

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Influência da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA na espermatogênese de *Calomys callosus*

Tainan Fernandes Rathlef da Silva

Uberlândia – MG

Junho – 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Influência da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA na espermatogênese de *Calomys callosus*

Tainan Fernandes Rathlef da Silva

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biotecnologia
da Universidade Federal de Uberlândia
como requisito final para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
Coorientador: Murilo Vieira da Silva

Uberlândia – MG

Junho – 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Influência da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA na espermatogênese de *Calomys callosus*

Tainan Fernandes Rathlef da Silva

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biotecnologia
da Universidade Federal de Uberlândia
como requisito final para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Murilo Vieira da Silva – LABME/UFU

Presidente

Flávia Batista Ferreira França – LABME/UFU

Membro

Isabela Lemos de Lima – LABME/UFU

Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata da Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia – Minas Gerais, 27 de junho de 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à pequena Tainan, que tinha grandes sonhos, um dos quais acaba de se realizar. Dentre tantos outros realizados nessa jornada acadêmica, esta conquista me impulsiona a seguir em frente e alcançar ainda mais. Dedico também à minha família, pelo apoio em todas as etapas da minha vida e por sempre acreditarem em mim, aos amigos e todas as pessoas importantes que cruzaram meu caminho e contribuíram de alguma forma para que este momento fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha imensa gratidão aos meus orientadores, Carlos e Murilo, pela orientação, confiança e pela oportunidade de realizar este trabalho. O apoio foi essencial para o sucesso desta pesquisa, e sou muito grata por todo o conhecimento compartilhado ao longo dessa jornada.

Agradeço à Flávia, pela ajuda fundamental e pelo suporte constante durante a pesquisa. Sua orientação prática e científica foi indispensável. Sou grata por todo o apoio que recebi de sua parte, sempre com muita paciência.

Agradeço à Sandra, por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas e oferecer ajuda com tanta boa vontade. Seu apoio foi muito importante para o meu aprendizado e para a realização desta pesquisa.

Ao Bruno, meu namorado, pela parceria, por todo o apoio ao longo dessa caminhada e por ter contribuído, com paciência e generosidade, para que esta pesquisa se tornasse possível.

Aos meus pais, pelo amor, pelo apoio em todos os momentos e por sempre acreditarem em mim. Sem a base sólida que me proporcionaram, a jornada até aqui não teria sido possível.

Agradeço ainda aos membros do LABME, nosso laboratório, pelo ambiente colaborativo e acolhedor. A convivência com todos foi enriquecedora, e o apoio de cada um contribuiu para o andamento bem-sucedido da pesquisa.

Aos animais utilizados neste estudo, expesso meu respeito e agradecimento.

Agradeço também ao REBIR (Rede Brasileira de Repositórios) pela infraestrutura e suporte que viabilizaram o armazenamento e a divulgação dos dados gerados neste estudo.

Por fim, agradeço às instituições PROPP, FAPEMIG, CNPq e à Rede Mineira de Biotecnologia em Modelos Experimentais, pelo apoio institucional e financeiro, que tornaram viável a execução da pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu mais sincero obrigado.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, com potencial impacto sistêmico em diversos órgãos, incluindo o sistema reprodutor masculino. Este estudo avaliou os efeitos da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA sobre a espermatogênese em *Calomys callosus*. Foram analisados parâmetros como peso corporal, morfologia testicular e integridade estrutural dos espermatozoides. Os resultados indicaram redução significativa na altura do epitélio germinativo e no diâmetro dos túbulos seminíferos, além de aumento na frequência de espermatozoides com alterações morfológicas nas regiões da cabeça, cauda e gota citoplasmática. Essas alterações sugerem que a malária pode comprometer a qualidade espermática por mecanismos multifatoriais, incluindo estresse oxidativo (EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019), disfunções hormonais (RAJI et al., 2006) e alterações no ambiente testicular e epididimário (ISLAM et al., 2023; LI et al., 2021). Embora esses achados apontem para prejuízos potenciais à fertilidade, ainda não se sabe se tais alterações interferem de fato na capacidade reprodutiva. Estudos futuros devem investigar os mecanismos moleculares envolvidos e avaliar a relação entre a morfologia espermática e a fertilidade funcional.

Palavras-chave: malária; espermatogênese; fertilidade masculina; *Calomys callosus*; morfologia espermática, *Plasmodium berghei*.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, with systemic effects that can impact multiple organs, including the male reproductive system. This study investigated the effects of *Plasmodium berghei* ANKA infection on spermatogenesis in *Calomys callosus*. Parameters such as body weight, testicular morphology, and sperm structural integrity were analyzed. The results revealed a significant reduction in germinal epithelium height and seminiferous tubule diameter, along with an increased frequency of spermatozoa exhibiting morphological abnormalities in the head, tail, and cytoplasmic droplet. These findings suggest that malaria may impair sperm quality through multifactorial mechanisms, including oxidative stress (EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019), hormonal imbalances (RAJI et al., 2006), and disruptions in the testicular and epididymal environment (ISLAM et al., 2023; LI et al., 2021). While these alterations point to a potential impact on fertility, it remains unclear whether they directly affect reproductive capacity. Further studies are needed to elucidate the underlying molecular mechanisms and to explore the relationship between sperm morphology and functional fertility.

Keywords: malaria; spermatogenesis; male fertility; *Calomys callosus*; sperm morphology, *Plasmodium berghei*.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Malária: aspectos gerais	11
1.1.1. Distribuição geográfica e impacto global.....	11
1.1.2. Histórico das descobertas científicas.....	11
1.1.3. Ciclo biológico e mecanismos de tratamento.....	12
1.1.4. Profilaxia e estratégias terapêuticas.....	14
1.2. Reprodução masculina e os efeitos da malária.....	16
1.2.1.Efeitos da malária na função reprodutiva masculina: evidências em humanos e roedores.....	16
1.2.1. Espermatogênese: comparação entre humanos e roedores.....	18
1.2.3. Morfologia espermática e implicações funcionais.....	21
1.3. <i>Calomys callosus</i> como modelo experimental	25
1.3.1. Importância científica e vantagens experimentais.....	25
1.3.2. Normas éticas e regulamentação de uso de animais.....	26
2.OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos gerais	27
2.2. Objetivos específicos	27
3.MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Alojamento de animais	28
3.2. Manutenção da cepa de PbA e infecção.....	28
3.3. Coleta de órgãos	29

3.4.	Análise histológica testicular e morfométrica dos túbulos seminíferos ...	30
3.5.	Análise da morfologia e morfometria dos espermatozoides	31
3.6.	Análise estatística	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1.	Impacto da infecção por PbA no peso corporal de <i>c. callosus</i>	32
4.2.	Análise morfológica do túbulo seminífero.....	33
4.3.	Análise morfológica espermática de patologias em animais não infectados e infectados por PbA.....	36
4.3.1.	Cabeça e cauda.....	36
4.3.2.	Gota citoplasmática.....	40
4.3.3.	Análise geral.....	43
5.	CONCLUSÃO	44
6.	REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Malária: aspectos gerais

1.1.1. Distribuição geográfica e impacto global

A malária é uma doença que afeta principalmente áreas tropicais como a Amazônia Brasileira, Venezuela, Colômbia e Equador, assim como Honduras (Sifontes, 2021), sudeste da Ásia (Islam et al., 2023) e a África Subsaariana, matando mais de 600 mil pessoas por ano (Rogerson & Unger, 2022).

Entre os sintomas, é possível identificar febre alta, suor, calafrios, sonolência, enjoos, desinteria, falta de apetite, espasmos, amarelamento da pele (Islam et al., 2023). Em casos mais severos, a infecção pode levar a morte (Aguilar-Castro et al., 2022). A doença se manifesta principalmente sob as formas de malária gestacional, malária cerebral, anemia severa e acidose (MILNER, 2018). Considerada a enfermidade parasitária mais letal do mundo, a malária apresenta maior gravidade e taxa de mortalidade em homens, quando comparada às mulheres (AGUILAR-CASTRO et al., 2022).

Trata-se de uma infecção provocada por parasitas do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao filo Apicomplexa, cujas espécies que infectam humanos são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (ROGERSON; UNGER, 2022). Dentre essas, *P. falciparum* se destaca como a principal responsável pelas formas mais graves da doença e pelos óbitos associados à infecção em humanos (RODRIGUES, 2022).

1.1.2. Histórico das descobertas científicas

Com os avanços notáveis na bacteriologia liderados por cientistas como Pasteur e Koch na década de 1870, acreditava-se que a malária era provocada por uma bactéria (HARBACH, 2004; Sifontes, 2017). Somente após dez anos, o cientista francês Charles Louis Alphonse Laveran observou que o baço dos pacientes acometidos pela malária apresentava um pigmento característico, que ao investigá-lo em amostras de sangue fresco de pessoas infectadas, identificou distintos estágios do parasita dentro dos glóbulos vermelhos (HARBACH, 2004; Sifontes, 2017). A princípio, suas observações não obtiveram boa aceitação na comunidade científica, ao passo que erroneamente interpretaram as alterações nas hemácias como mera desintegração (HARBACH, 2004; Sifontes, 2017). Ao longo dos anos seguintes, suas descobertas foram gradativamente aceitas pelos principais cientistas da época. Essa aceitação culminou com a premiação de

Laveran com o Prêmio Nobel de Medicina em 1907 (HARBACH, 2004; Sifontes, 2017).

Além disso, outros cientistas também contribuíram para o avanço na pesquisa da malária, como Ronal Ross, que elucidou o ciclo completo de transmissão, Marchiafava e Celli, que deram ao parasita o nome genérico de *Plasmodium*, e Romanowsky, que desenvolveu um método aprimorado de coloração de esfregaços, facilitando o estudo da morfologia parasitária (HARBACH, 2004; Sifontes, 2017). Essas contribuições foram fundamentais para expandir o conhecimento sobre a doença e impulsionar o desenvolvimento de estratégias de combate à malária (SIFONTES, 2017).

1.1.3. Ciclo biológico e mecanismos de tratamento

Os mecanismos de infecção normalmente ocorrem através da interação entre hospedeiro, vetor e patógeno (Savi, 2022). Durante seu ciclo evolutivo, o *Plasmodium* apresenta um desenvolvimento complexo, alternando entre formas sexuais, que ocorrem no vetor invertebrado, e formas assexuais, que se desenvolvem nos hospedeiros vertebrados, incluindo aves, répteis e mamíferos, como os seres humanos (Bogitsh et al., 2013; Sifontes, 2017). O ciclo pode ser dividido em duas fases principais: a fase pré-eritrocítica (ou intra-hepática) e a fase eritrocítica (BOGITSH; OELTMANN; CARTER, 2013; SIFONTES, 2017).

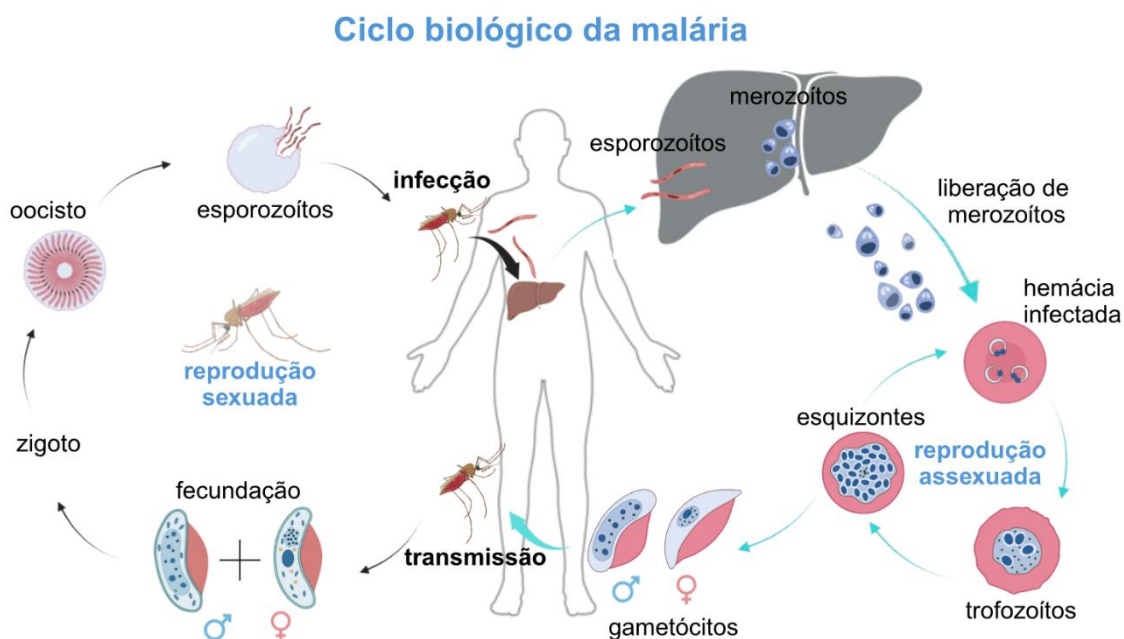


Figura 1: Ciclo biológico da malária, destacando as fases do parasita *Plasmodium* nos hospedeiros vertebrado (humano) e invertebrado (mosquito *Anopheles*). O ciclo inicia-se quando um mosquito *Anopheles* infectado inocula esporozoítos do *Plasmodium* na corrente sanguínea humana durante a picada.

Os esporozoítos migram até o fígado, invadem os hepatócitos e se multiplicam, formando esquizontes hepáticos que liberam merozoítos. Estes entram na circulação sanguínea e infectam os eritrócitos, onde se desenvolvem em trofozoítos e esquizontes, realizando reprodução assexuada. Após nova liberação de merozoítos, parte deles se diferencia em gametócitos masculinos e femininos. Quando um mosquito não infectado pica um hospedeiro infectado, ingere os gametócitos, que se fundem no intestino do inseto formando zigotos. Os zigotos se desenvolvem em oocistos, liberando novos esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito, tornando-o capaz de infectar outro humano, assim completando o ciclo. Figura elaborada pela autora utilizando o BioRender.

