

PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE RATOS ADULTOS APÓS LESÃO MÚSCULO-ESQUELÉTICA

MALE ADULT RAT SPERM PARAMETERS AFTER SKELETAL MUSCLE INJURY

PARÁMETROS ESPERMÁTICOS DE RATAS ADULTAS DESPUÉS DE LESIÓN MÚSCULO-ESQUELÉTICA



ARTIGO ORIGINAL
ORIGINAL ARTICLE
ARTÍCULO ORIGINAL

Macon Borges Moraes¹
(Profissional de Educação Física)

Cassio Noronha Martins¹
(Fisioterapeuta)

Melina Hauck¹
(Fisioterapeuta)

Douglas Dalcin Rossato³
(Fisioterapeuta)

Carine Dhal Corcini⁴
(Médica veterinária)

Antonio Sergio Varela Junior¹
(Médico veterinário)

Luis Ulisses Signori²
(Fisioterapeuta)

1. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

2. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

3. Universidade Franciscana (UFN), Santa Maria, RS, Brasil.

4. Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

Correspondência:

Luis Ulisses Signori.
Centro de Ciências da Saúde,
Curso de Fisioterapia, Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM).
Av. Roraima, 1000, Cidade
Universitária, Bairro Camobi,
Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900.
l.signori@hotmail.com

RESUMO

Introdução: As lesões músculo-esqueléticas estimulam uma resposta inflamatória sistêmica que pode interferir na reprodução das espécies. **Objetivo:** Avaliar os efeitos causados pelas lesões músculo-esqueléticas sobre a resposta inflamatória e os parâmetros espermáticos de ratos machos adultos. **Métodos:** O grupo da amostra foi composto por 30 ratos Wistar uniformemente distribuídos nos grupos controle e grupo lesionado. A lesão muscular foi induzida por meio de contusão, causada ao se soltar um peso de 200 g de uma altura de 30 cm sobre o músculo gastrocnêmio. Foram coletadas amostras de sangue (hemograma completo e marcadores de danos e inflamação muscular), músculo (estresse oxidativo) e gônadas (parâmetros espermáticos) 72 horas após a lesão. **Resultados:** A lesão muscular aumentou os monócitos, creatina quinase, proteína C-reativa, concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e lipoperoxidação. Por outro lado, a lesão reduziu a capacidade antioxidante contra os radicais peróxido (ACAP), a integridade da membrana (36%) e o acrossoma espermático (33%). A integridade da membrana e o acrossoma ($p < 0,05$) se correlacionaram diretamente com ACAP ($\rho = 0,602$; $\rho = 0,513$ respectivamente) e inversamente com os monócitos ($\rho = -0,703$; $\rho = -0,635$, respectivamente), creatina quinase ($\rho = -0,450$; $\rho = -0,603$), proteína C-reativa ($\rho = -0,511$; $\rho = -0,703$) e parâmetros de estresse oxidativo (ROS $\rho = -0,703$; $\rho = -0,635$; lipoperoxidação $\rho = -0,494$; $\rho = -0,559$). **Conclusão:** A resposta inflamatória sistêmica aguda decorrente da lesão músculo-esquelética interfere nas organelas das células reprodutivas masculinas (membrana e acrossoma). **Nível de evidência V; Estudo experimental.**

Descritores: Reprodução; Espermatozoides; Músculo esquelético; Inflamação; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Skeletal muscle injuries stimulate a systemic inflammatory response which may interfere in species reproduction. **Objective:** To evaluate the effects caused by skeletal muscle injuries on the inflammatory response and sperm parameters of male adult rats. **Methods:** The sample group was composed of 30 Wistar rats distributed evenly across control and injury groups. Muscle injury was induced by bruising, caused by the release of a 200 g weight from a height of 30 cm onto the gastrocnemius muscle. Blood (CBC and damage/muscle inflammation markers), muscle (oxidative stress) and gonad (sperm parameters) samples were collected 72h after the injury. **Results:** The muscle injury increased monocytes, creatine kinase, C-reactive protein, reactive oxygen species (ROS) concentration and lipid peroxidation. In contrast, the injury reduced antioxidant capacity against peroxyl radicals (ACAP), membrane integrity (36%) and sperm acrosome (33%). Membrane integrity and acrosome ($p < 0.05$) correlate directly with ACAP ($\rho = 0.602$; $\rho = 0.513$ respectively) and inversely with monocytes ($\rho = -0.703$; $\rho = -0.635$, respectively), creatine kinase ($\rho = -0.450$; $\rho = -0.603$), C-reactive protein ($\rho = -0.511$; $\rho = -0.703$) and parameters of oxidative stress (ROS $\rho = -0.703$; $\rho = -0.635$; lipid peroxidation $\rho = -0.494$; $\rho = -0.559$). **Conclusion:** The acute systemic inflammatory response arising from skeletal muscle injury interferes in the male reproductive cell organelles (membrane and acrosome). **Level of Evidence V; Experimental study.**

Keywords: Reproduction; Spermatozoa; Muscle, skeletal; Inflammation; Oxidative Stress.

