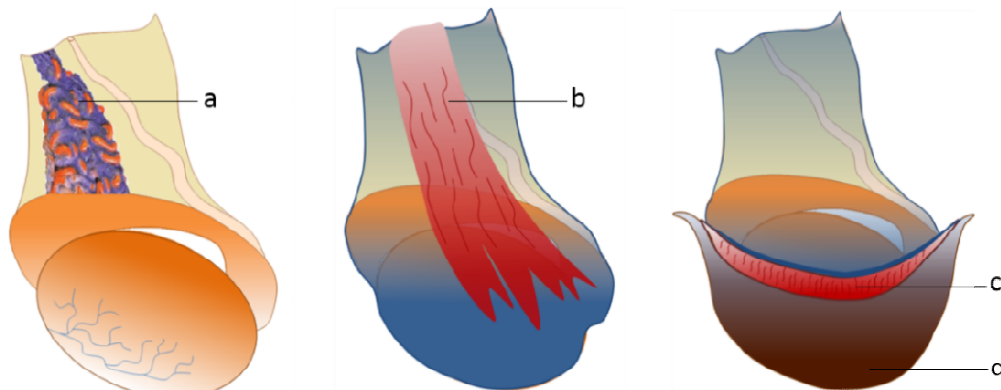


Figura 1. Mecanismos que asseguram a termorregulação testicular no garanhão: a) Plexo pampiniforme, responsável pela retirada de calor do sangue que irriga o parênquima testicular; b) Músculo cremaster, que ao contrair e relaxar suas fibras, aproxima e afasta o testículo da cavidade pélvica, respectivamente; c) Túnica dartos que ao se contrair e relaxar, respectivamente, reduz e aumenta a superfície escrotal de troca de calor com o ambiente; d) Epiderme delgada e rica em glândulas sudoríparas que, ao produzirem elevada secreção apócrina, auxiliam na perda de calor escrotal por evaporação (Sancler-Silva, 2017).

A maioria dos problemas testiculares em garanhões está relacionada com alterações na capacidade para controlar a temperatura da gônada (Alvarenga e Papa, 2009). Em situações em que há aumento da temperatura corporal ou aumento de temperatura do testículo por influência do meio ambiente ou de condições patológicas (Blanchard et al., 1996), o animal pode não conseguir manter a temperatura escrotal ideal, ainda que os processos de termorregulação continuem atuando, culminando em um processo degenerativo (Waites e Moule, 1961).

### Fisiopatologia da DT

A degeneração testicular (DT) pode ser definida como o processo patológico que provoca a deterioração e perda da arquitetura histológica do parênquima testicular, resultando em produção anormal de espermatozoides, com consequente perda da função da gônada masculina (Turner, 2007). É a alteração mais frequente e que mais contribui para a infertilidade dos machos mamíferos terrestres. Isso se deve ao fato do epitélio seminífero ser extremamente sensível a adversidades externas e internas (Amann, 1981b; Setchel, 1998).

A DT pode ser dividida em duas grandes categorias: DT adquirida, quando resulta de um insulto testicular conhecido; e degeneração testicular idiopática (DTI), também denominada senil ou idade-relacionada, quando não há uma causa aparente e geralmente ocorre em garanhões idosos (Turner, 2007; Birch, 2008).

Uma grande variedade de fatores etiológicos pode resultar em DT adquirida, incluindo estresse térmico ambiental, estresse térmico escrotal, inflamações e infecções no escroto ou em seus componentes, febre, trauma, neoplasias, torção testicular, hérnia ínguino-escrotal, exposição a toxinas, distúrbios endócrinos, deficiências nutricionais e tratamentos medicamentosos, especialmente esteroides anabólicos e anti-inflamatórios (Edwards, 2008; Turner, 2007). Em muitos casos alguns destes fatores podem atuar em sinergismo para o estabelecimento de problemas circulatórios locais e falhas na termorregulação testicular (Edwards, 2008).

A DT é, portanto, causada por processos que precedem o dano testicular, não sendo uma afecção primária e sim o resultado de doenças que se refletem secundariamente na gônada masculina. É possível que as diferentes formas da DT constituam um grupo heterogêneo de doenças que levam todos a um ponto final comum, a deterioração do parênquima do testículo (Turner, 2003; Turner, 2007; Edwards, 2008).

Entretanto, em muitos casos não se consegue chegar a uma conclusão quanto ao agente causal, principalmente em garanhões de meia-idade ou senis, sendo esta denominada de DT idiopática. Nesse

caso, observam-se alterações vasculares degenerativas que se processam de forma progressiva e que frequentemente evoluem para os quadros de sub ou infertilidade, comuns aos animais idosos (Turner, 2007; Turner e Zeng, 2012).

Os processos degenerativos podem ser ainda classificados como bilaterais ou unilaterais de acordo com a sua localização; em discretos, moderados ou severos, dependendo da gravidade; ou ainda em temporários ou permanentes, quanto à duração da injúria. A extensão da DT é frequentemente determinada pelo tempo de permanência e gravidade do insulto. Se a causa do processo for removida e o testículo for apenas brevemente afetado, o parênquima testicular tende a se recuperar completamente. Mesmo se o testículo for gravemente afetado, quando a causa é retirada, o processo degenerativo geralmente não progride ainda que a função testicular não seja completamente recuperada (Turner, 2007).

O reestabelecimento da função testicular, por meio do retorno da homeostase escrotal, é possível, pois as espermatogônias-tronco, células de Sertoli e de Leydig possuem maior resistência aos insultos gonadais, permitindo o retorno da espermatogênese em aproximadamente 60 dias (Lagerlof, 1938).