O gasto proteico para maturação dos ovos faz com que as fêmeas do mosquito *Anopheles* apresentem deficiência de proteínas e sacarose vegetal durante a oviposição (Savi, 2022). Buscando suprir essa carência e completar seu ciclo gonotrófico, se alimentam de sangue humano (Savi, 2022). Durante o repasto sanguíneo, o mosquito inocula o parasita em forma de esporozoíto na pele do hospedeiro vertebrado, que entra na corrente sanguínea, transferindo-se para o fígado, onde continua a se desenvolver e multiplicar na fase pré-eritrocítica nos hepatócitos (Nilsson et al., 2015; Sifontes, 2021).

Após alcançar o fígado, os esporozoítos do *Plasmodium* atravessam a parede dos vasos sanguíneos hepáticos (sinusóides) e migram por várias células hepáticas, rompendo temporariamente suas membranas, até que se estabeleçam definitivamente em um hepatócito (PRUDÊNCIO; RODRIGUES; MOTA, 2006). Nesse local, o parasita se aloja em um vacúolo parasitóforo, estrutura que o isola do sistema imune e oferece condições favoráveis para seu crescimento (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006; VALENCIANO et al., 2022). Durante esse estágio intra-hepático, que é assintomático, ocorre intensa multiplicação assexuada conhecida como esquizogonia, processo pelo qual um único esporozoíto origina milhares de merozoítos (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006; VALENCIANO et al., 2022). Após alguns dias, esse hepatócito é rompido, liberando os merozoítos na corrente sanguínea, onde se inicia a fase eritrocítica da infecção, responsável pelos sintomas clínicos da malária, já que essas formas invadem os eritrócitos do hospedeiro (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006; VALENCIANO et al., 2022).

Agora na forma de merozoíto, o protozoário que deixou os hepatócitos através de merossomas entra na corrente sanguínea e invade hemácias, se diferenciando em forma de anel, trofozoíto e esquizonte (STURM et al., 2006; SIFONTES, 2017). Diante da notável proliferação parasitária, observa-se a lise das hemácias infectadas, ocasionando a liberação de merozoítos na corrente sanguínea, desencadeando, assim, a instauração de

novos ciclos de invasão eritrocitária (Nilsson et al., 2015; Sifontes, 2021). Os estágios parasitários liberados no sangue podem então invadir novos eritrócitos, dando continuidade ao ciclo da reprodução assexuada, ou produzir células reprodutivas masculinas e femininas que serão transmitidas ao serem ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo (Fujioka & Aikawa, 2002; Sifontes, 2017).

Já no intestino do *Anopheles*, as células se diferenciam em gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas), que se unem e passam por meiose, originando, por fecundação, o zigoto denominado ookinete (FUJIOKA; AIKAWA, 2002; SIFONTES, 2017). Este atravessa a parede do intestino do vetor, fixa-se e dá origem a uma estrutura denominada oocisto (FUJIOKA; AIKAWA, 2002; SIFONTES, 2017). À medida que se desenvolvem, os oocistos produzem esporozoítos (FUJIOKA; AIKAWA, 2002; SIFONTES, 2017). Quando amadurecem, rompem-se, liberando os esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito (FUJIOKA; AIKAWA, 2002; SIFONTES, 2017). Esses esporozoítos ficam então prontos para serem inoculados em um novo hospedeiro humano na próxima picada, reiniciando o ciclo da malária (FUJIOKA; AIKAWA, 2002; SIFONTES, 2017).

Dessa forma, o *Plasmodium* pode ser transmitido vetorialmente pela picada do mosquito *Anopheles* ou por transfusões de sangue, transplante de órgãos e via transplacentária, demandando alta prevenção e tratamentos eficazes (Rogerson & Unger, 2022).

1.1.4. Profilaxia e estratégias terapêuticas

Embora a prevenção da malária enfrente desafios significativos, que não dependem apenas do *Plasmodium*, mas também do mosquito *Anopheles*, existem algumas maneiras de se realizar a profilaxia (Savi, 2022). Para o controle do mosquito: a eliminação de larvas e adultos pode reduzir a taxa de inoculação entomológica; modificações físicas, removendo locais de reprodução, assim como a utilização de mosquiteiros; uso de larvicidas e inseticidas; utilização de inimigos naturais como peixes larvófagos e bactérias; educação e conscientização para que a população se mantenha informada sobre medidas preventivas, sintomas e tratamento da malária (Savi, 2022). Para controle do parasita: uso de medicamentos antimaláricos; prevenção intermitente com administração de dose única da combinação de diferentes medicamentos; vacinação sazonal (Savi, 2022).

Os medicamentos antimaláricos mais eficientes utilizados para o tratamento da

malária são terapias à base de artemisinina (ACTs), combinadas de dois fármacos ativos (WHO, 2025). Cada ativo apresenta um mecanismo, sendo o do composto artemisinina o de conter a proliferação, reduzindo o número de parasitas, ao passo que o medicamento parceiro é responsável por extinguir os parasitas remanescentes após os primeiros três dias (WHO, 2025). Os ACTs são considerados mais eficazes dado que a resistência do parasita à artemisinina não afeta o resultado do tratamento, diferentemente de outros medicamentos antimaláricos (WHO, 2025). De mesmo modo, a única vacina que atualmente apresenta capacidade de moderar a infecção por malária em crianças nas zonas endêmicas é a RTS,S/AS01 (RTS,S), recomendada em 2021 pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2025).

Também conhecida como Mostequirix, a vacina RTS,S foi a primeira licenciada para uso contra malária (JOKURA, 2021; PAHO/OMS, 2021). Sua formulação combina uma proteína recombinante baseada na proteína circumsporozoíta (CSP) do *Plasmodium falciparum*, presente na fase esporozoíta, que é responsável pela infecção inicial, com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (JOKURA, 2021; PAHO/OMS, 2021). Essa associação forma uma partícula semelhante a vírus (virus-like particle), o que confere maior imunogenicidade ao composto (JOKURA, 2021; PAHO/OMS, 2021). Além do componente antigênico, a vacina contém o adjuvante AS01, um sistema lipossomal composto por monofosforil lipídio A e QS-21, substâncias que atuam potencializando a resposta imune do organismo (JOKURA, 2021).

O mecanismo de ação da RTS,S/AS01 envolve a indução de uma resposta imune robusta, tanto humoral quanto celular (JOKURA, 2021; PAHO/OMS, 2021). Ela promove a produção de anticorpos contra a CSP, estimulação de células T auxiliares (CD4⁺) e a liberação de citocinas como interferon-gama (JOKURA, 2021; PAHO/OMS, 2021). Esse conjunto de reações imunológicas impede a invasão do fígado pelos esporozoítos do parasita, reduzindo a progressão da malária nos indivíduos vacinados (JOKURA, 2021; PAHO/OMS, 2021).

O esquema vacinal recomendado consiste em quatro doses: a primeira aplicada aos 5 meses de idade, seguida por duas doses aos 8 e 11 meses, e uma dose de reforço aos 18 meses (JOKURA, 2021; PAHO/OMS, 2021).

Ensaio clínicos de fase III demonstraram que a RTS,S/AS01 proporciona uma redução parcial nos casos de malária clínica e grave, sendo mais eficaz em crianças entre 5 e 17 meses do que em lactentes mais jovens (WHO, 2019). Alguns eventos adversos foram observados, como convulsões febris, embora sem consequências permanentes

(WHO, 2019). A viabilidade da vacina foi comprovada por meio de um programa piloto realizado em Gana, Quênia e Malawi, que já imunizou mais de 800 mil crianças e demonstrou impacto positivo na redução da incidência da doença (PAHO/OMS, 2021).

Por fim, a RTS,S/AS01 representa um avanço relevante na saúde pública, sobretudo em regiões endêmicas da África Subsaariana, onde a mortalidade infantil associada à malária ainda é alarmante (JOKURA, 2021).

1.2. Reprodução masculina e os efeitos da malária

1.2.1. Efeitos da malária na função reprodutiva masculina: evidências em humanos e roedores

Embora a maioria das pesquisas sobre o impacto da malária na reprodução humana esteja concentrada nos efeitos da infecção durante a gestação, evidências crescentes indicam que a doença também pode comprometer a função reprodutiva masculina (WIWANITKIT, 2011). Já foram relatados casos de redução na qualidade do sêmen em homens infectados por malária, incluindo quadros severos, como oligozoospermia, necrozoospermia e até azoospermia (WIWANITKIT, 2011). Suspeita-se que tanto a própria infecção quanto o tratamento estejam envolvidos na origem dessas alterações, embora a recuperação da função reprodutiva tenha sido observada após a cura da doença (WIWANITKIT, 2011).

A febre elevada e os episódios de calafrios recorrentes, típicos da infecção malárica, provocam alterações na temperatura corporal (FIOCRUZ, 2025). Esse estresse térmico afeta negativamente a espermatogênese, processo sensível ao aumento da temperatura, podendo levar à redução temporária da produção e da qualidade dos espermatozoides, como a maior proporção de formas anormais. Esses fatores comprometem diretamente a fertilidade masculina (ABDELHAMID et al., 2019).

Além disso, a anemia severa causada pela infecção por *Plasmodium* leva à destruição maciça das hemácias, reduzindo significativamente os níveis de hemoglobina e comprometendo a oxigenação dos tecidos (ISLAM; DHAR; RAHMAN, 2023). Essa condição agrava o estado sistêmico do organismo e pode afetar indiretamente a função reprodutiva masculina, uma vez que tanto a espermatogênese quanto o eixo hormonal são sensíveis à hipóxia tecidual e ao aumento da demanda metabólica (LI et al., 2021).

Apesar das limitações nos estudos diretamente focados na reprodução masculina associada à malária, o impacto sistêmico da doença é um fator de risco plausível para a redução da fertilidade masculina, especialmente em áreas endêmicas (WIWANITKIT,

2011). Destaca-se a necessidade de maior aprofundamento científico sobre esse tema, visando compreender melhor os mecanismos envolvidos e possibilitar estratégias que minimizem os efeitos da malária na saúde reprodutiva masculina (WIWANITKIT, 2011). Para isso, os modelos experimentais com roedores têm se mostrado essenciais, pois permitem investigar os efeitos da infecção malárica sob condições controladas e detalhar os processos celulares e moleculares envolvidos (RAJI; AKINSOMISOYE; AZEEZ, 2006; EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019).

Evidências obtidas a partir de modelos experimentais com roedores demonstram efeitos deletérios da infecção malárica sobre o corpo e a função reprodutiva masculina (RAJI; AKINSOMISOYE; AZEEZ, 2006; EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019). Estudos com camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados por *Plasmodium berghei* evidenciaram perda de peso significativa nos dias 6 a 8 e 13 a 15 pós-infecção, respectivamente (SHIMADA et al., 2019). Especificamente na linhagem BALB/c, observou-se um aumento expressivo do estresse oxidativo nos testículos, caracterizado pela redução nas atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), além do aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), um marcador associado à peroxidação lipídica (EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019). Essas alterações bioquímicas foram acompanhadas por prejuízos nos parâmetros espermáticos, como queda na contagem total de espermatozoides, redução da motilidade progressiva e elevação da porcentagem de formas anormais (EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019). Além disso, observou-se diminuição dos níveis séricos de testosterona e progesterona, indicando comprometimento da função endócrina gonadal (EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019). Histologicamente, os testículos apresentaram degeneração do epitélio seminífero e redução da densidade celular germinativa, sugerindo dano estrutural relevante ao tecido testicular (EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019).

De forma semelhante, Raji, Akinsomisoye e Azeez (2006) também observaram, em camundongos infectados, diminuição estatisticamente significativa no peso dos testículos e epidídimos, acompanhada por prejuízos nos índices reprodutivos masculinos, incluindo motilidade, viabilidade e morfologia espermática. Os animais apresentaram níveis reduzidos de testosterona, reforçando a hipótese de disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal induzida pela infecção.

Esses achados sugerem que, além dos efeitos diretos do parasita sobre o tecido testicular, há um impacto importante do sistema endócrino e imunológico na resposta do

hospedeiro. Embora o sexo nem sempre seja considerado fator relevante em estudos imunológicos, sabe-se que os hormônios sexuais, como a testosterona e o 7 β -estradiol, diferem em sua atividade imunomoduladora, sendo a testosterona conhecida por sua ação imunossupressora (AGUILAR-CASTRO et al., 2022). Essa modulação hormonal pode influenciar a expressão gênica em células do sistema imune, afetando a proliferação, diferenciação celular e síntese de citocinas, o que potencialmente contribui para a maior severidade da malária observada em machos, incluindo a maior parasitemia (AGUILAR-CASTRO et al., 2022). Assim, a interação entre os efeitos diretos da infecção e a influência hormonal masculina pode explicar o comprometimento acentuado da função reprodutiva em roedores infectados por *Plasmodium berghei* (AGUILAR-CASTRO et al., 2022).

1.2.2. Espermatogênese: comparação entre humanos e roedores

A espermatogênese é o processo pelo qual são gerados os gametas masculinos maduros, ocorrendo nos túbulos seminíferos (TS) dos testículos (LIRA NETO et al., 2016). Os TS apresentam estrutura semelhante em humanos e roedores, sendo compostos por uma membrana basal, células de Sertoli e células germinativas em diversos estágios de maturação, envoltos por tecido peritubular composto por células mioides e matriz extracelular, que juntos formam a barreira hematotesticular (BHT) (JAN et al., 2012; LIRA NETO et al., 2016). Essa barreira é fundamental em ambas as espécies para proteger as células germinativas haploides contra respostas imunes e para manter o microambiente adequado para o desenvolvimento espermatogênico (JAN et al., 2012; LIRA NETO et al., 2016).