RESUMEN

Introducción: Las lesiones músculo-esqueléticas estimulan una respuesta inflamatoria sistémica que puede interferir en la reproducción de las especies. **Objetivo:** Evaluar los efectos causados por las lesiones músculo-esqueléticas sobre la respuesta inflamatoria y los parámetros espermáticos de ratas macho adultas. **Métodos:** El grupo de la muestra fue compuesto por 30 ratas Wistar distribuidas uniformemente en los grupos control y grupo lesionado. La lesión muscular fue inducida por medio de contusión, causada al soltarse un peso de 200 g desde una altura de 30 cm sobre el músculo gastrocnemio. Fueron colectadas muestras de sangre (hemograma completo y marcadores de daños e inflamación muscular), músculo (estrés oxidativo) y gônadas (parámetros espermáticos) 72 horas después de la lesión. **Resultados:** La lesión muscular aumentó los monocitos, creatina quinasa, proteína C reactiva, concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipoperoxidación. Por otro lado, la lesión redujo la capacidad antioxidante contra los radicales peróxido (ACAP), la integridad de la membrana (36%) y el acrosoma espermático (33%). La integridad de la membrana y el acrosoma ($p < 0,05$) se correlacionan directamente con ACAP ($\rho = 0,602$; $\rho = 0,513$ respectivamente) e inversamente con los monocitos ($\rho = -0,703$; $\rho = -0,635$, respectivamente), creatina quinasa ($\rho = -0,450$, $\rho = -0,603$), proteína C reactiva ($\rho = -0,511$; $\rho = -0,703$) y parámetros de estrés oxidativo (ROS $\rho = -0,703$; $\rho = -0,635$; lipoperoxidación $\rho = -0,494$; $\rho = -0,559$). **Conclusión:** La respuesta inflamatoria sistémica aguda proveniente de la lesión músculo-esquelética interfiere en los orgánulos de las células reproductivas masculinas (membrana y acrosoma). **Nivel de evidencia V; Estudio experimental.**

Descritores: Reproducción; Espermatozoides; Músculo esquelético; Inflamación; Estrés oxidativo.



INTRODUÇÃO

A sinalização da testosterona presente sobre as espermatogônias nos túbulos seminíferos, em sincronia com a atividade parácrina de diferentes substâncias, promove a proliferação e diferenciação dos espermatozoides¹. A espermatogênese difere do desenvolvimento de outras células pela ocorrência de meiose, remodelamento da cromatina e a formação de estruturas especializadas, como o acrossomo e o flagelo^{2,3}. No epidídimo, essas células amadurecem e são subsequentemente impulsionadas pelo ducto deferente, onde são banhadas pelo plasma seminal, que é caracterizado por intensa atividade antioxidante. No entanto, esse processo pode sofrer alterações em seus mecanismos como resultado de um processo inflamatório, resultando em um desequilíbrio nos parâmetros do estresse oxidativo (EO) dessa região e consequentemente disfunção e diminuição da capacidade de fertilização⁴⁻⁹.

A fase inflamatória das lesões musculoesqueléticas geralmente ocorre nos três primeiros dias, desencadeando uma série de eventos físicos e químicos que promovem a reparação tecidual¹⁰. Esse processo ativa leucócitos circulantes¹¹, aumenta a permeabilidade vascular, a quimiotaxia e a diapedese dos leucócitos para o tecido lesado^{10,12}, com consequente aumento na concentração das espécies reativas de oxigênio (ERO) e a lipoperoxidação (LPO). Os danos musculares são geralmente observados sistemicamente pelo aumento nas concentrações plasmáticas da creatina quinase (CK), da lactato desidrogenase (LDH)^{13,14} e de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa (PCR)¹⁵.

Mudanças na capacidade de fertilização pode ocorrer como resultado de efeitos sistêmicos, onde o EO resultante é apontado como um fator no cenário da infertilidade⁴⁻⁹. Concentrações excessivas de ERO podem causar deficiência de esperma durante a espermatogênese e/ou através do ducto deferente. A fase inflamatória das lesões musculoesqueléticas pode causar efeitos sistêmicos, como resultado de um estado de EO, causado pela liberação de mediadores inflamatórios e da leucocitose^{10,12,13,16}, o que podem interferir na estrutura e na função dos espermatozoides. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da lesão musculoesquelética sobre a resposta inflamatória e parâmetros espermáticos de ratos adultos.

MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

O estudo utilizou ratos Wistar adultos, machos, com 30 semanas de vida e peso entre 300 e 400g. Os animais foram mantidos em gaiolas com três animais em ciclos claro/escuro de 12h com a temperatura entre 21°C e 24°C. Comida e água foram dadas *ad libitum* durante todo o protocolo experimental. A amostra foi estimada em 30 animais para o estudo.¹⁶ O cálculo amostral se baseou nos resultados da CK e teve uma taxa de detecção de 90% para uma diferença entre médias de 100% e desvio padrão de 110% para $\alpha=0,05$. Após a anestesia, os animais foram randomizados em Grupo Controle (GC, n = 15) e Grupo Lesão (GL, n=15).