O incremento da temperatura escrotal consiste na fonte dos problemas mais recorrentes da espermatogênese (Alvarenga e Papa, 2009). Todos os tecidos são susceptíveis a danos causados pelo calor, no entanto, os testículos são incomuns, pois são danificados pela exposição às temperaturas normalmente encontradas no abdômen (Setchell, 1998). Embora se origine dentro da cavidade abdominal em muitos mamíferos as gônadas masculinas descem para o escroto ainda durante o desenvolvimento fetal ou neonatal. O fato de se localizarem dentro do escroto, fora da cavidade abdominal, em condições fisiológicas, se deve justamente à necessidade de funcionarem a uma temperatura diferente dos demais órgãos corporais (Watson et al., 1994).

A exposição ao calor induz à formação anormal de espermatozoides, produzindo um gameta que pode ser capaz de fertilizar, mas o embrião morre durante seu desenvolvimento (Gabaldi e Wolf, 2002). Em ratos Perez-Crespo et al. (2008), Yin et al. (1998) e Yaeram et al. (2006) demonstraram que espermatozoides gerados de células germinativas expostas à hipertermia contém DNA danificado, são susceptíveis à apoptose e possuem baixa capacidade fertilizante *in vivo* e *in vitro*. A análise individual de garanhões mostrou que cavalos naturalmente com maiores temperaturas testiculares têm uma maior ocorrência de alterações na morfologia do espermatozoide (Ramires-Neto et al., 2013).

A elevação dos defeitos espermáticos em decorrência do estresse térmico escrotal é consistente com relatos de pesquisas em bovinos onde Fernandes et al. (2008) e Vogler et al. (1991) observaram uma redução na qualidade do sêmen com aumento de defeitos espermáticos a partir de duas semanas após insulação escrotal. Entre as células germinativas, os tipos mais vulneráveis ao calor são os espermatócitos nos estágios de paquíteno e diplóteno e as espermátides iniciais redondas (Lue et al., 1999; Carlsen et al., 2003). As espermatogônias são mais resistentes ao estresse térmico do que as outras células da linhagem germinativa, por isso é possível obter uma recuperação do epitélio seminífero dentro de dois meses, tempo aproximado da espermatogênese (Turner, 2007). As células somáticas, de Leydig e Sertoli, também são mais resistentes ao estresse por calor, sendo apenas afetadas em casos severos de degeneração testicular. Por isso, geralmente as concentrações dos hormônios esteróides não são alteradas após insulto térmico testicular (Setchell, 1998, Blanchard e Varner, 1993).

No Brasil a DT é uma condição bastante frequente na clínica equina e, dentre os inúmeros agentes causais, a babesiose, que é endêmica no país, ocupa posição de destaque em decorrência aos picos febris que ocasiona. Estes picos podem ser bastante elevados atingindo temperaturas corporais próximas de 41° C (Alvarenga e Papa, 2009).

Existem muitas hipóteses sobre a necessidade da espermatogênese ocorrer em temperatura inferior à abdominal (Kim et al., 2013). De forma resumida, o incremento calórico da gônada leva a um aumento do metabolismo celular e consequente aumento da demanda por oxigênio e glicose, que passam a não ser supridos adequadamente, culminando em hipóxia e hipoglicemia, respectivamente (Davis and Morris, 1963; VanDemark e Ewing, 1963; Setchell, 1998; Pérez-Crespo et al., 2008; Paul et al., 2009).

Além disso, o aumento do metabolismo eleva a produção de EROs, que em dado momento se sobrepõem aos mecanismos antioxidantes da célula. Tais eventos levam a danos bioquímicos como paralisação da produção proteica, desnaturação de proteínas, fragmentação de DNA e RNA e oxidação de lipídios (Ishii et al., 2005; Aitken e Roman, 2008; Shiraishi et al., 2012). O calor por si só também é capaz de causar danos bioquímicos, como desnaturação de proteínas e enzimas, além de danos aos ácidos nucleicos (Setchell, 1998; Love e Kenney, 1999). Finalmente, o estresse térmico leva a expressão gênica de proteínas envolvidas em vias de apoptose (Rockett et al. 2001; Kim et al., 2013; Sancler-Silva, 2017).

Todos os mecanismos relacionados ao efeito do estresse térmico no testículo convergem para o dano tecidual, produção de espermatozoides defeituosos e apoptose, resultando em subfertilidade ou

infertilidade do macho (Figura 2).

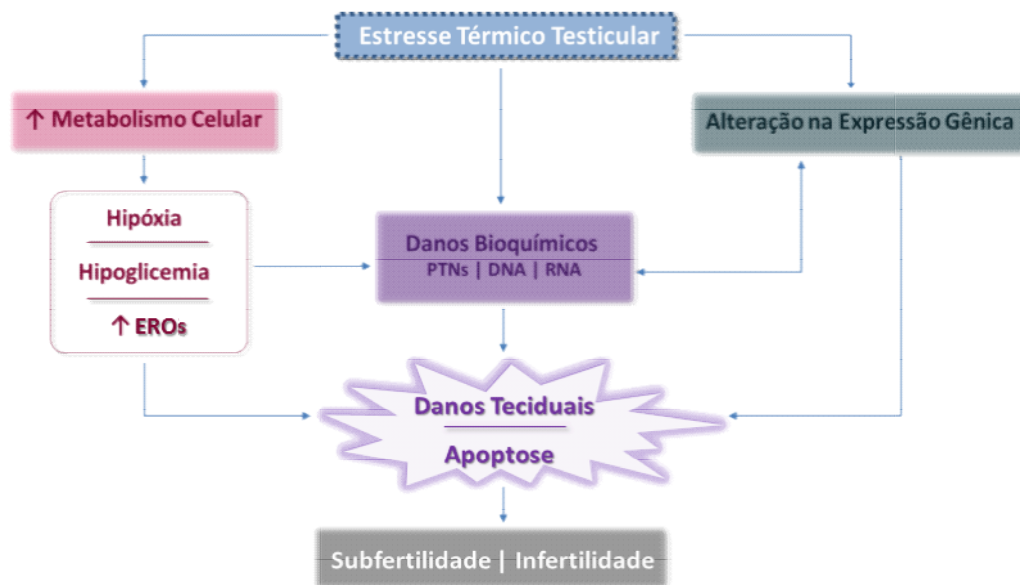


Figura 2. Mecanismos relacionados ao efeito do estresse térmico no testículo (hipóxia, hipoglicemia, elevação de espécies reativas de oxigênio, danos bioquímicos e alteração na expressão de genes). Tais mecanismos convergem para o dano tecidual, produção de espermatozoides defeituosos e apoptose, resultando em subfertilidade ou infertilidade do macho (Sancler-Silva, 2017).