O testículo adulto humano apresenta um volume médio de aproximadamente 30 mL, com o parênquima dividido em 200 a 300 lóbulos, cada um contendo de uma a três alças de túbulos seminíferos, totalizando cerca de 250 metros de comprimento por testículo (LIRA NETO et al., 2016). Em contraste, os roedores possuem uma estrutura reprodutiva significativamente mais compacta: o volume testicular em camundongos (*Mus musculus*) é de aproximadamente 0,1 cm³ (MORAIS et al., 2009), enquanto em ratos (*Rattus norvegicus*), particularmente da linhagem Wistar, varia entre 1,2 e 1,4 cm³, com peso aproximado de 1,5 g por testículo (MOURA et al., 2006). Apesar dessas diferenças de tamanho e organização, os testículos de mamíferos em condições fisiológicas normais mantêm uma morfologia altamente organizada e relativamente constante, especialmente em animais saudáveis e não senescentes. Alterações

histológicas relevantes tendem a ocorrer apenas diante de insultos severos, como infecções intensas, toxicidade aguda ou degenerações avançadas, o que evidencia a estabilidade estrutural do órgão em condições homeostáticas (LARA et al., 2018).

A estrutura dos túbulos seminíferos, composta por membrana basal, células de Sertoli e células germinativas em maturação, envolta por tecido peritubular, também está presente nos roedores, com arquitetura testicular bastante semelhante (JAN et al., 2012).

As células mioides peritubulares, com características musculares e fibroblásticas, desempenham função contrátil, promovendo o transporte do fluido testicular e dos espermatozoides imaturos até o rete testis, onde esses gametas serão posteriormente conduzidos aos ductos eferentes para continuação do processo de maturação e armazenamento (LIRA NETO et al., 2016). Nos roedores, essas células também exercem função paracrina, regulando a espermatogênese por meio da secreção de fatores que influenciam a integridade tubular (JAN et al., 2012).

As células de Leydig, localizadas no interstício testicular, são as principais responsáveis pela produção do hormônio esteroide testosterona, fundamental para o desenvolvimento e funcionamento do sistema reprodutor masculino (LIRA NETO et al., 2016). A diferenciação dessas células ocorre em três fases durante o desenvolvimento ontogenético, com regulação principalmente pelo hormônio luteinizante (LH), que estimula a síntese e liberação de testosterona (LIRA NETO et al., 2016). Essa testosterona é secretada no interstício e alcança concentrações intratesticulares muito superiores às da circulação sistêmica, atuando localmente na progressão da espermatogênese, especialmente durante a meiose e a maturação das espermatídes (LIRA NETO et al., 2016). Além disso, mantém a integridade funcional das células de Sertoli, que suportam as células germinativas ao longo de todo o processo (LIRA NETO et al., 2016). Nas espécies roedoras, as células de Leydig desempenham a mesma função esteroideogênica, porém com uma resposta mais rápida aos estímulos hormonais e diferenças nos perfis de expressão gênica que regulam sua atividade, o que pode influenciar o ritmo e a eficiência da espermatogênese (JAN et al., 2012).

As células de Sertoli, consideradas os “condutores” da espermatogênese, sustentam e nutrem as células germinativas, além de formar a barreira hematotesticular (LIRA NETO et al., 2016). Elas auxiliam na migração das células germinativas ao longo do túbulo, realizam fagocitose de células germinativas degeneradas e produzem diversas substâncias, como a proteína ligadora de andrógenos, transferrina e inibina B, que contribuem para o equilíbrio do ambiente testicular (LIRA NETO et al., 2016). As células

de Sertoli são estimuladas pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e pela testosterona, que agem de forma complementar para garantir a continuidade e qualidade da espermatogênese (LIRA NETO et al., 2016). Em roedores, as células de Sertoli exercem funções similares, com elevada atividade fagocítica e produção de fatores tróficos, embora apresentem variações na expressão de genes reguladores durante o ciclo espermatogênico (JAN et al., 2012).

As células germinativas, localizadas no epitélio dos túbulos seminíferos, são responsáveis pela formação dos espermatozoides por meio de uma sequência organizada de eventos que incluem mitose, diferenciação, meiose e maturação (LIRA NETO et al., 2016). A produção contínua dessas células é mantida pela autorrenovação das espermatogônias, que podem se diferenciar em espermatócitos primários para iniciar a meiose (LIRA NETO et al., 2016). Durante esse processo, as espermátides redondas sofrem modificações morfológicas e estruturais para se tornarem espermatozoides maduros, incluindo condensação do núcleo, formação do acrossomo e desenvolvimento do flagelo (LIRA NETO et al., 2016). Nos roedores, esse processo segue os mesmos princípios gerais, mas com um ciclo mais curto (cerca de 48 dias em comparação com 64 dias em humanos), além de uma organização mais ordenada em “ondas” longitudinais ao longo dos túbulos, que facilita a coleta de células em estágios sincronizados (JAN et al., 2012).

A barreira hematotesticular, formada principalmente pelas junções entre as células de Sertoli, compartimentaliza o epitélio seminífero em compartimentos basal e adluminal, protegendo as células germinativas haploides em desenvolvimento de reações imunes regulando o transporte seletivo de substâncias (LIRA NETO et al., 2016). Essa compartimentalização também é observada em roedores, sendo essencial para a imunoprivação das células haploides e para a regulação do transporte seletivo de moléculas (JAN et al., 2012).

Em síntese, a espermatogênese humana é um processo altamente regulado que depende da interação coordenada entre células germinativas, células de Sertoli, mióides peritubulares e células de Leydig, além da influência de fatores hormonais como testosterona, FSH e LH (LIRA NETO et al., 2016). Em roedores, esse processo ocorre de forma análoga, com variações em aspectos temporais, espaciais e moleculares (JAN et al., 2012). Apesar dessas variações, a estrutura funcional básica do testículo e a sequência de eventos celulares são amplamente conservadas entre humanos e roedores, o que torna os modelos murinos ferramentas experimentais valiosas para o estudo da

espermato gênese e da fisiologia reprodutiva masculina (JAN et al., 2012).

1.2.3. Morfologia espermática e implicações funcionais

O espermatozoide humano é uma célula altamente especializada, caracterizada por uma cabeça ovalada e levemente em forma de foice, que mede aproximadamente 5 a 6 μm de comprimento e 3 a 4 μm de largura (KAMIENICZNA et al., 2022). A cabeça contém o núcleo compactado e o acrossomo, que armazena enzimas cruciais para a penetração da camada externa do óvulo (KAMIENICZNA et al., 2022). A peça intermediária é rica em mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia, e o flagelo longo garante a motilidade necessária para alcançar e fertilizar o óvulo (KAMIENICZNA et al., 2022). A integridade estrutural dessas partes é fundamental para a fertilidade, visto que qualquer alteração morfológica pode prejudicar a motilidade e a capacidade fertilizante do espermatozoide (KAMIENICZNA et al., 2022).

No espermatozoide de roedores, especialmente de camundongos, a morfologia apresenta algumas diferenças, refletindo adaptações específicas (VIEIRA et al., 2024). A cabeça é mais alongada, estreita e curvada, ainda mais pronunciado que no humano (com formato de foice), medindo cerca de 10 a 12 μm de comprimento (VIEIRA et al., 2024). O acrossomo é alongado e cobre grande parte da cabeça, contribuindo para a especialização funcional da célula (VIEIRA et al., 2024). Além disso, a peça intermediária e o flagelo são proporcionais a essa estrutura, adaptados para a rápida motilidade necessária na reprodução da espécie (VIEIRA et al., 2024). Essas características morfológicas influenciam o padrão de natação e a eficiência fertilizante dos espermatozoides de roedores, sendo fatores importantes na interpretação de resultados em modelos experimentais (VIEIRA et al., 2024).

As principais anomalias morfológicas dos espermatozoides de camundongos, segundo Vieira et al. (2024), incluem deformações como cabeça dupla, ausência de gancho (hookless), formato semelhante a uma banana (banana-like), cabeça estreita (narrow), cabeça muito grande (macrocephalous), ausência da cabeça (headless) e formas amorfas, que englobam deformações irregulares e globosas. Essas alterações anatômicas podem comprometer a função espermática, interferindo na penetração na zona pelúcida, na motilidade e na entrega adequada do material genético (CHANG et al., 2017; VIEIRA et al., 2024).

Espermatozoides acefálicos, por exemplo, indicam falhas na junção entre a cabeça e a cauda, estrutura fundamental para a integridade funcional da célula (MORETTI et al.,

2022). Sua ausência compromete completamente a locomoção e inviabiliza a fecundação, pois impede a transferência do material genético ao oócito (MORETTI et al., 2022). O gancho apical, ausente em algumas dessas anomalias, parece ter papel funcional na motilidade, na interação com estruturas do trato reprodutivo feminino e possivelmente na competição espermática, sendo sua alteração prejudicial à eficiência fertilizante (FISHER; GIOMO; HOEKSTRA, 2021; VIEIRA et al., 2024). Adicionalmente, as alterações na morfologia da cabeça, como a microcefalia, estão relacionadas a defeitos na compactação do núcleo celular, o que pode comprometer a estabilidade do material genético (KUSUMAWATI et al., 2024). Já a macrocefalia, por sua vez, é frequentemente associada a anomalias cromossômicas ou defeitos na compactação do núcleo, resultando em instabilidade genômica e menor capacidade fertilizante (KUSUMAWATI et al., 2024; VIEIRA et al., 2024). Ainda, espermatozoides com cabeças amorfas ou deformadas apresentam alterações na condensação do DNA e em estruturas nucleares essenciais, o que aumenta a fragmentação do material genético e compromete tanto a fertilização quanto a implantação embrionária (CHANG et al., 2017).

Além das alterações na cabeça, o estudo de Vieira et al. (2024) também descreve detalhadamente as anomalias morfológicas observadas na cauda dos espermatozoides de camundongos, as quais têm implicações diretas na motilidade e na capacidade fertilizante dos gametas. Entre as principais patologias estão caudas dobradas, em espiral, curtas, ausentes e com inserção anômala na peça intermediária (VIEIRA et al., 2024).

As caudas dobradas ou em espiral são deformidades frequentemente associadas à disfunção na estrutura do axonema, afetando a ondulação eficiente do flagelo e comprometendo o deslocamento progressivo do espermatozoide (VIEIRA et al., 2024). A ausência da cauda, por sua vez, elimina completamente a capacidade de locomoção, inviabilizando qualquer chance de fecundação (VIEIRA et al., 2024). Já as caudas curtas reduzem a amplitude de batimento flagelar, tornando o movimento mais limitado e menos eficaz (VIEIRA et al., 2024). Por fim, anomalias na inserção da cauda, como sua conexão em posição desalinhada com a cabeça, podem comprometer a direção do movimento e gerar padrões de natação erráticos, reduzindo significativamente a eficiência fertilizante (VIEIRA et al., 2024).

De maneira geral, a locomoção eficaz do espermatozoide até o oócito depende diretamente da integridade estrutural do flagelo, componente fundamental para sua motilidade (TOURÉ et al., 2021). De acordo com Touré et al. (2021), alterações na morfologia flagelar, estão frequentemente associadas à ocorrência de astenozoospermia,

condição caracterizada pela redução ou ausência da mobilidade espermática (TOURÉ et al., 2021). Essa disfunção compromete significativamente o potencial fecundante dos gametas, estando relacionada a casos de infertilidade masculina (TOURÉ et al., 2021), além de refletirem distúrbios na espermatogênese e reforçarem a importância da avaliação morfológica detalhada na análise da qualidade espermática em modelos experimentais (VIEIRA et al., 2024).

Adicionalmente a essas alterações estruturais clássicas, outro marcador relevante de disfunção espermática é a presença persistente da gota citoplasmática, também chamada de gota residual, uma estrutura transiente formada durante a espermiogênese, resultante da condensação incompleta do citoplasma nos espermatozoides em diferenciação (XU et al., 2013; LIU et al., 2023). Considerando que a espermiogênese representa a fase final da espermatogênese e envolve a intensa remodelação estrutural das espermátides, a formação da gota citoplasmática emerge como um marcador importante desse processo (COOPER, 2010).

Trata-se de uma pequena estrutura esférica de citoplasma localizada, na peça intermediária do espermatozoide durante sua maturação no epidídimo (YUAN et al., 2013; SOARES; MACHADO-NEVES, 2020). Essa estrutura deve ser removida ao longo do trânsito epididimário, especialmente na cauda, onde se espera que os espermatozoides estejam morfolologicamente maduros e funcionalmente competentes (COOPER, 2010; SOARES; MACHADO-NEVES, 2020). Sua função está relacionada à regulação da osmolaridade, ajudando a controlar a entrada e saída de água (SOARES; MACHADO-NEVES, 2020; YUAN et al., 2013), ao metabolismo energético e ao desenvolvimento da motilidade espermática, possivelmente devido à presença de lipídios, RNAs, lipoproteínas e enzimas hidrolíticas que auxiliam na atividade mitocondrial e fornecem energia para o espermatozoide (XU et al., 2013; AU et al., 2015; SOARES; MACHADO-NEVES, 2020).