Protocolo de lesão

O músculo gastrocnêmio direito foi lesado por esmagamento mecânico¹⁶. Antes do procedimento, todos os animais foram tricotomizados para melhor exposição muscular e, anestesiados com injeções intraperitoneais de cloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg). Em seguida, os animais foram colocados na base do equipamento em decúbito ventral para o máximo de extensão do joelho e tornozelo. A lesão foi induzida por uma massa de metal (200g) liberada a partir de uma altura de 30cm.¹⁶ Os ratos do GC foram anestesiados e manipulados da mesma maneira, mas sem indução de lesão. Nenhuma fratura óssea foi verificada no momento da lesão ou após protocolo experimental e dissecação.

AMOSTRA DE TECIDO

Os animais foram eutanasiados por decapitação 72h após o protocolo de lesão e foram coletados sangue, músculo, gônadas e epidídimo. O sangue foi coletado em vacutainer heparinizados e centrifugado a 3000xg por 15min a 4°C para separar as células sanguíneas do plasma, as quais foram transferidas para microtúbulos que foram armazenados em Ultrafreezer -80°C até as análises. Para avaliação dos parâmetros seminais, o epidídimo e uma porção de ducto deferente foram coletados. Para facilitar a saída dos espermatozoides, o tecido foi imerso em 1mL em meio M2 e interrompido com o auxílio de uma agulha (18G) em 24 placas de cultura estéreis. A avaliação da qualidade espermática foi realizada após incubação das amostras por 10min a 37 °C¹⁷.

Avaliação dos hemogramas, marcadores de inflamação, dano muscular e parâmetros do estresse oxidativo

As contagens de eritrócitos e leucócitos totais foram realizadas em um contador automático de células veterinárias (Sysmex®, modelo pocH-100iV Diff). O diferencial leucocitário foi obtido a partir da confecção de esfregaços sanguíneos frescos, os quais foram corados para análises microscópicas posteriores¹¹. As atividades plasmáticas de CK e LDH, bem como, a concentração plasmática de PCR foram espectrofotometricamente determinadas.¹⁶

A concentração total das ERO e a capacidade antioxidante contra os radicais peroxil (ACAP) foram determinadas usando um meio reacional contendo (30 mM HEPES, 200mM KCl e 1 mM MgCl₂ ajustado para pH 7,2). Para a análise das ERO, foi utilizado o diacetato de 2'-diclorofluoresceína (H₂DCF-DA; Invitrogen TM) numa concentração final de 40µM. A produção total de fluorescência foi calculada integrando as unidades de fluorescência (UF) ao longo do tempo e os resultados foram expressos como ERO=área relativa. A análise de ACAP usou o dicloridrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (20mM ABAP; Aldrich TM) como um gerador das ERO após a decomposição térmica a 37°C usando 488nm (absorção) em 60min e os resultados foram expressos como 1/(área relativa com/sem ABAP).¹⁸

O ensaio Fox (ferrous oxidation/xylenol orange method) foi realizado para medir a lipoperoxidação (LPO)¹⁶. Os tecidos congelados foram homogeneizados em metanol (5:1) e centrifugados a 1000xg durante 10min a 4°C. A lipoperoxidação foi determinada utilizando um meio reacional contendo 1mM de FeSO₄, 0,25 M de H₂SO₄ e 1mM de xilenol laranja. A absorbância foi medida a 550nm em um leitor de microplacas após 4h de incubação a 37°C. O cumeno-hidroperóxido (1,75nM) foi empregado como padrão. Os valores da LPO foram expressos em nmoles CHP/g de tecido.

Análise dos parâmetros espermáticos

A motilidade espermática total foi avaliada em uma alíquota de 10µL de sêmen através de uma ampliação de 200x em um microscópio óptico aquecido de campo claro (Olympus BX41-PH-III, SP, Brasil). A motilidade foi determinada pela porcentagem de células móveis identificadas em três campos distintos do microscópio com escala de 0 a 100%¹⁷.

A integridade da membrana foi avaliada por probes fluorescentes de diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio (IP)¹⁹. A avaliação foi realizada com um microscópio de epifluorescência com uma ampliação de 400x (Olympus BX 51, SP, Brasil). Após 200 espermatozoides por lâmina, os espermatozoides com fluorescência verde foram considerados intactos.

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada usando Rodamina 123 juntamente com probe IP. Duzentas células foram analisadas com uma ampliação microscópica de epifluorescência de 400x (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP, Brasil). As células que apresentavam a peça intermediária com intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias funcionais, células que apresentavam fluorescência verde opaca foram consideradas não funcionais²⁰.