### Diagnóstico da DT

Apesar da DT ser causada por inúmeros estímulos e fatores diferentes, quase sempre a resposta tecidual se manifesta clinicamente da mesma maneira: pela alteração do tamanho gonadal, da arquitetura histológica e da produção anormal de espermatozoides (Watson et al., 1994). Assim, o diagnóstico de degeneração testicular é bastante direto e conclusivo, entretanto a identificação do fator causal pode ser bastante laboriosa.

O diagnóstico da DT geralmente é baseado no exame físico, incluindo a inspeção e palpação testicular, na avaliação seminal, além de especial atenção ao histórico clínico geral e reprodutivo do animal. Uma história completa é necessária antes que se possa fazer um diagnóstico de DT, uma vez que tanto clinicamente como histologicamente esta condição é indistinguível da hipoplasia testicular (Blanchard et al., 1990; Turner, 2007). Os achados testiculares no exame físico e histológico e as características do sêmen são muito semelhantes entre essas duas condições, ainda que a libido não seja afetada (Watson et al., 1994; Birch, 2008).

Um diagnóstico preciso de DT começa com uma anamnese detalhada da atividade reprodutiva do garanhão, como informações sobre o manejo de coberturas/coletas de sêmen e índices de fertilidade. Além disso, a investigação da etiologia da DT se inicia apurando no histórico possíveis fatores causais, como trauma do testículo, doença associada com febre, administração de esteroides anabolizantes ou outras substâncias que afetam a gônada. Nestes casos, geralmente o início da infertilidade é súbito e intimamente associado à causa (Birch, 2008).

O prognóstico da fertilidade futura é geralmente melhor nos casos em que a causa incitante pode ser identificada e removida, do que casos em que não há um fator aparente. Os garanhões, especialmente os mais velhos, que não apresentam história de insulto testicular conhecido, doença sistêmica e declínio da fertilidade ao longo do tempo, devem ser considerados para DTI (Turner, 2003; Turner, 2007; Turner e Zeng, 2012).

Na fase aguda do processo o testículo degenerado inicialmente se apresenta tumefeito e com consistência macia à palpação. Em seguida, ocorre uma diminuição paulatina do tamanho, caracterizada por atrofia e flacidez (Turner, 2007). Com a progressão da degeneração e da atrofia gonadal, a flacidez vai dando lugar ao enrijecimento do tecido testicular, devido à substituição do parênquima por fibrose (Figura 3). A medida que o processo se cronifica, os epidídimos tornam-se mais proeminentes e

desproporcionais em relação à gônada (Blanchard et al., 2001). A exposição testicular ao calor leva à redução do peso, da massa e circunferência escrotal (Setchell et al., 1998).

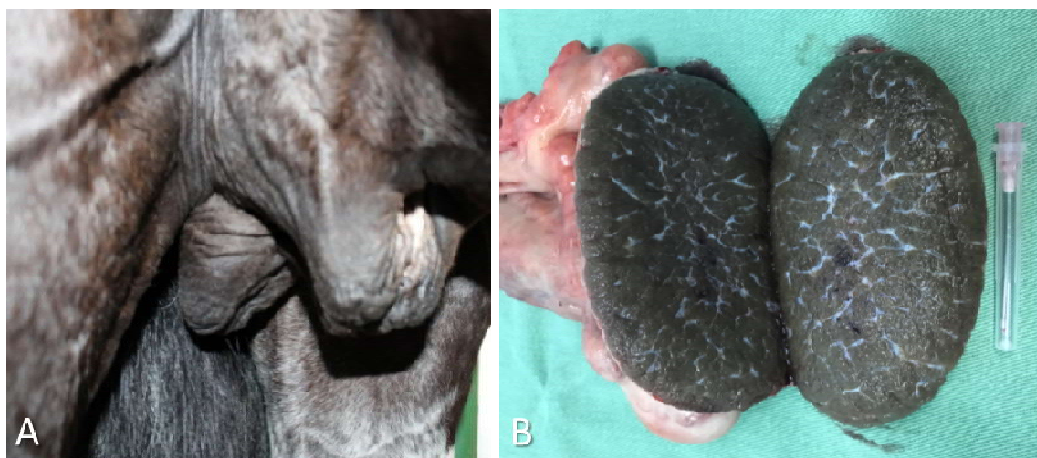


Figura 3. A) Garanhão com degeneração testicular severa, apresentando grave atrofia gonadal. B) Testículo de um garanhão azoospermico, apresentando intensa substituição do parênquima testicular por fibrose.

A diminuição progressiva da fertilidade após o insulto testicular é um sinal clínico comum a todos os equinos com DT (Turner, 2007) e está relacionada à baixa qualidade seminal destes pacientes (Blanchard et al., 2000), uma vez que a redução da motilidade total e progressiva, bem como o aumento de defeitos espermáticos (cabeças destacadas e anormais, gotas proximal e distal, anormalidade geral da parte média e caudas enroladas) estão associados a um menor índice de prenhez (Love, 2011). Com o agravamento do processo, o garanhão pode se tornar oligo ou azoospermico (Blanchard e Varner, 1993) e se observa células germinativas (células redondas) e células gigantes multinucleadas no ejaculado (Watson et al., 1994; Blanchard e Johnson, 1997; Blanchard et al., 2001).