Em condições normais, essa estrutura transitória, formada a partir da eliminação do excesso de citoplasma, migra da região proximal para a distal da peça intermediária e, posteriormente, é descartada ao longo do epidídimo (COOPER, 2010). No entanto, a retenção anormal dessa estrutura em espermatozoides maduros tem sido amplamente associada a disfunções na espermiogênese e na maturação epididimária, podendo comprometer parâmetros fundamentais da fertilidade, como motilidade, morfologia e integridade funcional do gameta (XU et al., 2013). Segundo Xu et al. (2013), espermatozoides que mantêm a gota citoplasmática apresentam redução significativa da

motilidade progressiva, além de alterações na dinâmica do batimento flagelar, possivelmente devido à interferência mecânica ou metabólica causada por esse resquício citoplasmático (COOPER, 2010; DÍAZ-MIRANDA et al., 2019; SOARES; MACHADO-NEVES, 2020).

Adicionalmente, a gota pode prejudicar o transporte intracelular de nutrientes e íons, comprometendo o metabolismo energético do espermatozoide e, conseqüentemente, sua capacidade de alcançar e fertilizar o oócito (XU et al., 2013). Tais observações sugerem que a presença persistente da gota não é apenas uma anomalia morfológica, mas também um marcador funcional de espermatozoides imaturos ou disfuncionais (XU et al., 2013).

Complementando esses achados, Liu et al. (2023) demonstraram que a formação adequada da gota citoplasmática é um evento biologicamente regulado, que depende da atuação da proteína SYPL1. Essa proteína está envolvida em uma via vesicular intracelular que coordena o tráfego e a fusão de vesículas essenciais à remodelação citoplasmática durante a fase final da espermiogênese (LIU et al., 2023). Em modelos murinos com deleção do gene *Sypl1*, observou-se a completa ausência da gota citoplasmática e, conseqüentemente, falhas severas na estrutura e maturação dos espermatozoides, resultando em infertilidade (LIU et al., 2023). Esses resultados indicam que, ao contrário do que se imaginava, a gota citoplasmática não é apenas um resíduo a ser descartado, mas sim uma estrutura transitória essencial para o correto remodelamento celular necessário à diferenciação final dos espermatozoides (LIU et al., 2023).

Dessa forma, os estudos disponíveis indicam que tanto a retenção prolongada quanto a ausência completa da gota citoplasmática estão associadas a prejuízos na função espermática. Xu et al. (2013) mostraram que a retenção anormal da gota compromete a motilidade e pode refletir falhas na espermiogênese e na remoção de resíduos celulares, afetando diretamente a qualidade funcional dos gametas (XU et al., 2013). Já Liu et al. (2023) demonstraram que a não formação da gota leva a espermatozoides estruturalmente defeituosos e incapazes de fertilizar, reforçando a ideia de que essa estrutura desempenha um papel indispensável no processo de maturação (LIU et al., 2023).

Todas essas alterações morfológicas são indicativas de falhas na espermatogênese e podem estar associadas a disfunções reprodutivas, incluindo redução na fertilidade e aumento no risco de anomalias genéticas na descendência (XU et al., 2013; LIU et al., 2023; VIEIRA et al., 2024). Dessa forma, a avaliação detalhada das características morfológicas espermáticas é essencial em estudos com modelos murinos para melhor

compreensão dos impactos de patologias sobre a fertilidade masculina (XU et al., 2013; LIU et al., 2023; VIEIRA et al., 2024).

1.3. *Calomys callosus* como modelo experimental

1.3.1. Importância científica e vantagens experimentais

A busca por modelos experimentais que representem com maior fidelidade a complexidade das doenças humanas é fundamental para o avanço das pesquisas biomédicas (ROSA et al., 2022). Nesse contexto, *Calomys callosus* (família Cricetidae), roedor silvestre nativo da América do Sul e de porte semelhante ao de camundongos domésticos, tem se consolidado como uma alternativa promissora, especialmente em estudos de doenças parasitárias (MOOJEN, 1952; ROSA et al., 2022). O animal é mantido com sucesso em colônias experimentais devido à sua boa taxa reprodutiva e fácil manejo, o que facilita seu uso em ambientes controlados (ROSA et al., 2022).

Introduzido como modelo experimental por Petter e Almeida em 1967, *C. callosus* é um roedor silvestre que se destaca pela rusticidade e pelo perfil fisiológico menos manipulado, características que o diferenciam dos modelos laboratoriais tradicionais (ROSA et al., 2022, WADGYMAR et al., 2022). Essa condição o torna biologicamente mais próximo das respostas reais de hospedeiros frente a infecções sistêmicas, como a malária, favorecendo a obtenção de dados fisiopatológicos mais complexos e representativos (WADGYMAR et al., 2022).

Em contraste, linhagens clássicas de *Mus musculus*, como BALB/c, C57BL/6 e Swiss, foram introduzidas bem antes e passaram por extensivos processos de domesticação e homogeneização genética (POTTER, 1985; LENNON-PIERCE; EPPIG, 1998; BRYANT, 2011). As BALB/c remontam a um estoque adquirido por Halsey Bagg por volta de 1913 (POTTER, 1985); a linhagem C57BL/6 possui substrains como o C57BL/6J e o C57BL/6N, amplamente utilizados em pesquisas biomédicas desde a década de 1950 (BRYANT, 2011); já os Swiss foram desenvolvidos no Rockefeller Institute em 1926 (LENNON-PIERCE; EPPIG, 1998). Embora amplamente caracterizados, esses modelos representam organismos altamente, o que pode limitar sua representatividade frente a desafios infecciosos (WADGYMAR et al., 2022). Nesse contexto, *C. callosus*, por sua menor manipulação genética e maior aderência a condições ecológicas naturais, surge como uma alternativa promissora para o estudo de doenças tropicais, como a malária (ROSA et al., 2022, WADGYMAR et al., 2022).

Além disso, a origem geográfica do modelo reforça sua relevância: nativo de

regiões tropicais sul-americanas, próximo à área endêmica de malária, seu uso permite simular com maior precisão os efeitos de patógenos tropicais, considerando as interações ambientais e fisiológicas típicas desses cenários (ROSA et al., 2022; WADGYMAR et al., 2022).

Embora seu uso em estudos reprodutivos, especialmente relacionados à malária, ainda seja incipiente, *C. callosus* já demonstrou grande potencial em pesquisas sobre doenças parasitárias, como toxoplasmose (incluindo formas ocular e congênita), infecção por *Trypanosoma cruzi*, esquistossomose e leishmaniose (ROSA et al., 2022). Sua reatividade particular a diferentes parasitas reforça sua sensibilidade imunológica frente a infecções de relevância para a saúde humana (ROSA et al., 2022). Essa característica torna-o especialmente interessante para estudos envolvendo *Plasmodium* spp., como *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. vinckei* e, neste trabalho, *P. berghei* ANKA (PbA) (BOGITSH; OELTMANN; CARTER, 2013; SIFONTES, 2017). Devido à semelhança entre os sistemas imunológicos de roedores e humanos, esses modelos permitem investigar os mecanismos de resposta imunológica envolvidos na infecção e suas reações (LAMB et al., 2006; SIFONTES, 2017).

Assim, investigar os efeitos da malária sobre a fertilidade masculina em um modelo com maior proximidade ecológica e fisiológica a populações humanas naturalmente expostas pode expandir o conhecimento sobre os impactos sistêmicos do parasita e fornecer subsídios para estratégias de saúde pública voltadas à reprodução (LAMB et al., 2006; SIFONTES, 2017; WADGYMAR et al., 2022). Diante da escassez de estudos que integrem imunologia, parasitologia e reprodução em contextos tropicais, o uso de modelos alternativos como *C. callosus* representa um avanço em direção a uma abordagem científica mais realista, contextualizada e inovadora (ROSA et al., 2022; WADGYMAR et al., 2022).

Apesar de ser um modelo experimental eficiente, existem alguns fatores que precisam ser levados em consideração para o uso desse modelo, como: legalidade; princípios éticos; biossegurança; avaliação clínica; controle sanitário e bem-estar animal (Rosa et al., 2022). Sua captura e manutenção para fins científicos exigem autorização específica, além da aprovação por Comitê de Ética em Uso de Animais, devido à sua origem silvestre (ROSA et al., 2022)

1.3.2. Normas éticas e regulamentação de uso de animais

Buscando garantir que esses fatores estejam sendo atendidos na pesquisa com

animais, são necessárias práticas reguladas por órgãos como o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (INCA, 2024). O CEUA é responsável por analisar, aprovar e acompanhar projetos que envolvam animais, assegurando que o manejo, a contenção, a experimentação e a eutanásia estejam pautadas no bem-estar animal, incluindo o uso de programas de enriquecimento ambiental e avaliação veterinária constante. Além disso, o CEUA recomenda práticas de manejo que reduzam o estresse dos animais como no caso de roedores, evitar a manipulação pela cauda, e estratégias para manter a diversidade genética das colônias, minimizando capturas na natureza (INCA, 2024).

De modo semelhante, o CONCEA, órgão do Ministério da Ciência e Tecnologia, elabora normas rigorosas para a criação e utilização de animais em pesquisa, credenciando laboratórios e biotérios, além de promover a capacitação dos profissionais envolvidos (SBCAL, 2024).

A Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) reforça a importância dos princípios éticos da tríade 3Rs como base para a pesquisa responsável, sendo eles: substituição, propondo o uso de métodos alternativos que evitem ou substituam o uso de animais sempre que possível, como culturas celulares, modelos computacionais ou simulações *in vitro*; Redução, visando minimizar o número de animais utilizados nos experimentos, sem comprometer a validade científica, por meio de um planejamento experimental rigoroso e uso eficiente de dados; e refinamento, envolvendo a adoção de técnicas que reduzam o sofrimento e melhorem o bem-estar animal, como aprimoramento dos procedimentos, uso de anestesia adequada e monitoramento constante das condições de alojamento (SBCAL, 2024). Adicionalmente, a SBCAL destaca parâmetros ambientais ideais para o manejo dos animais, como controle de luminosidade, temperatura, umidade e ruído (SBCAL, 2024).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Analisar a influência da infecção por PbA na espermatogênese em *C. callosus*.

2.2. Objetivos específicos

- Medir parâmetros morfométricos dos túbulos seminíferos (diâmetro total, diâmetro do lúmen e altura do epitélio germinativo) comparando grupos controle e infectado;

- Analisar alterações histológicas nos testículos de animais infectados e controles por meio de colorações com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Gomori;
- Investigar alterações morfológicas nos espermatozoides de *C. callosus* infectados e controle por meio de colorações com HE;
- Quantificar e caracterizar anomalias nas regiões da cabeça e da cauda espermática em animais infectados e controles;
- Identificar a presença e a posição da gota citoplasmática em animais infectados e controles;
- Aplicar métodos estatísticos para análise comparativa dos dados morfológicos e histológicos obtidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Alojamento de animais

Roedores da espécie *C. callosus*, com nove semanas de idade e peso médio de 34 gramas, foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os experimentos foram previamente submetidos à apreciação do Comitê de Ética na Utilização de Animais, sob o número de protocolo 23117.074819/2023-04 (ANEXO 1).

Os animais foram alojados em mini isoladores específicos para a espécie, com entrada e exaustão de ar filtradas por filtros HEPA, posicionados em racks ventilados. Como leito, foi utilizado material autoclavado de maravalha proveniente de *Pinus eliotii*. A água foi filtrada e submetida à radiação ultravioleta, enquanto a ração foi autoclavada, sendo fornecida ad libitum. Os roedores foram randomizados ao chegarem e separados em dois grupos, infectados ($n = 6$) e não infectados ($n = 5$). Foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, em sala com controle de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\% \pm 5\%$).

3.2. Manutenção da cepa de PbA e infecção

Para os experimentos, a cepa de PbA foi mantida em nitrogênio líquido, sendo descongelada no momento do uso e inoculada por via intraperitoneal em fêmeas da linhagem C57BL/6. A partir dessas fêmeas, foram preparados inóculos com carga parasitária conhecida. Após as passagens, amostras de sangue foram coletadas da cauda

dos animais para esfregaço e observação da parasitemia, priorizando hemácias parasitadas em estágio de anel (trofozoítos imaturos). Em seguida, os animais foram anestesiados com doses de cetamina (100 mg/kg) associada a xilazina (10 mg/kg), e o sangue total foi coletado para a preparação do inóculo contendo 1×10^7 hemácias infectadas com PbA.

Machos da espécie *C. callosus* foram então infectados com a concentração descrita, por via intraperitoneal, para posterior análise morfológica dos testículos e espermatozoides obtidos a partir da cauda do epidídimo. Animais machos não infectados constituíram o grupo controle experimental.

3.3. Coleta de órgãos

Apesar do uso comum do anestésico isoflurano em experimentos com coleta de órgãos, segundo Zanin et al. (2023), a exposição aguda a essa substância pode afetar a motilidade espermática e induzir apoptose. Por essa razão, optou-se pela anestesia com cetamina e xilazina, administradas por via intraperitoneal, seguida por deslocamento cervical.

Após a eutanásia, os testículos foram coletados e fixados imediatamente em solução de Bouin para análise histológica. As caudas epididimárias de ambos os epidídimos foram dissecadas e colocadas em placas de Petri (35 mm) contendo 120 µL de solução salina (PBS), previamente aquecida a 37 °C. Foram realizados de cinco a sete cortes em cada cauda com auxílio de pinça e agulha, formando uma suspensão espermática. Após incubação por três minutos a 37 °C, foi realizado o esfregaço para análise morfológica dos espermatozoides.