A avaliação da integridade do acrossoma foi baseada na técnica previamente descrita²¹ com modificações. Inicialmente, 20µL de sêmen foram adicionados e uma lâmina de esfregaço. Após a secagem, uma alíquota IP 20µL foi adicionada e depois seca. As lâminas foram submersas em álcool etílico absoluto a 95,55% (Sigma Chemical Company, MO, EUA) por 5min e depois lavadas em PBS. Em uma sala escura, 20µL de Lectina do *Arachishypogaea* FITC Conjugate (20mg/mL) (Sigma Chemical Company, MO, EUA) foi adicionada às amostras por 10min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água desionizada e drenadas. As lâminas foram examinadas com um microscópio de epifluorescência por imersão com uma ampliação de 1000x (Olympus BX 51, SP, Brasil). Após 200 espermatozoides por lâmina foram contados, onde as células com fluorescência verde no acrossoma foram consideradas com acrossomas integras.

A avaliação da morfologia espermática consistiu na verificação de todas as alterações do espermatozoide: acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda. Para este propósito, uma dupla coloração foi realizada por eosina e nigrosina, adicionando uma gota da solução de coloração de 10µL em uma gota de sêmen de 10µL. Após 1min, alguns esfregaços foram feitos e, quando secos, uma contagem de 200 células foi realizada em microscópio óptico com contraste de fase em imersão (Olympus BX41-PH-III, SP, Brasil).²²

A integridade do DNA foi verificada por probe laranja de acridina, sendo as avaliações realizadas por um microscópio de epifluorescência com aumento de 400x. Duzentos espermatozoides foram avaliados por amostra. As células que apresentaram fluorescência verde foram consideradas com DNA normal (fita dupla), enquanto células vermelhas ou laranja foram consideradas com DNA desnaturado (monocatenário).²³

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande (CEUA / FURG # P034 / 2012 aditivo 002/2013).

Análise estatística

As variáveis contínuas estão apresentadas como médias (X) ± desvio padrão (DP). Todas as variáveis contínuas foram testadas para distribuição normal com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados da distribuição normal foram comparados por "t" e os de distribuição não paramétrica pelo teste de Mann Whitney. As correlações de Pearson (r) e Spearman (p) foram aplicadas quando apropriadas. p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Os resultados dos parâmetros hematológicos nos grupos controle e lesão 72h após a aplicação do protocolo são apresentados na Tabela 1. O hematócrito, os eritrócitos, a hemoglobina, as plaquetas e as proteínas plasmáticas totais foram semelhantes entre os grupos. Os animais submetidos ao protocolo de lesão aumentaram em 17% os leucócitos totais (p=0,013). Este resultado ocorreu pelo aumento dos neutrófilos

Tabela 1. Variáveis hematológicas ao final do protocolo experimental.

Variáveis hematológicas	Unidade	Grupo Controle (n=15) X ± DP	Grupo Lesão (n=15) X ± DP	p
Hematócrito	%	46,1 ± 1,6	46,1 ± 1,5	0,764
Eritrócitos	x10 ⁵ /mm ³	8,82 ± 0,39	8,84 ± 0,35	0,878
Hemoglobina	g/dL	15,7 ± 0,6	15,8 ± 0,5	0,766
Plaquetas	x10 ³ /mm ³	661 ± 109	611 ± 125	0,301
PPT	g/dL	6,62 ± 0,31	6,64 ± 0,26	0,846
Leucócitos totais	x10 ³ /mm ³	5710 ± 1042	6667 ± 961	0,013
Neutrófilos	x10 ³ /mm ³	1254 ± 649	1876 ± 735	0,021
Monócitos	x10 ³ /mm ³	77 ± 44	202 ± 99	<0,001
Eosinófilos	x10 ³ /mm ³	134 ± 94	141 ± 103	0,842
Linfócitos	x10 ³ /mm ³	4245 ± 936	4451 ± 865	0,536

Dados apresentados em média (X) ± desvio padrão (DP). PPT: Proteínas Plasmáticas Totais.

(p=0,02) e dos monócitos (p<0,001), que apresentaram um aumento relativo de 50% e 160%, respectivamente. Eosinófilos, linfócitos e basófilos (<1%, dados não apresentados) foram semelhantes entre os grupos.

Os resultados dos parâmetros EO e as concentrações plasmáticas dos marcadores inflamatórios musculares são mostrados na Figura 1. O GL mostrou um aumento nas concentrações das ERO (p<0,001, Figura 1A), da LPO (p<0,001, Figura 1B) e uma redução na ACAP (p<0,001, Figura 1C) em relação ao GC. As lesões musculoesqueléticas aumentaram em 45% os níveis plasmáticos da CK (p<0,001, Figura 1D) e 82% em relação ao