Uma baixa produção diária de espermatozoides (DSO/ml), conjuntamente à uma baixa porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais no ejaculado têm sido recomendados como bons indicadores da possível presença de DT (Love et al., 1991; Thompson et al., 2004; Turner, 2007).

O dano ao parênquima testicular se reflete em redução do volume e consistência do mesmo. Dessa forma, a mensuração rotineira dos testículos pode facilitar a identificação precoce de DT, com a observação da diminuição de alguma medida ou volume total (Turner, 2007).

A ultrassonografia modo-B e Doppler são ferramentas úteis na avaliação reprodutiva de garanhões, sendo uma técnica interessante na investigação de causas que antecipam a DT, como no caso de tumores e distúrbios circulatórios que levam ao acúmulo de líquido (Ball, 2008). Em casos crônicos de DT, pode-se observar aumento generalizado da ecogenicidade, redução do tamanho e da circulação do parênquima testicular, exemplificado pela perda de visibilidade da veia central. As artérias que penetram na túnica albugínea também podem aparecer mais proeminentes na periferia dos testículos, devido a uma redução no fluxo sanguíneo do parênquima testicular (Love, 1992).

O fluxo sanguíneo testicular parece se alterar em processos degenerativos (Galil e Setchell, 1988; Miesusset et al., 1992). O índice Doppler de resistividade (IR) indica a resistência do fluxo sanguíneo causado pelo leito microvascular distal ao local de medição. Já o índice de pulsatilidade (PI) quantifica a pulsatilidade da forma da onda. Os aumentos do IR e PI indicam diminuição da perfusão do tecido avaliado. No entanto, o IR é o índice mais sensível e comum utilizado na detecção de distúrbios do fluxo sanguíneo testicular em humanos (Biagiotti et al., 2002). Em termos gerais, esses parâmetros aumentam nos processos isquêmicos ou degenerativos, bem como nos testículos atroficos e diminui nas condições inflamatórias devido à hiperemia (Jee et al., 1997, Lefort et al., 2001, Ekerhovd e Westlander, 2002).

Recentemente, dois outros parâmetros de fluxo sanguíneo estão sendo usados em andrologia: total de fluxo sanguíneo arterial (TABF) e taxa de fluxo sanguíneo arterial total (TABF rate). Estes parâmetros, especialmente o último, são melhores indicadores de perfusão testicular e são afetados por distúrbios vasculares mais cedo do que os índices tradicionais (Tarhan et al., 2003).

Nos garanhões, os índices Doppler (PI e RI) apresentaram correlação negativa com o número total de espermatozoides e com o número total de espermatozoides morfologicamente normais com

motilidade progressiva (Pozor et al., 2014). O RI aumenta significativamente em homens oligospermicos e é menor nos homens com contagem normal de espermatozoides (Pinggera et al. 2008).

Microscopicamente a aparência histológica da DT é evidenciada pela diminuição do diâmetro e espessura dos túbulos seminíferos, mineralização e espessamento da membrana basal tubular, vacuolização citoplasmática, picnose nuclear, fibrose intersticial, diminuição do número e descamação de células germinativas, desorganização do epitélio seminífero, atividade espermatogênica diminuída ou ausente e túbulos seminíferos apresentando poucos ou raros espermatozoides, principalmente nos estágios mais avançados da doença (Blanchard, 2001; Turner, 2007; Edwards, 2008). Ocorre, uma gradativa diminuição no número de espermatócitos, espermátides e, em quadros severos, de células de Sertoli, formação de células gigantes intratubulares, espermiostase, hemorragia, e hiperplasia de células Leydig (Watson et al., 1994; Gehlen et al., 2001; Turner, 2007).

Há ainda em casos mais severos a perda completa ou redução da espermatogênese, espessamento hialino do interstício, ondulação da membrana basal, como resultado do colapso dos túbulos seminíferos (Gehlen et al., 2001; Turner, 2007). O tecido fibroso pode se tornar abundante e calcificado e os túbulos seminíferos ficam quase desprovidos de células espermatogênicas, restando apenas células de sustentação (Humphrey e Ladds, 1975). As alterações histológicas descritas só podem ser visualizadas mediante realização de biópsia (Figura 4), permitindo um diagnóstico conclusivo do quadro (Turner, 2007; Ball, 2008a).



Figura 4. A) Realização de biópsia testicular com agulha Tru-CUT de calibre 16 gauge; B) Secção histológica coradas em HE (hematoxilina-eosina) analisadas por microscopia óptica de luz (40 x de magnificação) de animal com degeneração testicular moderada, apresentando redução do tamanho dos túbulos e da espessura do epitélio seminífero, presença de células germinativas na luz do túbulo seminífero, ondulação da membrana basal, dentre outras alterações.

As variações nos níveis sistêmicos de hormônios envolvidos no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em machos com DT têm sido discutidas por diversos autores, com resultados bastante variáveis (Blanchard et al., 1996; 2000). Os níveis hormonais periféricos não são bons preditores de DT leve/moderada, já que há significativa variação entre garanhões saudáveis, assim como em garanhões com redução de fertilidade (Blanchard e Varner, 1993). Algumas células são mais afetadas do que outras pelo estresse térmico escrotal; geralmente em casos brandos desta enfermidade somente as células germinativas são afetadas, entretanto, em casos extremos pode ocorrer perda de células somáticas do parênquima testicular afetando a esteroidogênese (Setchell, 1998).