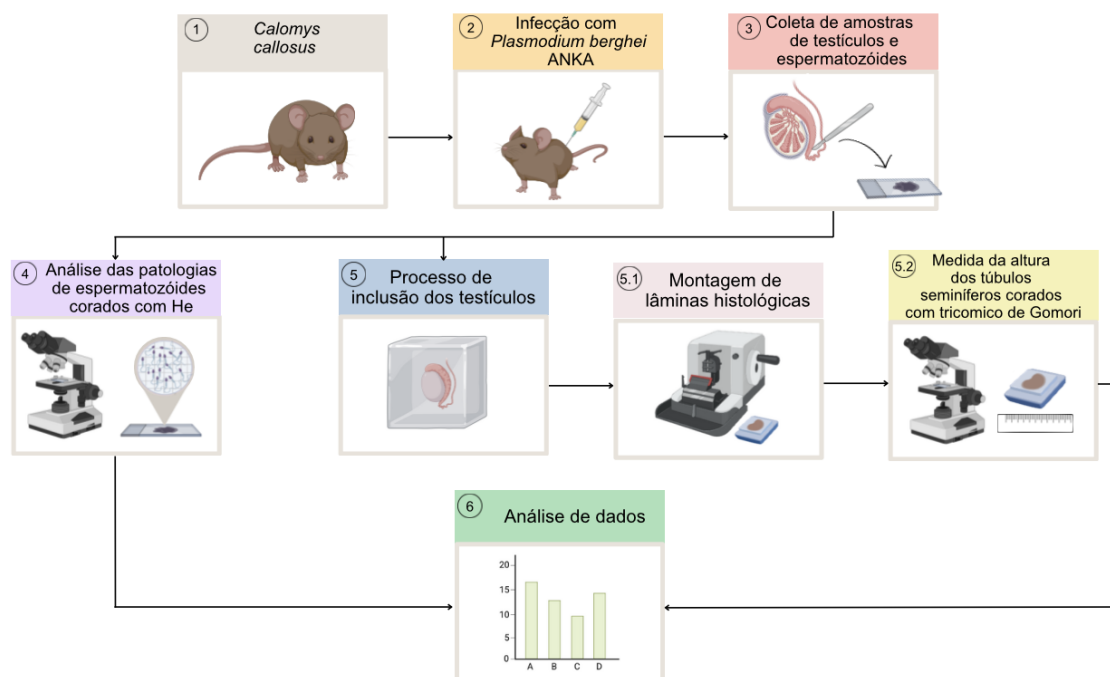


Figura 2: Delineamento experimental dos procedimentos utilizados para avaliar os efeitos da infecção por *P. berghei* ANKA em *C. callosus*. Inclui: infecção intraperitoneal e coleta de espermatozoides e testículos, seguida da análise morfológica do esfregaço espermático (HE) e histológica dos cortes de testículo (tricrômico de Gomori), seguida de quantificação e análise estatística.

3.4. Análise histológica testicular e morfométrica dos túbulos seminíferos

Os testículos fixados em Bouin por 4 horas à temperatura ambiente foram lavados em álcool 50% até a remoção do ácido pícrico residual. Posteriormente, foram mantidos em álcool 70% até a inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em seções de 4 µm em micrótomo, e as lâminas foram desparafinadas, hidratadas e coradas com HE e Tricrômico de Gomori.

As lâminas coradas com Tricrômico de Gomori foram analisadas no software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Foram avaliadas 40 seções transversais de túbulos seminíferos por animal. Para cada túbulo, duas mensurações da altura do epitélio germinativo foram feitas em lados opostos da parede, e sua média foi registrada. Também foi mensurado o diâmetro total do túbulo (borda a borda oposta), e o diâmetro do lúmen foi calculado pela fórmula:

$$\text{Diâmetro do lumen} = \text{Diâmetro total} - 2 \times (\text{altura média do epitélio})$$

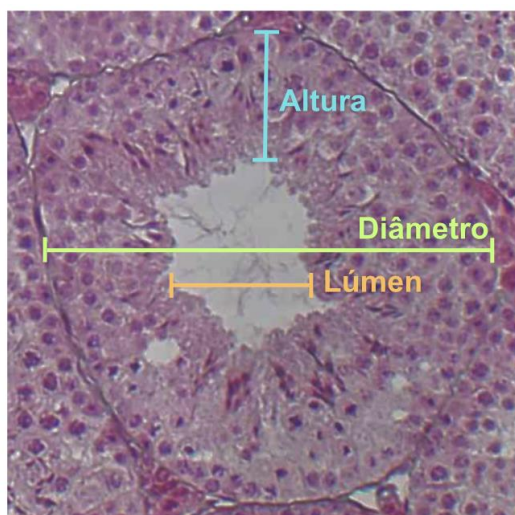


Figura 2: Túbulo seminífero com a representação das localidades de onde foram realizadas as medidas de altura, diâmetro e lúmen. Corte histológico do testículo de *C. callosus*, corado com tricômio de Gomori.

3.5. Análise da morfologia e morfometria dos espermatozoides

A avaliação morfológica dos espermatozoides foi feita por esfregaço em lâmina, obtido após dissecação da cauda dos epidídimos. As lâminas foram coradas com HE, conforme Vieira et al. (2024), e analisadas em microscópio óptico com objetiva de 100x e óleo de imersão. Para cada animal, foram analisados 200 espermatozoides.

Foram quantificados espermatozoides com morfologia normal e com patologias nas regiões da cabeça (sem cabeça, sem gancho, estreita, macrocefálica, amorfa) e cauda (sem cauda, dobrada, enrolada, apenas peça intermediária e fortemente enrolada). A gota citoplasmática, embora não considerada patologia, foi avaliada por seu valor funcional, sendo classificada quanto à sua posição: proximal, distal ou pseudogota.

As análises da cabeça e cauda foram feitas separadamente. Um espermatozoide considerado “normal” na determinada região analisada poderia ou não apresentar defeito na outra. Já na análise da gota citoplasmática, apenas foram considerados “normais” os espermatozoides sem qualquer anormalidade morfológica.

3.6. Análise estatística

Gráficos e análises estatísticas foram realizados no software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para dados com distribuição normal, utilizou-se Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni ou teste t. Dados com distribuição não normal foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Resultados foram expressos

como média $\pm$ erro padrão da média (SEM), sendo consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Impacto da infecção por PbA no peso corporal de *C. callosus*

A relação entre a infecção por *Plasmodium* e a espermatogênese em roedores ainda é pouco compreendida. Para investigar essa associação, roedores da espécie *C. callosus* foram inoculados com 1×10^7 hemácias infectadas por *P. berghei* ANKA. O peso corporal dos animais foi monitorado a cada dois dias, durante 15 dias pós-infecção. Nenhum dos indivíduos evoluiu a óbito ao longo do período, embora os animais infectados tenham apresentado sinais clínicos evidentes de adoecimento, como pelagem eriçada e comportamento prostrado, com variação na intensidade dos sintomas entre os indivíduos.

Inicialmente, observou-se uma variação de peso semelhante entre os grupos controle (NI) e infectado (PbA) até o sétimo dia pós-infecção, com oscilações discretas, entre 0% e aproximadamente 4%. No entanto, entre os dias 8 e 12, o grupo NI manteve um padrão de ganho de peso, enquanto o grupo PbA apresentou estabilização seguida por declínio. A partir do 14º dia, os animais infectados registraram uma perda de peso estatisticamente significativa, aproximando-se de 0% de variação, em contraste com o grupo controle, que atingiu o maior ganho acumulado (~5%) no período analisado (Figura 3).

É importante destacar uma perda de peso inesperada no grupo controle (NI) entre os dias 14 e 15, observada em dois dos cinco animais. Embora sua causa não tenha sido identificada, essa oscilação pontual, ocorrida no último dia experimental, não compromete a análise dos dados nem invalida a diferença estatística observada entre os grupos.

Esses resultados indicam que o grupo infectado (PbA) apresentou um padrão distinto, caracterizado por estabilização e posterior perda de peso nos dias finais do experimento, em oposição ao ganho contínuo observado no grupo controle.

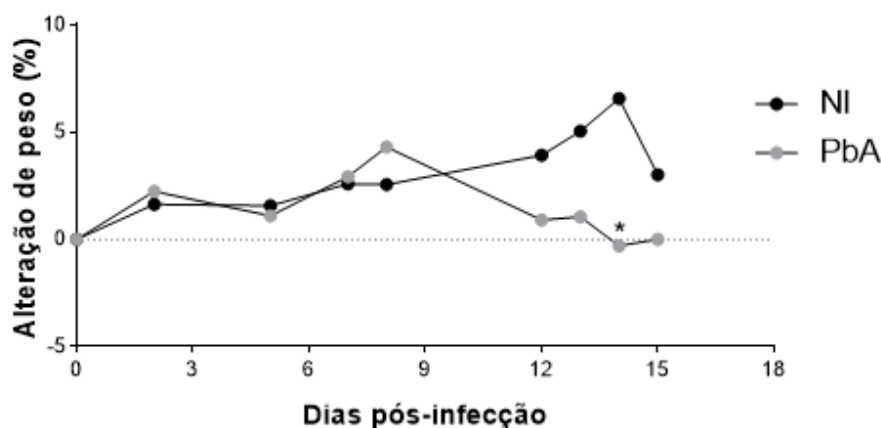


Figura 3: Gráfico representativo da variação de peso ao longo dos dias após a infecção, comparando animais infectados com *P. berghei* ANKA (PbA) e não infectados (NI). Observa-se uma queda significativa de peso nos animais infectados no décimo terceiro dia. Diferenças estatísticas (* $P < 0.05$) entre os grupos foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Resultados semelhantes foram descritos por Shimada et al. (2019), que relataram perda de peso significativa em camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA. No estudo citado, os animais apresentaram perda de peso entre os dias 13 e 15 (BALB/c) e entre os dias 6 e 8 (C57BL/6), padrão próximo ao observado com *C. callosus* no presente trabalho.

É relevante mencionar que a parasitemia não foi monitorada ao longo do experimento, o que limita a correlação direta entre carga parasitária, manifestações clínicas e perda de peso. Para uma compreensão mais abrangente dessa dinâmica, recomenda-se que estudos futuros incluam o monitoramento da parasitemia em intervalos regulares.

4.2. Análise morfológica do túbulo seminífero

Com o objetivo de avaliar o impacto da infecção por *P. berghei* ANKA sobre a espermatogênese, foi realizada uma análise morfofisiológica dos túbulos seminíferos, estruturas essenciais à produção de gametas masculinos (LIRA NETO et al., 2016). Parâmetros como altura do epitélio seminífero, diâmetro tubular e tamanho do lúmen são considerados indicadores sensíveis da integridade do processo espermatogênico e do microambiente testicular, refletindo possíveis alterações estruturais que comprometam a função reprodutiva (LARA et al., 2018).

A análise histológica dos testículos corados com HE não revelou alterações

patológicas evidentes nos túbulos seminíferos de animais infectados (PbA) quando comparados ao grupo controle (Figura 4). Conforme descrito por Lara et al. (2018), os testículos de mamíferos em condições fisiológicas normais apresentam morfologia altamente organizada e relativamente constante. Esse padrão foi mantido neste estudo, indicando que a infecção por PbA, nas condições analisadas, não foi suficiente para promover alterações histológicas significativas na arquitetura testicular.

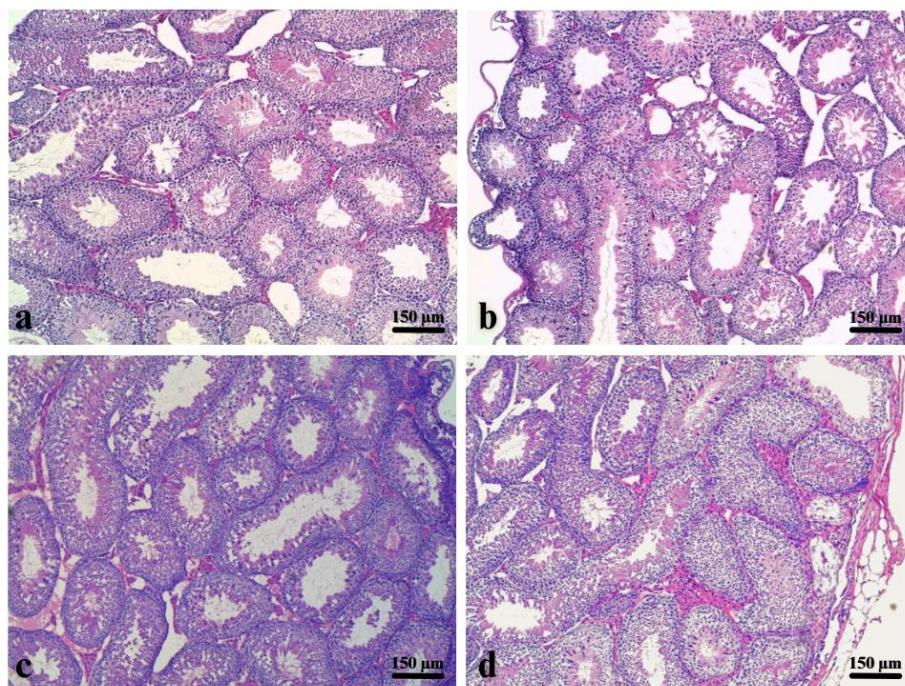


Figura 4: Comparação histológica transversal dos testículos de *C. callosus* nos grupos não infectados (NI, imagens a e b) e infectados com *P. berghei* ANKA (PbA, imagens c e d). Os cortes foram corados com HE e observados em microscópio óptico com objetiva 10x. Observa-se a estrutura dos túbulos seminíferos (TS). Escala da imagem: 150 µm.

Por outro lado, a análise estatística individual dos túbulos seminíferos corados com tricrômico de Gomori revelou alterações morfométricas significativas em animais infectados. Houve redução na altura epitelial dos túbulos seminíferos (Figura 5a), com médias aproximadas de 140 µm para o grupo controle e 118 µm para o grupo PbA. Também foi observada diminuição significativa no diâmetro dos túbulos (Figura 5b), com valores médios de 438 µm (NI) e 390 µm (PbA).

Em contrapartida, o diâmetro do lúmen não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 5c), com médias de 160 µm (NI) e 150 µm (PbA), indicando que esse parâmetro não foi substancialmente afetado pela infecção.