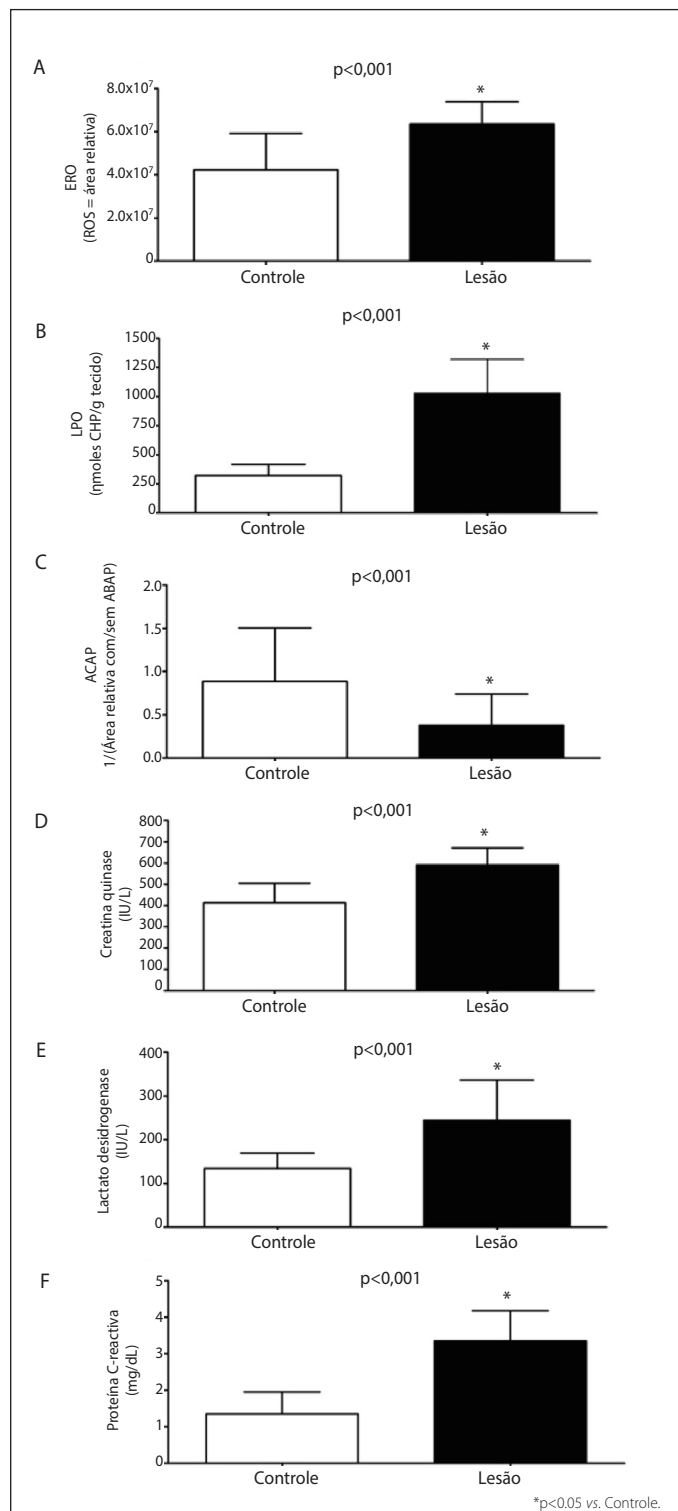


Figura 1. Parâmetros do estresse oxidativo, dano e inflamação muscular. Os dados estão apresentados na forma de média ± desvio padrão (DP). ERO: espécies reativas de oxigênio; LPO: liperoxidação; ACAP: capacidade antioxidante contra radicais peroxil. *p<0,05 vs. Controle.

Tabela 2. Parâmetros espermáticos.

Variáveis	Unidade	Grupo Controle (n=15) X ± DP	Grupo Lesion (n=15) X ± DP	p
Motilidade (%)	%	85,6 ± 9,6	85 ± 7,3	0,838
Membrana (%)	%	66,8 ± 27,4	31,2 ± 29,4	0,002
Mitocôndria (%)	%	84,1 ± 9,2	79,9 ± 22,2	0,491
Acrossoma (%)	%	83,9 ± 17,7	51,2 ± 18,5	0,001
Morfologia (%)	%	95,7 ± 4,1	97,6 ± 1,5	0,091
DNA (%)	%	98,2 ± 4,3	99,1 ± 3,5	0,562

Dados apresentados em média (X) ± Desvio Padrão (DP). DNA: Ácido desoxirribonucleico.

LDH ($p < 0,001$, Figura 1E) em relação ao GC. No GL a PCR ultrasensível dobrou ($p < 0,001$, Figura 1F) os valores em relação ao GC.

As variáveis de parâmetros espermáticos 72h após o protocolo experimental são apresentados na Tabela 2. Os parâmetros da motilidade, morfologia espermática, função mitocondrial e a integridade do DNA foram semelhantes entre os grupos. O GL apresentou redução na integridade da membrana ($p = 0,002$) e no acrossoma ($p < 0,001$) em relação ao GC.