Pozor et al. (2018) avaliaram os níveis plasmáticos e a imunoexpressão do hormônio anti-Mulleriano, em garanhões com degeneração testicular induzida por medicamento contraceptivo, e observaram aumento deste hormônio na corrente sanguínea e na imunoexpressão testicular. Dessa forma, o AMH pode ser um marcador para esta condição, entretanto é necessário verificar se o mesmo ocorre em animais com degeneração testicular natural ou induzida por calor são necessários.

### Terapias

A principal e mais importante conduta terapêutica em quadros de DT consiste na remoção da

causa primária. Com isso, poderá haver gradualmente uma melhora na qualidade seminal, que se completa nos próximos dois meses (Blanchard e Varner, 1993; Turner, 2007). Esse período é necessário para que o ciclo espermatogênico pós-insulto gere espermatozoides sadios (Birch, 2008), ou pelo menos, evitará a progressão da doença (Turner, 2007). Em casos muito graves de DT, pode ser necessários mais de cinco meses para recuperação e retorno à função reprodutiva (Blanchard e Varner, 1993). Entretanto, o prognóstico reprodutivo é variável, pois enquanto alguns animais apresentam retorno da fertilidade ao mesmo nível de antes do insulto, em outros casos pode não haver total recuperação (Turner, 2007).

Existem alguns relatos na literatura de tratamentos bem-sucedidos com GnRH em garanhões com infertilidade. Entretanto, esses resultados não foram repetidos em estudos controlados para DT (Evans e Finley, 1990; Shiner et al., 1993). Sendo a etiologia do processo na maioria das vezes relacionada a um dano tecidual local por morte celular e danos oxidativos, qualquer terapia hormonal não traria benefícios (Alvarenga e Papa, 2010).

Há descrições na literatura sobre os efeitos benéficos da suplementação com antioxidantes solúveis em gordura sobre a qualidade do sêmen em garanhões, como por exemplo, o ácido docosaexaenóico (DHA), mais conhecido como Ômega 3, que consiste em um ácido graxo poliinsaturado (Brinsko et al., 2005). No entanto, os efeitos deste tratamento em garanhões com problemas de fertilidade ainda não foram determinados. Turner et al. (2007) sugeriram um possível efeito benéfico na qualidade seminal e fertilidade de garanhões suplementados com nutracêuticos contendo DHA ou substâncias semelhantes.

Em ratos que apresentavam distúrbios da espermatogênese e infertilidade, a suplementação oral com o DHA, por cerca de 90 dias, induziu a restauração completa da espermatogênese e produção adequada de espermatozoides (Roqueta-Rivera, 2010). Esse efeito foi posteriormente corroborado por estudo de Zararsiz et al. (2011), que demonstraram os efeitos benéficos do DHA em reduzir alterações testiculares. Este efeito foi demonstrado mediante elevação da atividade antioxidante das enzimas (SOD e GPx) no testículo e aumento dos níveis plasmáticos de testosterona.

A suplementação oral com L-carnitina, promoveu proteção do epitélio seminífero em ratos submetidos a tratamento com quimioterápico gonadotóxico (Coskun et al., 2013). Apesar de não haver estudos controlados em garanhões com distúrbios testiculares que comprovem os efeitos benéficos desses nutracêuticos, seus efeitos positivos na espermatogênese foram indiretamente demonstrados por estudos que demonstraram melhoria da qualidade seminal e fertilidade após o uso do DHA (Brinsko et al., 2005; Silva et al., 2019) e L-carnitina (Stradaioli et al., 2004; Gibb et al., 2015; Morris e Gibb, 2016).

Estudos em homens e ratos com disfunções na espermatogênese demonstraram que o tratamento com pentoxifilina (PTX), foi eficiente em aumentar a motilidade total, progressiva e concentração espermática (Moein et al., 2005; 11; Yao et al., 2016). Outro estudo demonstrou que a associação de PTX com zinco e ácido fólico foi eficiente em reduzir a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente anormais no sêmen de homens com varicocele (Oliva et al., 2009). Além disso, a PTX foi eficiente em aumentar o fluxo sanguíneo testicular em ratos submetidos à torção testicular após a reversão do processo (Savas et al., 2002).

Recentemente estes efeitos benéficos do tratamento oral com pentoxifilina também foram demonstrados em garanhões com degeneração testicular induzida (Sancler-Silva et al. 2017; Sancler-Silva et al. 2019; Sancler-Silva et al., 2020). Nestes estudos, houve melhoria de diversos parâmetros relacionados à saúde gonadal após hipertermia testicular, em animais que foram posteriormente tratados com o fármaco, tais como: incremento da cinética, menor número de defeitos, menor peroxidação lipídica e menor ativação de vias apoptóticas de células espermáticas. Houve, ainda, a inibição da expressão de genes envolvidos no mecanismo de apoptose no parênquima testicular, além de menores danos histológicos.

Algumas pesquisas foram realizadas visando minimizar os efeitos da DT na fertilidade, por meio da adoção de algumas estratégias de manejo de cobertura/inseminações e do processamento do sêmen (Hinrichs e Choi, 2000; Varner et al., 2008; Mari et al., 2011; Varner et al., 2011; 2016).

Éguas a serem inseminadas com o sêmen de garanhões com DT devem ser examinadas em curtos intervalos (a cada 2-6 horas) a fim de se identificar o momento mais próximo da ovulação, uma vez que a longevidade desses espermatozoides é reduzida. Além disso, garanhões com baixa qualidade espermática podem ser beneficiados com técnicas avançadas de reprodução assistida, como pela injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Hinrichs e Choi, 2000).