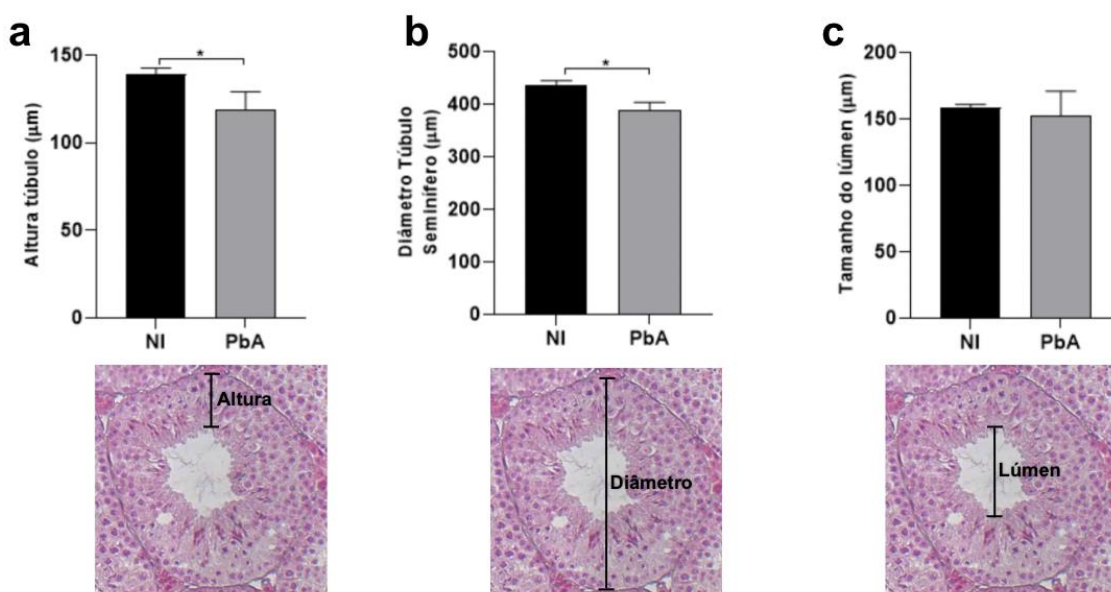


Figura 5: Representação gráfica e microfotográfica das dimensões dos túbulos seminíferos de *C. callosus* nos grupos NI e PbA. Os gráficos mostram: a) altura epitelial; b) diâmetro tubular; e c) diâmetro do lúmen. Abaixo de cada gráfico, imagens ilustrativas das respectivas mensurações, obtidas a partir de cortes testiculares corados com tricrômico de Gomori. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney (altura epitelial) e teste T (diâmetro tubular e lúmen), sendo consideradas significativas quando $P < 0.05$ (*).

Neste estudo, os animais não infectados apresentaram médias de 139,36 μm para altura do epitélio germinativo, 437,23 μm para diâmetro tubular e 158,51 μm para diâmetro do lúmen. Já os animais infectados mostraram reduções nesses parâmetros, com médias de 118,51 μm , 389,55 μm e 152,52 μm , respectivamente. Esses dados indicam comprometimento da espermatogênese, possivelmente decorrente da infecção malárica, com impacto morfológico mensurável.

Ao comparar os valores obtidos com a literatura, observa-se que os parâmetros morfométricos do grupo controle são superiores aos relatados por Moreira et al. (2009) em camundongos controles, cujas médias foram de 60,48 μm (altura do epitélio) e 192,95 μm (diâmetro tubular). França e Russell (1998) também relatam que, na maioria dos mamíferos, o diâmetro dos túbulos seminíferos varia entre 180 e 300 μm , e a altura epitelial entre 60 e 100 μm . Os valores registrados neste estudo ultrapassam essas faixas.

Essa discrepância pode ser atribuída a diversos fatores, como características do modelo experimental, diferenças metodológicas, idade dos animais, linhagens utilizadas, condições ambientais e de manejo, incluindo dieta e alojamento.

Além disso, os parâmetros morfométricos avaliados são influenciados por fatores estruturais e funcionais como o número de camadas de células mioides na túnica própria,

o tamanho e densidade das células de Sertoli e germinativas, bem como a produção de fluido seminífero. Essas variáveis apresentam considerável variação entre espécies e até mesmo entre linhagens da mesma espécie, como apontado por Paula (1999), contribuindo para as diferenças observadas entre os dados deste estudo e os descritos na literatura.

4.3. Análise morfológica espermática de patologias em animais não infectados e infectados por PbA

4.3.1. Cabeça e cauda

Considerando que os túbulos seminíferos são responsáveis pela produção dos espermatozoides e que alterações morfofisiológicas nesses compartimentos podem refletir distúrbios no processo espermatogênico (JAN et al., 2012; LIRA NETO et al., 2016), as reduções significativas observadas na altura do epitélio germinativo e no diâmetro tubular dos animais infectados por *P. berghei* ANKA indicam um possível comprometimento funcional desse processo. Diante disso, tornou-se pertinente investigar a morfologia dos gametas produzidos, visto que alterações nesse contexto podem resultar em espermatozoides estruturalmente anômalos e funcionalmente comprometidos (VIEIRA et al., 2024).

Para a análise morfológica espermática, foram coletados espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo, região terminal onde essas células já deveriam se apresentar morfolologicamente maduras, com alto grau de compactação nuclear e motilidade preservada (COOPER, 2010; SOARES; MACHADO-NEVES, 2020). A escolha dessa região teve como objetivo garantir que eventuais alterações observadas fossem resultado de falhas na espermatogênese ou na maturação epididimária, e não de variações fisiológicas esperadas em estágios anteriores.

Com base na avaliação morfológica dos espermatozoides, realizada a partir das lâminas histológicas coradas com HE, foram identificadas cinco alterações distintas na cabeça dos gametas: ausência de cabeça (apenas cauda), ausência do gancho cefálico, forma estreita, macrocefalia e morfologia amorfa (VIEIRA et al., 2024) (Figura 6).

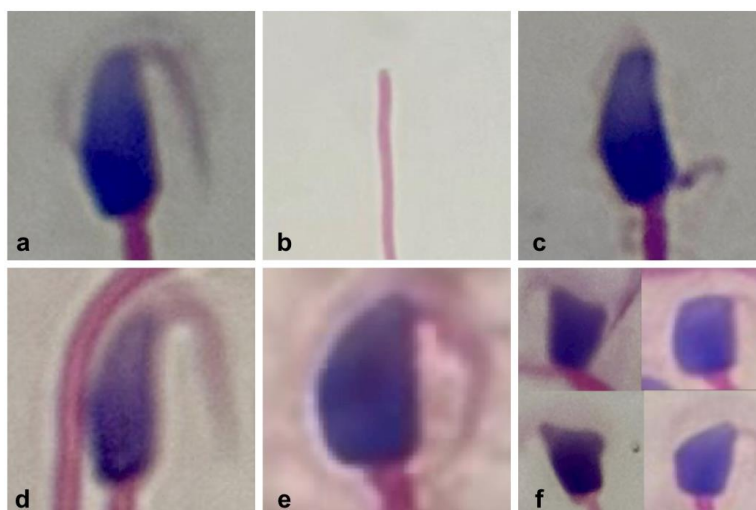


Figura 6: Imagens representativas dos tipos de patologias encontradas nas cabeças dos espermatozoides nas lâminas histológicas com esfregaço espermático coradas com HE. (a) normal, (b) sem cabeça, (c) sem gancho, (d) estreita, (e) macrocefálica e (f) amorfa. Imagens produzidas pela autora.

Essas alterações morfológicas comprometem diretamente a funcionalidade do espermatozoide (VIEIRA et al., 2024). A análise quantitativa das anomalias na morfologia da cabeça revelou um aumento significativo na frequência de espermatozoides com cabeça estreita no grupo PbA (média: $\sim 5,5 \pm 2,5$), em comparação ao grupo NI (média: $\sim 0,7 \pm 0,4$). Em contraste, as demais alterações, como ausência de cabeça, ausência de gancho, macrocefalia e forma amorfa, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 7). Esses resultados indicam que a infecção pode impactar na ocorrência de espermatozoides com cabeça estreita, sugerindo uma possível instabilidade do material genético devido a defeitos na compactação nuclear (KUSUMAWATI et al., 2024), interferir na penetração na zona pelúcida, na motilidade e na entrega adequada do material genético (CHANG et al., 2017; VIEIRA et al., 2024).

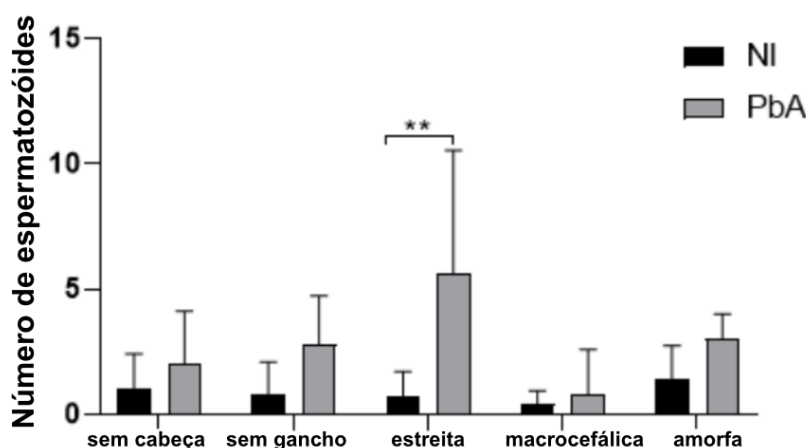


Figura 7: Tipos de alterações morfológicas na cabeça dos espermatozoides nos grupos NI e PbA. Os parâmetros analisados incluem sem cabeça, sem gancho, estreita, macrocefálica e amorfa. Resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas (* $P < 0.05$) entre os grupos foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Diante da identificação de alterações morfológicas relevantes na cabeça dos espermatozoides, foi realizada uma análise comparativa da proporção total de espermatozoides com cabeças normais e patológicas entre os grupos. Essa abordagem teve como objetivo avaliar se a infecção por *P. berghei* ANKA influenciava de forma geral a incidência de alterações cefálicas. Os resultados demonstraram que o grupo NI apresentou uma proporção significativamente maior de espermatozoides com cabeça morfolologicamente normal, enquanto o grupo PbA exibiu uma frequência significativamente maior de anomalias cefálicas (Figura 8), reforçando o impacto negativo da infecção sobre a qualidade espermática.

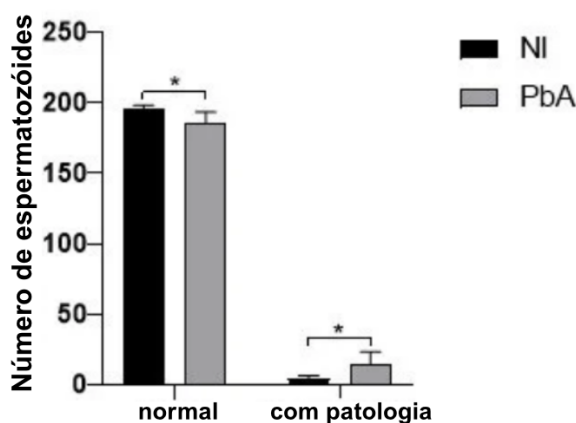


Figura 8: Quantificação do número de espermatozoides com morfologia normal e com patologias na cabeça nos grupos NI e PbA. Para esse gráfico, foi avaliada apenas a cabeça dos espermatozoides, não levando em consideração possíveis defeitos na cauda. Resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas (* $P < 0.05$) entre os grupos foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Para a análise da cauda dos espermatozoides, foram observados cinco tipos de patologias: ausência de cauda (somente cabeça), cauda dobrada, enrolada, somente peça intermediária (midpiece) e cauda fortemente enrolada (VIEIRA et al., 2024) (Figura 9).



Figura 9: Imagens representativas dos tipos de patologias encontradas na cauda dos espermatozoides nas lâminas histológicas com esfregaço espermático coradas com HE. (a) normal, (b) sem cauda, (c) dobrada, (d) enrolada, (e) midpiece e (f) fortemente enrolada. Imagens produzidas pela autora.

Segundo Touré et al. (2021), alterações no flagelo, como cauda dobrada, enrolada ou curta, estão frequentemente associadas à astenozoospermia (redução ou ausência de mobilidade), comprometendo a capacidade de fertilização e contribuindo para a infertilidade masculina. A ausência da cauda, especialmente, está diretamente associada à incapacidade de locomoção, impedindo que o espermatozoide alcance e fecunde o óvulo. A avaliação das alterações morfológicas na cauda demonstrou que a principal anomalia observada foi a cauda dobrada, tanto no grupo NI (média: $\sim 145 \pm 4$) quanto no PbA (média: $\sim 145 \pm 7$). Embora o número de espermatozoides com cauda dobrada tenha sido elevado em ambos os grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre eles. As demais categorias (ausência de cauda, apenas midpiece, cauda enrolada e fortemente enrolada) apresentaram baixa frequência e não variaram significativamente entre os grupos (Figura 10).