O peso dos animais foi semelhante entre os grupos ao final do estudo ($p = 0,208$, GC: 363 ± 23 g vs. GL: 353 ± 24 g). A concentração das ERO se correlacionou negativamente com a integridade da membrana (Figura 2A) e com o acrossomo (Figura 2B). O LPO também apresentou esse comportamento (Figura 2C e 2D) em relação aos parâmetros espermáticos. A ACAP se correlacionou positivamente com as alterações na integridade da membrana (Figura 2E) e com o acrossomo (Figura 2F). A CK (Figura 2G e Figura 2H), a PCR (Figura 2I e Figura 2J) e os monócitos (Figura 2K e Figura 2L) se correlacionaram inversamente com a integridade da membrana e o acrossoma.

DISCUSSÃO

A principal descoberta do estudo é que lesões musculoesqueléticas interferem nos parâmetros espermáticos (redução da integridade da membrana e acrossoma). Essas alterações estão relacionadas aos parâmetros do EO, marcadores plasmáticos de dano muscular e inflamação sistêmica. Alterações nas concentrações hematológicas dos leucócitos e dos marcadores plasmáticos de lesão muscular 72h após o protocolo de lesão já foram demonstrados em estudos prévios^{11,16}. Essas alterações ocorrem devido à rápida necrose das miofibrilas e à produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam a resposta imune inata²⁴. A neutrofilia ocorre imediatamente após a lesão com essas células migrando para o tecido danificado²⁵, onde desempenham um papel essencial no reparo, pois estimulam a produção das ERO e a liberação de citocinas que estimulam proteases específicas que facilitam a fagocitose e o recrutamento dos monócitos circulantes²⁶. Os monócitos, por sua vez, também migram para o tecido lesado, onde se diferenciam em macrófagos (aumentando a concentração dessas células já residentes no tecido) e realizam a fagocitose das miofibrilas danificadas^{25,26}, onde eventualmente fagocitam as células danificadas viáveis, causando um dano muscular secundário²⁶.

A CK e a LDH são biomarcadores de danos musculares que aumentam em resposta a lesão primária (estrutura muscular comprometida diretamente pelo trauma) e os efeitos do EO, demonstrados pelo aumento excessivo na geração de ERO^{14,16,27}, redução da ACAP e o aumento da LPO16, com danos resultantes às estruturas macromoleculares. A interação desses mecanismos resulta na lipoperoxidação ou dano a membrana do miócito, causando o vazamento das enzimas metabólicas mitocondriais e sarcoplasmáticas para o sangue¹⁴. A PCR é um marcador inflamatório inespecífico de fase aguda; nos hepatócitos²⁸, sua produção é estimulada pela IL-6. Já no tecido adiposo e nas células sanguíneas mononucleares, sua produção é estimulada pelo TNF- α e IL-1 β ¹⁵. Esses mecanismos explicam em parte, a correlação desses marcadores com as alterações no acrossoma e na membrana espermática encontradas no presente estudo.