Varner et al. (2008; 2011; 2016) avaliaram métodos de manipulação de sêmen para garanhões subfêrteis com baixa qualidade seminal, objetivando aumentar a fertilidade desses animais e aumentar suas vidas reprodutivas. Os métodos avaliados incluíram a centrifugação em gradiente de seleção



espermática, centrifugação com coloide no fundo do tubo e a inseminação na extremidade do corno uterino, próximo ao momento da ovulação. A seleção espermática se mostrou eficiente em remover espermatozoides com defeitos não compensatórios, prevenindo a competição com espermatozoides sadios. Entre os espermatozoides com morfologia anormal que foram eficientemente removidos estão os com defeitos em cabeça, peça intermediária e cauda. Além disso, a centrifugação com solução coloidal no fundo do tubo reduziu a compactação espermática e aumentou a qualidade do sêmen após esse processamento.

Mari et al. (2011) observaram que a utilização de gradiente de seleção espermática no processamento de ejaculados de garanhão subfertil-oligospérmico permitiu uma taxa de prenhez normal por ciclo em um programa de reprodução comercial.

### Considerações finais

Nas últimas décadas, alguns estudos avançaram o conhecimento a respeito da degeneração testicular em garanhões e técnicas menos invasivas foram desenvolvidas para diagnóstico e prognóstico desta condição. Dentre as técnicas que surgiram, destaca-se o uso da ultrassonografia em modo Doppler-espectral que permitiu a identificação na alteração do fluxo vascular para a gônada, auxiliando na predição dos danos ao testículo. A busca por marcadores moleculares também tem avançado e um possível candidato é o hormônio anti-Mülleriano. Além disso, terapias de suporte à espermatogênese têm sido desenvolvidas para minimizar os danos testiculares após insultos, tais como a suplementação oral com pentoxifilina, ácido docosahexanóico e L-carnitina.

### Referências

- Aitken RJ, Roman SD.** Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Long*, v.1, p.15-24, 2008.
- Alvarenga MA, Papa, FO.** Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. *Rev Bras Reprod Anim* (Suplemento), n.6, p.204-09, 2009.
- Amann RP.** A review of anatomy and physiology of the stallion. *J Equine Sci*, v. 1, p. 83-105, 1981a.
- Amann RP.** A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl*, v.2, p.37-58, 1981b.
- Amann RP.** Functional anatomy of the adult male, In: McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, E. and Varner, D.D. *Equine Reproduction*, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Philadelphia, London, p. 867-80 11, 2011.
- Ball BA.** Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review. *J Equine Vet Sci*, v.28, n.11, p.650-55, 2008.
- Biagiotti G, Vitali G, Cavallini G.** Dyspermia and testicular artery peak systolic velocity. *Arch Ital Urol Androl*, v.74, p.243-6, 2002.
- Birch SM.** A survey of testicular lesions in stallions. Tese de doutorado - Oklahoma State University, Stillwater, p. 128, 2008.
- Blanchard TL, Bretzlaff K, Varner DD.** Identifying testicular hypoplasia in large animals. *Vet Med*, v. 85, p. 405-08, 1990.
- Blanchard TL, Varner D.D.** Testicular Degeneration. In *Equine Reproduction*. McKinnon AO, Voss JL. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 855-60, 1993.
- Blanchard TL, Jorgensen JB, Varner DD, Forrest DW, Evans JW.** Clinical observations on changes in concentrations of hormones in plasma of two stallions with thermally-induced testicular degeneration. *J Equine Vet Sci*, v.16, n.5, p.195-201, 1996.
- Blanchard TL, Johnson L.** Increased germ cell degeneration and reduced germ cell:Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. *Theriogenology*, v.47, p.665-77, 1997.
- Blanchard T, Varner D, Johnson L, Roser JF, Hill J, Miller C.** Testicular and hormonal changes in stallions with thermally induced testicular degeneration. *J Reprod Fertil* (Supplement), v.56, p.51-9, 2000.
- Blanchard TL, Johnson L, Varner DD, Rigby S, Brinsko S, Love CC.** Low daily sperm output per ml of testis as a diagnostic criteria for testicular degeneration in stallions. *J Equine Vet Sci*, v.21, p.11-35, 2001.
- Brinsko SP, Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Day BC, Wilson ME.** Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology*, v. 63(5), p.1519-27, 2005.