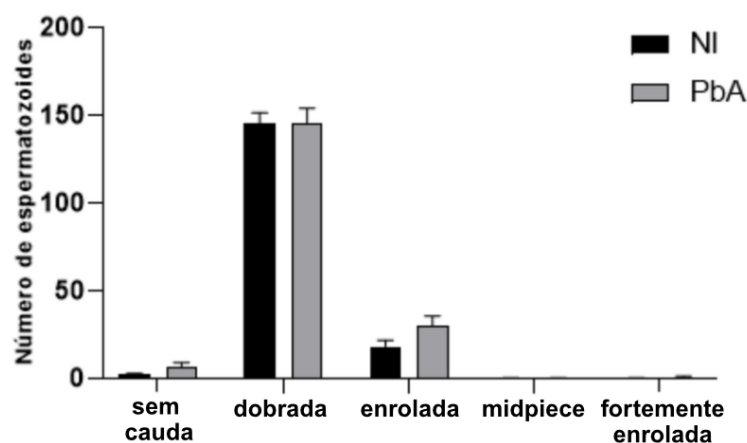


Figura 10: Tipos de alterações morfológicas na cauda dos espermatozoides nos grupos NI e PbA. Os parâmetros analisados incluem ausência de cauda, cauda dobrada, cauda enrolada, somente midpiece e cauda fortemente enrolada. Resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas entre os grupos foram calculadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

De forma análoga à análise da cabeça, avaliou-se a proporção de espermatozoides com caudas normais e alteradas. Os animais infectados com *P. berghei* ANKA apresentaram uma redução estatisticamente significativa no número de espermatozoides com cauda morfolologicamente normal, com menos de 20 espermatozoides entre os 200 analisados. Embora ambos os grupos tenham exibido alta frequência de alterações flagelares, o grupo não infectado apresentou um número significativamente menor de espermatozoides com patologias de cauda (Figura 11).

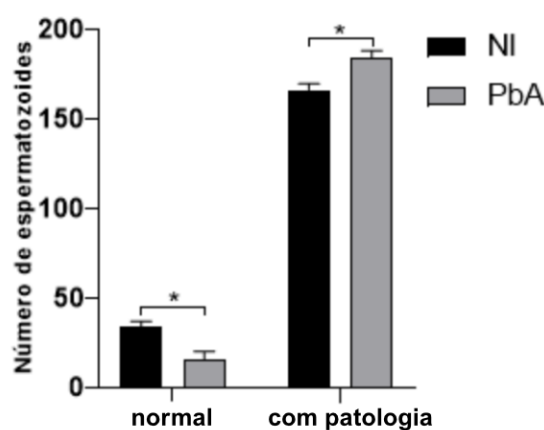


Figura 11: Quantificação do número de espermatozoides com morfologia normal e com patologias na cauda nos grupos NI e PbA. Foi avaliada apenas a cauda dos espermatozoides em NI e PbA, não levando em consideração possíveis defeitos na cabeça. Resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas (* $P < 0.05$) entre os grupos foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

4.3.2. Gota citoplasmática

Dentre os parâmetros avaliados, a gota citoplasmática foi incluída por seu valor como marcador funcional de espermiogênese, que, em condições normais, é eliminada ao longo do trajeto pelo epidídimo, sobretudo antes de atingir a cauda (COOPER, 2010; SOARES; MACHADO-NEVES, 2020). Sua persistência em espermatozoides maduros é frequentemente associada a disfunções no processo de maturação celular e pode comprometer parâmetros importantes da fertilidade, como motilidade e integridade

mitocondrial (XU et al., 2013). Nesse contexto, avaliamos não apenas a presença da gota, mas também sua localização (proximal, distal ou pseudogota) (COOPER, 2010), a fim de compreender se havia alterações qualitativas nesse processo nos animais infectados PbA.

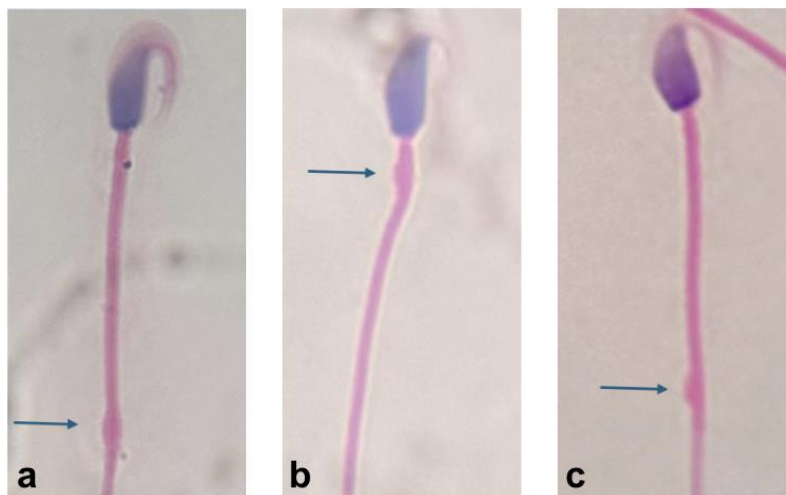


Figura 12: Imagens representativas dos tipos de gotas citoplasmáticas encontradas na cauda dos espermatozoides nas lâminas histológicas com esfregaço espermático coradas com HE. (a) distal, (b) proximal e (c) pseudogota.

Os resultados demonstraram que, nos dois grupos experimentais (NI e PbA), as localizações mais frequentes da gota citoplasmática foram as regiões distal e pseudogota, sendo a porção proximal a menos observada (Figura 13). De acordo com Cooper (2010) e Soares e Machado-Neves (2020), o trajeto normal da gota durante a espermiogênese envolve sua migração da porção proximal para a distal da peça intermediária, até sua eliminação completa no epidídimo. Dessa forma, a predominância da gota na região distal é compatível com espermatozoides próximos do final do processo de maturação epididimária. Já a presença de pseudogotas, estruturas aberrantes que não seguem o padrão migratório fisiológico, indica uma possível falha no processo de eliminação citoplasmática, associada a disfunções na espermiogênese ou à alteração do ambiente epididimário (XU et al., 2013; DÍAZ-MIRANDA et al., 2019).

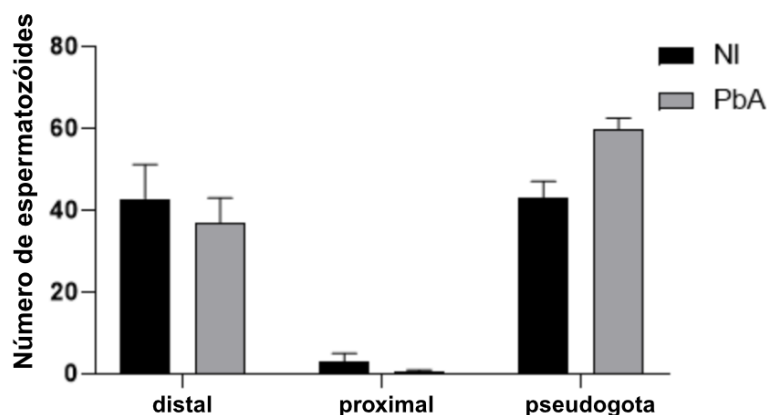


Figura 13: Distribuição das localizações da gota citoplasmática nos espermatozoides dos grupos NI e PbA. Foram avaliadas as posições distal, proximal e pseudogota. Resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas entre os grupos foram calculadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Além disso, foi avaliado se a presença da gota estava associada à ocorrência de anormalidades morfológicas nos espermatozoides. A partir disso, observou-se uma proporção semelhante de espermatozoides com gota, independentemente de apresentarem outras patologias ou não, entre os grupos. Foi possível observar apenas uma tendência de maior frequência de pseudogotas no grupo infectado (PbA) em relação ao controle (NI), quando analisados em conjunto. No entanto, essa diferença não alcançou relevância estatística, conforme demonstrado na análise gráfica (Figura 14). Por isso, mesmo que pseudogotas em espermatozoides oriundos da cauda do epidídimo (região onde, fisiologicamente, essa estrutura já deveria ter sido eliminada) possam indicar um comprometimento sutil no processo de maturação espermática, nas condições experimentais avaliadas, a infecção por *P. berghei* ANKA não foi capaz de induzir alterações significativas na frequência ou no padrão de localização da gota citoplasmática.

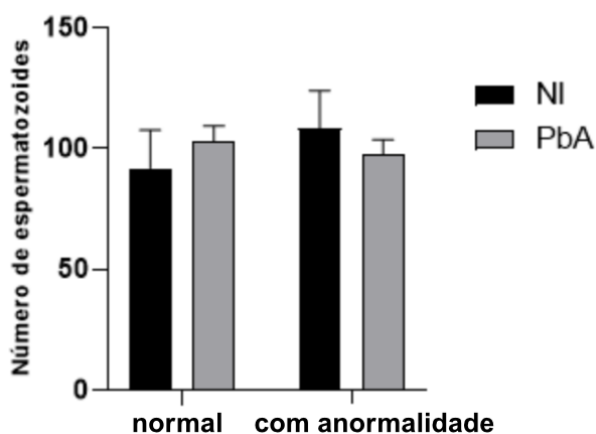


Figura 14: Proporção de espermatozoides com morfologia normal e com gota citoplasmática nos grupos NI e PbA. Desta vez, a proporção foi realizada levando em consideração todas as possíveis patologias de cabeça e cauda, de maneira que o espermatozoide aqui considerado "normal" não apresenta nenhuma patologia ou anormalidade, sendo totalmente saudável. Resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas entre os grupos foram calculadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

4.3.3. Análise geral

Por fim, ao considerar de forma conjunta as principais anormalidades espermáticas, incluindo alterações na cabeça, cauda e a presença da gota citoplasmática, foi possível identificar um prejuízo morfológico significativo nos espermatozoides de animais infectados com PbA. Como ilustrado na Figura 15, o grupo infectado apresentou uma redução estatisticamente significativa na quantidade de espermatozoides morfolologicamente normais quando comparado ao grupo controle. Paralelamente, no grupo controle foi observado um número significativamente menor de espermatozoides com pelo menos uma anomalia estrutural, evidenciando um comprometimento global na qualidade espermática dos animais infectados.

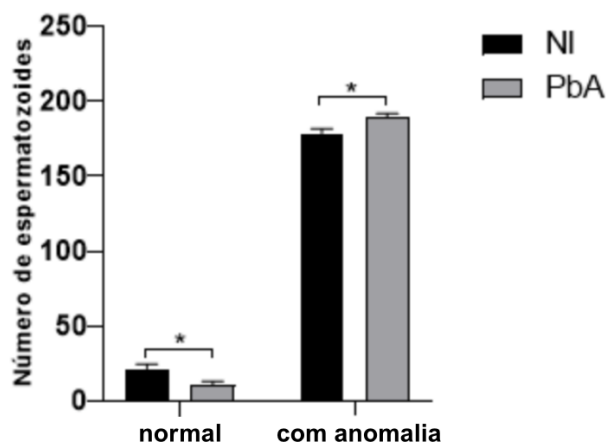


Figura 15: Quantificação e comparação de espermatozoides morfolologicamente normais (completamente saudável) e com pelo menos uma anomalia (gota citoplasmática, alteração na cauda ou na cabeça) em animais NI e PbA. Resultados foram expressos como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas (* $P < 0.05$) entre os grupos foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Esses achados indicam que a infecção por *P. berghei* ANKA afeta de maneira abrangente a morfologia dos espermatozoides de *C. callosus*, possivelmente interferindo em múltiplos processos fisiológicos relacionados à espermatogênese e à maturação

epididimária. A redução do número de espermatozoides morfológicamente íntegros, associada ao aumento de formas anormais na cabeça, cauda e presença de gota citoplasmática, sugere um comprometimento da qualidade espermática em diversos níveis.

Mecanismos como o estresse oxidativo testicular, já descrito por Ekhoie et al. (2019) em modelos murinos infectados com *Plasmodium*, podem explicar parte desses efeitos, uma vez que a peroxidação lipídica e a redução da atividade de enzimas antioxidantes afetam diretamente a integridade das células germinativas. Além disso, a queda nos níveis de testosterona observada nesses modelos reforça a hipótese de disfunção do eixo hipotálamo–hipófise–gonadal, condição que compromete tanto a produção quanto a maturação espermática (RAJI et al., 2006; EKHOYE et al., 2019).

Outros fatores sistêmicos, como o estresse térmico causado por febre elevada (ABDELHAMID et al., 2019) e a hipóxia testicular decorrente da anemia (LI et al., 2021; ISLAM et al., 2023), também devem ser considerados como possíveis contribuidores para a piora dos parâmetros espermáticos observados. Por fim, a modulação imunológica induzida por hormônios sexuais masculinos, conforme discutido por Aguilar-Castro et al. (2022), pode influenciar a severidade da infecção e seus efeitos sobre a função reprodutiva masculina.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a infecção por *P. berghei* ANKA compromete significativamente a morfologia espermática e a integridade dos túbulos seminíferos em *C. callosus*, mesmo na ausência de alterações histopatológicas evidentes. As reduções observadas na altura do epitélio germinativo e no diâmetro tubular, associadas ao aumento de anomalias morfológicas em cabeça, cauda e presença de gota citoplasmática, indicam prejuízos na espermatogênese e na maturação epididimária.

Essas alterações sugerem que a malária pode impactar negativamente a fertilidade masculina, possivelmente por mecanismos multifatoriais, incluindo estresse oxidativo testicular (EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019), disfunções hormonais com redução da testosterona e do eixo hipotálamo–hipófise–gonadal (RAJI; AKINSOMISOYE; AZEEZ, 2006; EKHOYE; ALOAMAKA; NWANGWA, 2019), estresse térmico decorrente da febre (ABDELHAMID et al., 2019), hipóxia testicular causada pela anemia (ISLAM; DHAR; RAHMAN, 2023; LI et al., 2021) e modulação imunológica influenciada pelos hormônios sexuais (AGUILAR-CASTRO et al., 2022).

Os achados reforçam a importância do estudo dos efeitos sistêmicos da infecção malárica, especialmente sobre o sistema reprodutor masculino, ainda pouco explorado na literatura. Dessa forma, o modelo experimental com *C. callosus* se mostra promissor para a investigação dos efeitos da malária sobre a fisiologia reprodutiva, contribuindo para a compreensão de possíveis consequências subestimadas da doença.