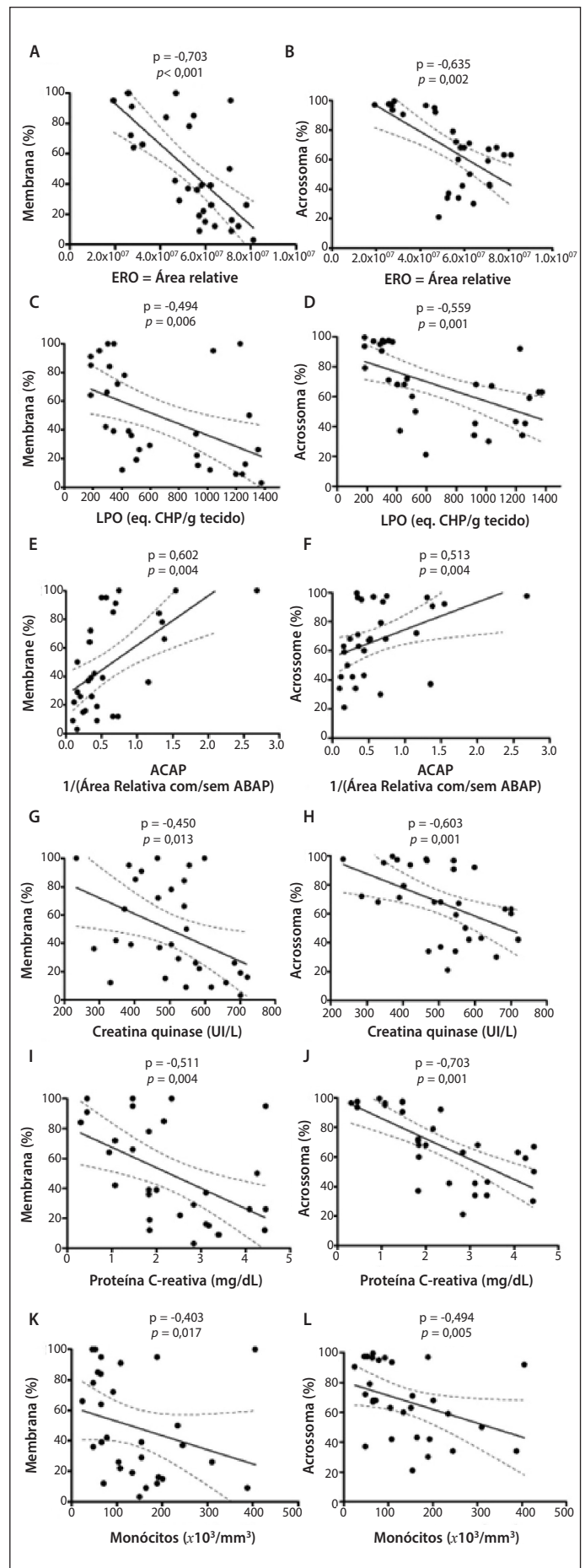


Figura 2. Correlações entre os parâmetros espermáticos e os marcadores de estresse oxidativo, inflamatórios e a leucocitose. ERO: Espécies Reativas de Oxigênio; LPO: Lipoperoxidação; ACAP: Capacidade antioxidante contra radicais peroxyl.

A inflamação sistêmica exerce efeitos inibitórios sobre a espermatogênese devido à ação de citocinas inflamatórias e das ERO sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-Leydig, eixos circulares e no epitélio seminífero interferindo na capacidade de fertilização⁴. Esses efeitos podem ser mais pronunciados no epitélio seminífero durante as fases VIII-IX, pela sensibilidade específica desse estágio e pela ação de mediadores inflamatórios na atividade das células de Sertoli, inibindo a expressão de proteínas essenciais à estrutura do espermatozóide⁵. A inflamação sistêmica aumenta a expressão de IL-6, que interage com o TNF- α e diminui a secreção de testosterona pelas células de Leydig e células de Sertoli interferindo na sinalização da espermatogênese⁶. A fase de citocinas inflamatórias também modula a expressão da ciclooxigenase-2 e das prostaglandina pelas células de Leydig e Sertoli, interferindo na produção de andrógenos e na captação da glicose por essas células, afetando a sinalização e o metabolismo energético do processo espermatogênico⁷. Dessa forma, as disfunções nessa fase podem ser atribuídas à alta produção de genes relacionados à inflamação presentes na circulação sistêmica e, portanto, nos testículos e epidídimos, exercendo efeitos adversos sobre o desenvolvimento e o amadurecimento dos espermatozoides⁸. Neste estudo, a inflamação sistêmica resultou da interação de diferentes mecanismos avaliados alterando assim a qualidade da membrana e do acrossomo.

Modificações desses parâmetros espermáticos e a interação com as moléculas avaliadas também ocorrem devido ao alto grau de conformação desses marcadores em seus sítios de ligação com essas moléculas que possuem cisteínas altamente reativas quando na presença de EO¹⁵. Esse estado está potencialmente presente nos órgãos reprodutivos, onde os leucócitos e os espermatozoides são considerados os principais produtores das ERO nesse local^{2,3}. Em contraste com os efeitos da ERO, o plasma seminal possui sistemas antioxidantes que mantêm a funcionalidade dos espermatozoides⁹. No presente estudo, esse equilíbrio foi possivelmente afetado pelo aumento das concentrações de ERO no epidídimo, como resultado da interação

da inflamação sistêmica no local, que pode causar danos à membrana espermática via lipoperoxidação. No entanto, essas células são incapazes de restaurar sua membrana após o dano²⁹. O EO também ativa a sinalização da proteína quinase C, resultando em uma disfunção na atividade dos canais de Ca²⁺, gerando acrossomas prematuros e/ou exocitose³⁰. Nesse contexto, a ação sistêmica dos marcadores inflamatórios e a otimização das concentrações das ERO no tecido, podem levar a um desequilíbrio entre os sistemas oxidante/antioxidante que afetam a estrutura espermática, com possível comprometimento de sua capacidade de fertilização.

A ausência de medidas das temperaturas centrais e periféricas, bem como, as avaliações dos níveis de cortisol, testosterona e interleucina plasmática (IL-6 e TNF α) são limitações deste estudo. As medidas do sistema gonadal também contribuem para uma melhor compreensão dos resultados encontrados.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que a fase inflamatória das lesões musculoesqueléticas por contusão provoca um estado de estresse oxidativo muscular e leucocitose, aumenta os marcadores de inflamação sistêmica e o dano muscular, bem como, reduz as variáveis espermáticas. A integridade da membrana e do acrossoma espermático estão diminuídas, e essas medidas estão relacionadas a parâmetros do estresse oxidativo, aos marcadores plasmáticos de dano muscular e a inflamação sistêmica.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) por sua colaboração com o processamento e análise de dados.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES: Cada autor contribuiu individual e significativamente para o desenvolvimento deste manuscrito. MBM (0000-0001-5085-7414)*, CNM (0000-0002-2344-6844)*, MH (0000-0001-9202-7574)* e DDR (0000-0003-2724-7567)* treinaram os animais e foram os principais contribuidores na redação do manuscrito. MBM, CDC (0000-0001-5683-7801)*, ASVJ (0000-0003-4901-5118)* e LUS (0000-0001-7784-9940)* estabeleceram as diretrizes para o trabalho e participaram das análises, discussão de resultados e elaboração do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito e concordaram em assumir a responsabilidade por todos os aspectos do estudo. *ORCID (*Open Researcher and Contributor ID*).