- Carlsen E, Andersson AM, Petersen JH, Skakkebaek NE.** History of febrile illness and variation in semen quality. *Hum Reprod*, v.18, p.2089-92, 2003.
- Collingridge DR, Rockell S.** Pentoxifylline improves the oxygenation and radiation response of BA1112 rat rhabdomyosarcomas and EMT6 mouse mammary carcinomas. *Int J Cancer*, v.20, n.90, p.256-64, 2000.
- Coşkun NM, Hatipoğlu T, Özoğlu C, Korkmaz C, Akyol SN, Mıcılı SC, Arık G.S, Erdoğan D.** The Protective Effects of Acetyl L-Carnitine on Testis Gonadotoxicity Induced by Cisplatin in Rats, *Balk Med J*, v.30(2), p.235-41, 2013.
- Davis JR, Morris RN.** Effect of glucose on incorporation of L-lysine-UC 14 into testicular proteins. *Am J Physiol*, v.205, n.5, p.833-6, 1963.
- Dellmann HD, Brown EM.** Histologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- Edwards FJ.** Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.197-207, 2008.
- Ekerhovd E, Westlander G.** Testicular sonography in men with Klinefelter syndrome shows irregular echogenicity and blood flow of high resistance. *J Assist Reprod Genet*, v.19, p.517-22, 2002.
- Evans JW, Finley M.** GnRH therapy in a stallion of low fertility. *J Equine Vet Sci*, v.10, n.3, p.182-86, 1990.
- Fernandes CE, Dode MAN, Pereira D, Silva AEDF.** Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, v.70, n.9, p.1560-8, 2008.
- Gabaldi SH, Wolf A.** Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. *Cienc Agrar*, v.02, n.2, p.66-70, 2002.
- Galil KAA, Setchell BP.** Effects of local heating of the testis on testicular blood flow and testosterone secretion in the rat. *Int J Androl*, v.11(1), p.73-85, 1988.
- Gehlen H, Bartmann CP, Klug E, Schoon HA.** Azoospermia due to testicular degeneration in a breeding stallion. *J Equine Vet Sci*, v.21(3), p.137-39, 2001.
- Gibb Z, Lambourne SR, Quadrelli J, Smith ND, Aitken RJ.** L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biol Reprod*, v.93(4), p.104-1, 2015.
- Hinrichs K, Choi Y.** Assisted Reproductive techniques in the horse. *Clin Tech Equine Pract*, v.4, p.210-18, 2000.
- Humphrey JD, Ladds PW.** A quantitative histological study of changes in the bovine testis and epididymis associated with age. *Res Vet Sci*, v.19, p.135-41, 1975.
- Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J.** Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res*, v. 39, p. 697-705, 2005.
- Jee WH, Choe BY, Byun JY, Shinn KS, Hwang TK.** Resistive index of the intrascrotal artery in scrotal inflammatory disease. *Acta Radiol*, v.38, p.1026-30, 1997.
- Kim B, Park K, Rhee K.** Heat stress response of male germ cells. *Cell Mol Life Sci*, 70(15), 2623-36, 2013.
- Lagerlof N.** Infertility in male domestic animals. *Vet Med*, v.33, p.550-61, 1938.
- Lefort C, Thoumas D, Badachi Y, Gobet F, Pfister C, Dacher JN, Benozio M.** Ischemic orchitis: review of 5 cases diagnosed by color Doppler ultrasonography. *J Radiol*, v.82, p.839-42, 2001.
- Love CC, Garcia MC, Riera FR, Kenney RM.** Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *J Reprod Fertil* (Supplement), v.44, p.99-105, 1991.
- Love CC.** Ultrasonographic evaluation of the testis, epididymis, and spermatic cord of the stallion. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.1, p.167-82, 1992.
- Love CC, Kenney RM.** Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod*, v.60, p.615-20, 1999.
- Love CC.** Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, v.76, n.3, p.547-57, 2011.
- Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C.** Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intra-testicular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 140, p.1709-17, 1999.
- Mari G, Castagnetti C, Rizzato G, Mislei B, Iacono E, Merlo B.** Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Anim Reprod Sci*, v.



126, n 1-2, p. 96-100, 2011.

**Mieusset R, Casares PQ, Partida LS, Sowerbutts SF, Zupp JL, Setchell BP.** Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *J Reprod Fertil*, v. 94(2), p. 337-43, 1992.

**Moein MR; Khalili MA, Davoudi A.** The effect of oral administration of pentoxifylline on sperm motility of asthenozoospermic ejaculates from men with or without testicular varicocele. *J Reprod Med*, v. 3, p. 25-9, 2005.

**Morris L, Gibb Z.** Oral supplementation with L-carnitine improves stallion fertility. *J Equine Vet Sci*, n. 43, p. S82, 2016.

**Neuner P, Kosner G, Shauer E.** Pentoxifylline in vivo down regulates the release of IL1 $\beta$ , IL6, and Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$  by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*, v. 83, p. 262-67, 1994.

**Nouri M, Movassaghi S.** Protective effect of pentoxifylline on male Wistar rat testicular germ cell apoptosis induced by 3, 4-methylenedioxymethamphetamine. *Iran J Basic Med Sci*, v.19, n. 6, 646-52, 2016.

**Oliva A, Dotta A, Multigner L.** Pentoxifylline and antioxidants improve sperm quality in male patients with varicocele. *Fertil Steril*, v. 91, Suppl. 4, p.1536-9, 2009.

**Paul C, Teng S, Saunders PT.** A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod*, v. 80, p. 913-19, 2009.

**Perez-Crespo M, Pintado B, Gutierrez-Adan A.** Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev*, v. 75, p. 40-7, 2008.

**Pinggera GM, Mitterberger M, Bartsch G, Strasser H, Gradl J, Aigner F, Pallwein L, Frauscher F.** Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. *BJU Int*, v. 101, p.722-6, 2008.

**Pozor MA, Nolin M, Roser J, Runyon S, Macperson ML, Kelleman A.** Doppler indices of vascular impedance as indicators of testicular dysfunction in stallions. *J Equine Vet Sci*, v.34, p. 38-9, 2014.

**Pozor M, Conley AJ, Roser JF, Nolin M, Zambrano GL, Runyon SP, Kelleman AA, Macpherson ML.** Anti-Müllerian hormone as a biomarker for acute testicular degeneration caused by toxic insults to stallion testes. *Theriogenology*, v. 116, p. 95-102, 2018.

**Queiroz GCD, Oliveir VVG, Gueiros OG, Torres SM, Maia FCL, Tenorio BM, Silva JVA.** Effect of pentoxifylline on the regeneration of rat testicular germ cells after heat shock. *Anim Reprod*, v. 10, n. 1, p. 45-54, 2013.

**Ramires-Neto C, Monteiro GA, Delfiol DJZ, Farras MC, Dell'aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA.** The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. *Livest Sci*, v. 157(1), p. 358-63, 2013.

**Rieneck K, Diamant M, Haahr PM, Schönharting M, Bendtzen K.** In vitro immunomodulatory effects of pentoxifylline. *Immunol Lett*, v. 37, n. 2, p. 131-8, 1993.

**Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ.** Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod*, v. 65, p. 229-39, 2001.

**Roqueta-Rivera M, Stroud CK, Haschek WH, Akare SJ, Segre M, Brush RS, Agbaga MP, Anderson RE, Hess RA, Nakamura MT.** Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *J Lipid Res*, v. 51(2), p.360-7, 2010.