Estudos futuros devem não apenas aprofundar os mecanismos moleculares envolvidos, mas também avaliar se as alterações morfológicas observadas de fato comprometem a fertilidade funcional. Ainda não se sabe se essas anomalias espermáticas interferem significativamente na capacidade reprodutiva dos indivíduos afetados.

6. REFERÊNCIAS

ABDELHAMID, Mohamed Hadi Mohamed; WALSCHAERTS, Marie; AHMAD, Gulfam; MIEUSSET, Roger; BUJAN, Louis; HAMDI, Safouane. Mild experimental increase in testis and epididymis temperature in men: effects on sperm morphology according to spermatogenesis stages. **Translational Andrology and Urology**, v. 8, n. 6, p. 651–665, dez. 2019. DOI: 10.21037/tau.2019.11.18.

AGUILAR-CASTRO, Jesús et al. Testosterone induces sexual dimorphism during infection with *Plasmodium berghei* ANKA. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 27 set. 2022.

AU, Catherine E.; HERMO, Louis; BYRNE, Elliot; SMIRLE, Jeffrey; FAZEL, Ali; KEARNEY, Robert E.; SMITH, Charles E.; VALI, Hojatollah; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, Julia; SIMON, Paul H. G.; MANDATO, Craig; NILSSON, Tommy; BERGERON, John J. M. Compartmentalization of membrane trafficking, glucose transport, glycolysis, actin, tubulin and the proteasome in the cytoplasmic droplet/Hermes body of epididymal sperm. **Open Biology**, v. 5, n. 8, art. 150080, ago. 2015. DOI: 10.1098/rsob.150080.

BOGITSH, Burton J.; OELTMANN, Thomas N.; CARTER, Clint E. human parasitology. **Boston Academic Press**, 2013.

BRYANT, Camron D. The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1245, p. 31–33, dez. 2011. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06325.x.

CHANG, Violeta; HEUTTE, Laurent; PETITJEAN, Caroline; HÄRTEL, Steffen; HITSCHFELD, Nancy. Automatic classification of human sperm head morphology. **Computers in Biology and Medicine**, v. 84, p. 205–216, 1 maio 2017. DOI: 10.1016/j.compbimed.2017.03.029.

COOPER, Trevor G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, Xangai, v. 13, n. 1, p. 130–138, 15 nov. 2010. DOI: 10.1038/aja.2010.97.

DÍAZ-MIRANDA, E. A.; MAITAN, P. P.; MACHADO, T. P.; CAMILO, B. S.; LIMA, D. A.; OKANO, D. S.; PENITENTE-FILHO, J. M.; MACHADO-NEVES, M.; OLIVEIRA, L. L. de; GUIMARÃES, S. E. F.; COSTA, E. P. da; GUIMARÃES, J. D. Disruption of bovine sperm functions in the presence of aplastic midpiece defect. **Andrology**, v. 8, n. 1, p. 201–210, jan. 2020. DOI: 10.1111/andr.12618.

EKHOYE, E. I.; ALOAMAKA, C. P.; NWANGWA, E. K. Alterations in gonadal oxidative stress markers and reproductive function of Balb/C mice infected with *Plasmodium berghei*. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 131–139, 2019.

FISHER, Heidi S.; GIOMO, Leonida; HOEKSTRA, Hopi E. Performance and sperm aggregation in *Peromyscus* mice. **Cells**, v. 10, 2021.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, F. (Eds). *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, 1998.

FUJIOKA, H; AIKAWA, M. Structure and Life Cycle. **Chem Immunol Allergy**, v. 80, 2002.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Fiocruz). Malária. Portal Fiocruz, 2025. Disponível em: <https://fiocruz.br/taxonomia-geral-05-doencas/malaria>. Acesso em: abr. 2025.

HARBACH, R E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bull Entomol Res.**, dez. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/INCA). 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/pesquisa/comites-e-comissoes/comite-de-etica-no-uso-de-animais-ceua-inca>. Acesso em: 20 abr. 2025.

ISLAM, Md Rezaul; DHAR, Puja S.; RAHMAN, Md Mominur. Recently outbreak of malaria in current world: species, etiology, life cycle, transmission, symptoms, vaccination, diagnostic tests, treatment, and complications. **International journal of surgery (London, England)**, v. 109, n. 2, p. 175–177, 1 fev. 2023.

JAN, Sabrina Z. et al. **Molecular control of rodent spermatogenesis. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, dez. 2012

JOKURA, Tiago. Imunização pioneira. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, ed. 309, nov. 2021. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/imunizacao-pioneira/>. Acesso em: jan. 2025.

KAMIENICZNA, M.; STACHOWSKA, E.; AUGUSTYNOWICZ, A.; WOŹNIAK, T.; KURPISZ, M. K. Human live spermatozoa morphology assessment using digital holographic microscopy. **Scientific Reports**, v. 12, p. 4846, mar. 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-08798-6.

KUSUMAWATI, Asmarani; SATRIO, Faisal Amri; INDRIASTUTI, Rhesti;

ROSYADA, Zulfi Nur Amrina; PARDEDE, Berlin Pandapotan; AGIL, Muhammad; PURWANTARA, Bambang. Sperm head morphology alterations associated with chromatin instability and lack of protamine abundance in frozen-thawed sperm of Indonesian local bulls. **Animals (Basel)**, Basel, v. 13, n. 15, p. 2433, 27 jul. 2023. DOI: 10.3390/ani13152433.

LAMB, Tracey J et al. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, p. 1–22, mar. 2006.

LARA, Nathália L. M.; COSTA, Guilherme M. J.; AVELAR, Gleide F.; LACERDA, Samyra M. S. N.; HESS, Rex A.; FRANÇA, Luiz R. de. Testis physiology—overview and histology. In: JÉGOU, Bernard; SKINNER, Michael K. (Ed.). *Encyclopedia of reproduction*. 2. ed. Amsterdam: **Elsevier**, v. 1, p. 105-116, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64567-1>

LENNON-PIERCE, M.; EPPIG, J. T. *Encyclopedia of Immunology*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1998.

LI, Zhibin et al. Effects of environmental and pathological hypoxia on male fertility. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 725933, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.725933>.

LIRA NETO, F. T.; BACH, P. V.; NAJARI, B. B.; LI, P. S.; GOLDSTEIN, M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 59, p. 10-26, nov. 2016. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.04.009.

LIU, Jiali; HERMO, Louis; DING, Deqiang; WEI, Chao; MANN, Jeffrey M.; YAN, Xiaoyuan; MELNICK, Ashley F.; WU, Yingjie; WITHROW, Alicia; CIBELLI, Jose; HESS, Rex A.; CHEN, Chen. SYPL1 defines a vesicular pathway essential for sperm cytoplasmic droplet formation and male fertility. **Nature Communications**, Londres, v. 14, art. 5113, 22 ago. 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-40859-1.

MILNER, Danny A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2018.

MOOJEN, João. *Os roedores do Brasil*. [S.l.]: [s.n.], 1952

MORAIS, A. C. T.; BARBOSA, L. P.; NEVES, M. M.; MATTA, S. L. P.; MORAIS, D. B.; MELO, B. E. S. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real [Morphophysiological parameters of mice (*Mus musculus*) testicles supplemented with royal jelly]. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 110-118, 2009.

MOREIRA, D. G.; PATRÍCIO, L. C. C.; PORTO, M. L.; FERRAZ, M. R.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA, M. F. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 141–147, fev. 2009. DOI: 10.1590/S0102-09352009000100016.

MORETTI, Elena et al. The relevance of sperm morphology in male infertility. **Frontiers**

in **Reproductive Health**, v. 4, ago. 2022.

MOURA, C. S.; GUERRA, M. M. P.; SILVA JÚNIOR, V. A.; SILVA, C. G. C.; CAJU, F. M.; ALVES, L. C. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 799-808, 2006.

NILSSON, Sandra K et al. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. **PLoS Pathog**, jun. 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. OMS recomenda vacina inovadora contra malária para crianças em risco. 6 out. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/6-10-2021-oms-recomenda-vacina-inovadora-contramalaria-para-criancas-em-risco>. Acesso em: jan. 2025.

PAULA, T. A. R. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 1999. 84 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

POTTER, M. History of the BALB/c Family. In: *The BALB/c Mouse: Genetics and Immunology*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1985. p. 1–5. DOI: 10.1007/978-3-642-70740-7_1.

PRUDÊNCIO, Miguel; RODRIGUEZ, Ana; MOTA, Maria M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 849–856, 2006. DOI: **10.1038/nrmicro1529**.

RAJI, Y.; AKINSOMISOYE, O. S.; AZEEZ, M. O. Impact of the malaria parasite on reproductive indices of male mice. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 5, n. 3, p. 201-209, ago. 2006. DOI: 10.1111/j.1447-0578.2006.00142.x.

RODRIGUES, Andrea Duran. Papel do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na infecção por Plasmodium berghei NK65GFP durante a gestação em camundongos C57BL/6. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia**, 25 fev. 2022.

ROGERSON, Stephen J.; UNGER, Holger W. Pregnancy and malaria: the perfect storm. **Current Opinion in Infectious Diseases**, p. 410–416, out. 2022.

ROSA, Rafael Borges; COSTA, Mylla Spirandelli da; TEIXEIRA, Samuel Cota; CASTRO, Emilene Ferreira de; DANTAS, Willyenne Marília; FERRO, Eloisa Amália Vieira; SILVA, Murilo Vieira da. Calomys callosus: An Experimental Animal Model Applied to Parasitic Diseases Investigations of Public Health Concern. **Pathogens**, Basel, v. 11, n. 3, art. 369, 17 mar. 2022. DOI: 10.3390/pathogens11030369.

SAVI, Merveille Koissi. An Overview of Malaria Transmission Mechanisms, Control, and Modeling. **Medical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 3, 23 dez. 2022.

SHIMADA, Mizuho; HIROSE, Yoshie; SHIMIZU, Kazuhiko; YAMAMOTO, Daisuke S.; HAYAKAWA, Eri H.; MATSUOKA, Hiroyuki. Upper gastrointestinal

pathophysiology due to mouse malaria *Plasmodium berghei* ANKA infection. **Tropical Medicine and Health**, v. 47, art. 18, 4 mar. 2019. DOI: 10.1186/s41182-019-0146-9.

SIFONTES, Yumaris Josefina Cariaco. Papel do extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* na infecção de camundongos C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA. 2017. 64 f. **Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 15 fev. 2017. doi:10.14393/ufu.di.2017.161

SIFONTES, Yusmaris Josefina Cariaco. Papel da heme oxigenase 1 na malária gestacional: estudo em três tempos gestacionais usando um modelo murino. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/29624>.

SOARES, Carlos Mattos Teixeira; MACHADO-NEVES, Mariana. O papel da gota citoplasmática na funcionalidade de espermatozoides em mamíferos: uma revisão atualizada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 4, p. 83–88, jul. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (SBCAL). Ética no uso de animais. [s.d.]. Disponível em: https://www.sbc.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=41. Acesso em: 15 fev. 2025.

STURM, Angelika; AMINO, Rogerio; VAN DE SAND, Claudia; REGEN, Tommy; RETZLAFF, Silke; RENNENBERG, Annika; KRUEGER, Andreas; POLLOK, Jörg-Matthias; MENARD, Robert; HEUSSLER, Volker T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, Washington, DC, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 1 set. 2006. DOI: 10.1126/science.1129720.

TOURÉ, Aminata; MARTINEZ, Guillaume; KHERRAF, Zine-Eddine; CAZIN, Caroline; BEUROIS, Julie; ARNOUT, Christophe; RAY, Pierre F.; COUTTON, Charles. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. **Human Genetics**, Berlim, v. 140, n. 1, p. 21–42, jan. 2021. DOI: 10.1007/s00439-020-02113-x.

VALENCIANO, Ana Lisa; GÓMEZ-LORENZO, María G.; VEGA-RODRÍGUEZ, Joel; ADAMS, John H.; ROTH, Alison. In vitro models for human malaria: Targeting the liver stage. **Trends in Parasitology**, v. 38, n. 9, p. 758–774, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.05.014>.

VIEIRA, Carolina Pinhol et al. Optimization of spermatozoa analysis in mice: A comprehensive protocol. **tissue and cell**, v. 89, n. elsevier, ago. 2024.

WADGYMAR, Susana M.; DeMARCHE, Megan L.; JOSEPHS, Emily B.; SHETH, Seema N.; ANDERSON, Jill T. Local adaptation: causal agents of selection and adaptive trait divergence. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 53, p. 87–111, 2022. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-012722-035231.

WIWANITKIT, Viroj. Malaria and semen quality: An issue in reproductive health? **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 4, n. 1, p. 58, jan./abr. 2011. DOI: 10.4103/0974-1208.82371.

WHO – World Health Organization. Malaria: questions and answers. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/malaria>. Acesso em: 24 mar. 2025.

WHO – World Health Organization. Malaria vaccine: WHO position paper – January 2016. Geneva: WHO, 2019. (WHO/CDS/GMP/2018.05 Rev. 1). Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/272456/WHO-CDS-GMP-2018.05-eng.pdf>. Acesso em: jan. 2025.

XU, Hui; YUAN, Shui-Qiao; ZHENG, Zhi-Hong; YAN, Wei. The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. **Asian Journal of Andrology**, Xangai, v. 15, n. 6, p. 799–805, nov. 2013. DOI: 10.1038/aja.2013.69

YUAN, Shuiqiao; ZHENG, Huili; ZHENG, Zhihong; YAN, Wei. Proteomic analyses reveal a role of cytoplasmic droplets as an energy source during epididymal sperm maturation. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, e77466, 14 out. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0077466.

ZANIN, Marina et al. Acute exposure to isoflurane impairs sperm parameters in mice. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 49, p. 330–37, 2023.