REFERÊNCIAS

- Riffell JA, Krug PJ, Zimmer RK. The ecological and evolutionary consequences of sperm chemoattraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4501-6.
- Gan H, Cai T, Lin X, Wu Y, Wang X, Yang F, et al. Integrative proteomic and transcriptomic analyses reveal multiple post-transcriptional regulatory mechanisms of mouse spermatogenesis. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(5):1144-57.
- Paronetto MP, Messina V, Barchi M, Geremia R, Richard S, Sette C. Sam68 marks the transcriptionally active stages of spermatogenesis and modulates alternative splicing in male germ cells. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(12):4961-74.
- Meinhardt A, Hedger MP. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;335(1):60-8.
- Liew SH, Meachem SJ, Hedger MP. A stereological analysis of the response of spermatogenesis to an acute inflammatory episode in adult rats. *J Androl*. 2007;28(1):176-85.
- Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E, et al. Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *Eur Cytokine Netw*. 2005;16(2):167-72.
- Frungieri MB, Calandra RS, Mayerhofer A, Matzkin ME. Cyclooxygenase and prostaglandins in somatic cell populations of the testis. *Reproduction*. 2015;149(4):R169-80.
- Hedger MP. Toll-like receptors and signalling in spermatogenesis and testicular responses to inflammation - a perspective. *J Reprod Immunol*. 2011;88(2):130-41.
- Nenkova G, Alexandrova A. A review: oxidative stress and its role in reproduction. *Adv Biosci Biotechnol*. 2013;4(1):37-43.
- Järvinen TA, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745-64.
- Signori LU, Costa ST, Neto AF, Pizzolotto RM, Beck C, Sbruzzi G, et al. Haematological effect of pulsed ultrasound in acute muscular inflammation in rats. *Physiotherapy*. The Chartered Society of Physiotherapy. 2011;97(2):163-9.
- Urso ML. Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? *J Appl Physiol*. 2013;115(6):920-8.
- Souza JD, Gottfried C. Muscle injury: review of experimental models. *Electromyogr Kinesiol*. 2013;23(6):1253-60.
- Pierce A, de Waal E, McManus LM, Shireman PK, Chaudhuri AR. Oxidation and structural perturbation of redox-sensitive enzymes in injured skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(12):1584-93.
- Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3(1):118-27.
- Martins CN, Moraes MB, Hauck M, Guerreiro LF, Rossato DD, Varela AS Jr, et al. Effects of cryotherapy combined with therapeutic ultrasound on oxidative stress and tissue damage after musculoskeletal contusion in rats. *Physiotherapy*. 2016;102(4):377-83.
- Aral F, Karaçal F, Baba F. The effect of enrofloxacin on sperm quality in male mice. *Res Vet Sci*. 2008;84(1):95-9.
- Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JL, et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ*. 2009;407(6):2115-23.
- Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane mammalian spermatozoa integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1990;88(1):343-52.
- Grasa P, Pérez-Pé R, Báquena O, Forcada F, Abecia A, Cebrían-Pérez JA, et al. Ram sperm selection by a dextran / swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J Androl*. 2004;25(6):982-90.
- Kawamoto A, Ohashi K, Kishikawa H, Zhu LQ, Azuma C, Murata Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. *Fertil Steril*. 1999;71(3):497-501.
- Juliano F, Serret CG, Schneider A, Rabassa VR, Nogueira CE, Vidor T, et al. Effect of pigpel extender on the boar semen quality stored at different temperatures. *Semin Ciências Agrárias*. 2009;30(4):899-906.
- Håkonsen LB, Spano M, Bonde JP, Olsen J, Thulstrup AM, Ernst E, et al. Exposures that may affect sperm DNA integrity: two decades of follow-up in a pregnancy cohort. *Reprod Toxicol*. 2012;33(3):316-21.
- Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:491497.
- Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(5):R1173-87.
- Lockhart NC, Brooks SV. Neutrophil accumulation following passive stretches contributes to adaptations that reduce contraction-induced skeletal muscle injury in mice. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104:1109-15.
- Carvalho N, Puntel G, Correa P, Gubert P, Amaral G, Morais J, et al. Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats. *J Sports Sci*. 2010;28(9):923-35.
- Michigan A, Johnson TV, Master VA. Review of the relationship between C-reactive protein and exercise. *Mol Diagn Ther*. 2011;15(5):265-75.
- den Daas N. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci*. 1992;28(1-4):87-94.
- Cardoso TF, Varela AS Jr, Silva EF, Vilela J, Hartmann A, Jardim RD, et al. Influence of mineral, olive or sunflower oils on male reproductive parameters in vitro—the wild rodent *Calomys laucha*. *Andrologia*. 2014;46(7):722-5.