**Sancler-Silva.** Efeito da pentoxifilina na função testicular e produção espermática de equinos submetidos a estresse térmico escrotal. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, p. 141, 2017.

**Sancler-Silva YFR, Ball BA, Esteller-Vico A, Silva-Junior ER, Freitas-Dellaqua CP, Papa FO.** Sperm Quality of Stallions Treated With Pentoxifylline After Scrotal Heat Stress. *J Equine Vet Sci*, p. 66, v. 87, p. 87, 2018.

**Sancler-Silva YFR, Ball BA, Esteller-Vico A, Silva-Junior ER, Boakari YL, Ali HES, Papa FO.** Influence of scrotal heat stress on testicular morphometry, histology and gene expression in stallions treated with pentoxifylline. *J Equine Vet Sci*, v. 89, p.103042, 2020.

**Savas C, Dindar H, Bilgehan A, Ataoglu O, Yucesan S.** Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in testicular torsion. *Scand J Urol Nephrol*, v. 36(1), p. 65-70, 2002.

**Schill WB.** Therapy of idiopathic astheno- and oligozoospermia with pentoxifylline. *Fortschr Med*, v. 100, p. 696-700, 1982.

**Setchell BP, Thorburn GD.** The effect of artificial cryptorchidism on the testis and its blood flow in an



- Australian marsupial *Macropus eugenii*. *Comp Biochem Physiol*, v. 38, p. 705-08, 1970.
- Setchell B, Maddocks S, Brooks D.** Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill JD. New York: Raven Press, 1994.
- Setchell BP.** The Parkes lecture Heat and the testis. *J Reprod Fertil*, v. 114, p. 179-94, 1998.
- Shiner, K. A., Pickett, B. W., Juergens, T. D., & Nett, T. M.** Clinical approach to diagnosis and treatment of subfertile stallions: opinions. In *Proc Am Assoc Equine Pract*, Vol. 39, p. 149-57, 1993.
- Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H.** Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Int J Urol*, v. 19, p. 538-50, 2012.
- Silva DM, Holden SA, De Souza JC, Fair S.** In vitro addition of DHA and IGF-I increases the progressive motility of cryopreserved stallion semen. *Rev Agrogeoamb*, v. 11(2), p. 127-38, 2019.
- Stradaoli G, Sylla L, Zelli R, Chiodi P, Monaci M.** Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions. *Theriogenology*, v. 62(3-4), p. 761-77, 2004.
- Tarhan S, Gumus B, Gunduz I, Ayyildiz V, Goktan C.** Effect of varicocele on testicular artery blood flow in mendcolor Doppler investigation. *Scand J Urol Nephrol*, v. 37, p.38-42, 2003.
- Thompson JA, Love CC, Stich KL, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD.** A Bayesian approach to prediction of stallion daily sperm output. *Theriogenology*, v. 62, p. 1607-17, 2004.
- Turner RM.** Testicular Abnormalities. In: McKinnon, A.O.; VOSS, J.L. *Equine reproduction*. Philadelphia: Saunders. p. 715-45, 2003.
- Turner RM.** Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. *Clin Tech Equine Pract*, v. 6, p. 278-84, 2007.
- Turner, R.M.; Zeng, W.** The Emerging Pathophysiology of Age-related Testicular Degeneration with a Focus on the Stallion and an Update on Potential Therapies. *Reprod Domest Anim*, v. 47, n. 4, p. 178-86, 2012.
- VanDemark, N.L.; Ewing, L.L.** Factors affecting testicular metabolism and function. *J Reprod Fertil*, v. 6, n. 1, p. 1-8, 1963.
- Varner, D.D.; Love C.C.; Brinsko S.P.; Blanchard, T.L.; Hartman, D.L.** Semen Processing for the Subfertile Stallion. *J Equine Vet Sci*, v. 28, p. 677-85, 2008.
- Varner, D.D.; Love, C.C.; Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Hartman, D.L.; Bliss, S.B.** Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Anim Reprod Sci*, v. 126, p. 96-100, 2011.
- Varner, D. D.** Strategies for processing semen from subfertile stallions for cooled transport. *Vet Clin N Am Equine Pract*, v. 32(3), p. 547-560, 2016.
- Vogler, C.J.; Saacke, R.G.; Bame, J.H.; Dejarnette, J.M.; McGilliard, M.L.** Effects of Scrotal Insulation on Viability Characteristics of Cryopreserved Bovine Semen. *J Dairy Sci*, v. 74, n. 11, p. 3827-35, 1991.
- Waites, G. M. H.; Moule, G. R.** Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. *J Reprod Fertil*, v. 2(3), p. 213-224, 1961.
- Ward, A.; Clissold, S.P.** Pentoxifylline. *Drugs*, v. 34, n. 1, p 50-97, 1987.
- Watson, E.D.; Clarke, C.J.; Else, R.W.; Dixon, P.M.** Testicular degeneration in 3 stallions. *Equine Vet J*, v. 26, p. 507-10, 1994.
- Yaeram, J.; Setchell, B.P.; Maddocks, S.** Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev*, v. 18, p. 647-53, 2006.
- Yao, C.; Li, G.; Qian, Y.; Cai, M.; Yin, H.; Xiao, L.; Tang, W.; Guo, F.; Shi, B.** Protection of pentoxifylline against testis injury induced by intermittent hypobaric hypoxia. *Oxid Med Cell Longev*, p. 1-9, 2016.
- Yin, Y.; DeWolf, W.C.; Morgentaler, A.** Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol Reprod*, v. 58, p. 492-6, 1998.
- Zararsiz, I.; Kus, I.; Davarci, M.; Kus, M. A.; Kaman, D.; Sarsilmaz, M.** The protective effects of omega-3 fatty acids on rat testicular tissue. *Dicle Medical Journal*, v. 38(4), p. 382-6, 2011.