EFEITO DO GAMMA-ORYZANOL EM CARNEIROS SUBMETIDOS A DEGENERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR ESTRESSE TÉRMICO

Cristiano Malavolta [1]

Dieine Cassiélen Tavares Machado [2]

Sabrina Lopes de Oliveira [3]

Jéssica Ferreira Rodrigues [4]

Juliana Bernera Ramalho [5]

Francielli Weber Santos Cibin [6]

Resumo:

Em mamíferos, a temperatura testicular é mantida entre 2°a 6° C abaixo da temperatura corporal. Para tentar manter a temperatura nesse nível, os animais possuem um conjunto de estruturas anatômicas que fazem a termorregulação. Temperaturas muito elevadas levam a alterações neste mecanismo, podendo causar um quadro de degeneração testicular, comprometendo a qualidade do sêmen e a fertilidade. A retirada do agente causador e a administração de terapias com ação antioxidante tem sido considerada, uma vez que não há até o momento um tratamento eficaz. O gamma-oryzanol é um nutracêutico proveniente do óleo de farelo de arroz, com potencial antioxidante. Este estudo buscou avaliar os efeitos da suplementação com gamma-oryzanol em carneiros submetidos à degeneração testicular induzida por insulação escrotal. Foram utilizados, oito ovinos machos, inteiros, oriundos de cruzamentos de raças, com idade média de 10 meses e peso médio de 35 kg. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo (IE), submetidos a insulação escrotal e suplementados somente com veículo (óleo de soja); Grupo (IE+Ory), submetido a insulação escrotal e suplementados com gamma-oryzanol em óleo de soja. A insulação escrotal foi realizada através da colocação de bolsas térmicas no escroto dos animais por 72 horas. A medida do perímetro escrotal e o escore de consistência testicular foram verificados semanalmente durante 11 semanas. A avaliação do parênquima testicular foi realizada por ultrassonografia. Ao final do experimento, os testículos foram coletados para avaliação histológica e estresse oxidativo (potencial antioxidante total (FRAP), níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), níveis de peroxidação lipídica (TBARS). Nas imagens de ultra-som, verificou-se um aumento significativo de pontos hiperecogênicos nas semanas 6, 7 e 10, em comparação com o período de pré-insulação. Foi verificada uma redução significativa no perímetro escrotal nas semanas 3 e 4, e uma redução significativa na consistência testicular na semana 2, que foi imediatamente após o estresse térmico em ambos os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos nestes parâmetros. Os animais tratados com gamma-orizanol mostraram uma redução significativa nos níveis de ERO e FRAP nos testículos em comparação com o grupo controle. Este estudo mostrou os efeitos do estresse por calor em testículos de carneiros. Embora o gamma-orizanol tenha mostrado proteção parcial dos parâmetros oxidativos avaliados, a terapia não foi capaz de amenizar os demais parâmetros estudados. Assim, mais estudos são necessários para entender o mecanismo do dano testicular induzido pelo estresse térmico e o uso da suplementação de gamma-orizanol.

Palavras-chave: Degeneração testicular, estresse térmico, carneiros, gamma-oryzanol, antioxidante, insulação escrotal

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

EFEITO DO GAMMA-ORYZANOL EM CARNEIROS SUBMETIDOS A DEGENERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR ESTRESSE TÉRMICO

[1] Aluno de graduação. cristianomalavolta@gmail.com. Autor principal

[2] Estudante de Graduação. machadodieine@gmail.com. Co-autor

[3] Estudante de Graduação. sabrinalopes97@gmail.com. Co-autor

[4] Graduada em Ciências Biológicas. jfrodrigues.bio@gmail.com. Co-autor

[5] Aluna de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Bioquímica. julianabramalho@gmail.com. Co-autor

[6] Docente. franciellicibin@unipampa.edu.br. Orientador

EFEITO DO GAMMA-ORYZANOL EM CARNEIROS SUBMETIDOS A DEGENERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR ESTRESSE TÉRMICO

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que a temperatura testicular dos mamíferos é mantida entre 2°a 6° C, abaixo da temperatura corporal, (KASTELIC e colaboradores, 1996). Para tentar manter a temperatura nesse nível, os animais possuem um conjunto de estruturas anatômicas que fazem a termorregulação, dentre essas podemos citar: (1) plexo pampiniforme, o qual reduz a temperatura através da troca de calor entre o sangue circulante das artérias e veias; (2) túnica dartos, contrai ou relaxa a pele na região escrotal; (3) músculo cremaster, quando contrai, aproxima os testículos do corpo do animal, quando relaxa afasta os testículos; (4) glândulas sudoríparas. Animais expostos a temperaturas muito elevadas podem ter esse mecanismo desregulado, podendo causar um quadro de degeneração testicular, comprometendo a qualidade do sêmen e, consequentemente, a fertilidade.

A degeneração testicular é umas das patologias mais comuns que acomete machos de espécies domésticas, principalmente em regiões de clima quente, onde se tem picos altos de temperatura. Consequentemente, isso favorece um aumento da temperatura testicular, o que leva ao aumento do metabolismo celular, que quando não acompanhado pelo aporte de fluxo sanguíneo adequado, pode levar a hipóxia tecidual. Quando ocorre esse quadro, há um desiquilíbrio entre as defesas antioxidantes das células e as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas, ocorrendo um dano no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, afetando a qualidade e a capacidade de produção de espermatozoides.

Atualmente não se tem um tratamento bem elucidado para a degeneração testicular, o que se preconiza é a retirada do agente causador e a administração de soluções terapêuticas com ação antioxidante, (ALVARENGA; PAPA, 2009). O gamma-oryzanol é um nutracêutico proveniente do óleo de farelo de arroz, que contém uma variedade de ésteres ferulatos, sendo que os principais constituintes do gamma-orizanol são considerados potentes antioxidantes, que são 10 vezes mais eficientes que o tocoferol ou tocotrienol (componentes da vitamina E), conforme estudo realizado por (XU e colaboradores. 2001). (Arlas e colaboradores, 2008), realizaram um estudo sobre os efeitos da suplementação com óleo comercial de farelo de arroz (Gama-Horse, HT Nutri®, Brasil) sobre os parâmetros espermáticos de garanhões, e sugeriram um aumento no potencial antioxidante total, o qual foi associado com a melhoria da integridade da membrana e aumento da motilidade dos espermatozóides.

Diante disso, este estudo buscou avaliar os efeitos da suplementação com gamma-oryzanol em carneiros submetidos à degeneração testicular induzida através da insulação escrotal.

2. METODOLOGIA

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH) da Unipampa, Campus Uruguaiana, e na Cabanha de Ovinos da Unipampa. Foram utilizados, oito ovinos machos, inteiros, oriundos de cruzamentos de raças, com idade média de 10 meses e peso médio de 35 kg, onde receberam alimentação controlada, com fornecimento de concentrado (12% PB), forragem e água à vontade. Os animais foram mantidos no aprisco da Cabanha de Ovinos. Este estudo foi aprovado pelo CEUA da Unipampa (protocolo 012/16).

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo (IE), submetidos a insulação escrotal e suplementados somente com veículo (óleo de soja); Grupo (IE+Ory), submetido a insulação escrotal e suplementados com 33 mg/PM de gamma-oryzanol em óleo de soja. A dose foi adaptada de uma referência comercial para cavalos (Gama-Horse®), usando o cálculo do peso metabólico. A terapia durou 30 dias, iniciando sete dias antes dos animais serem submetidos a insulação escrotal.

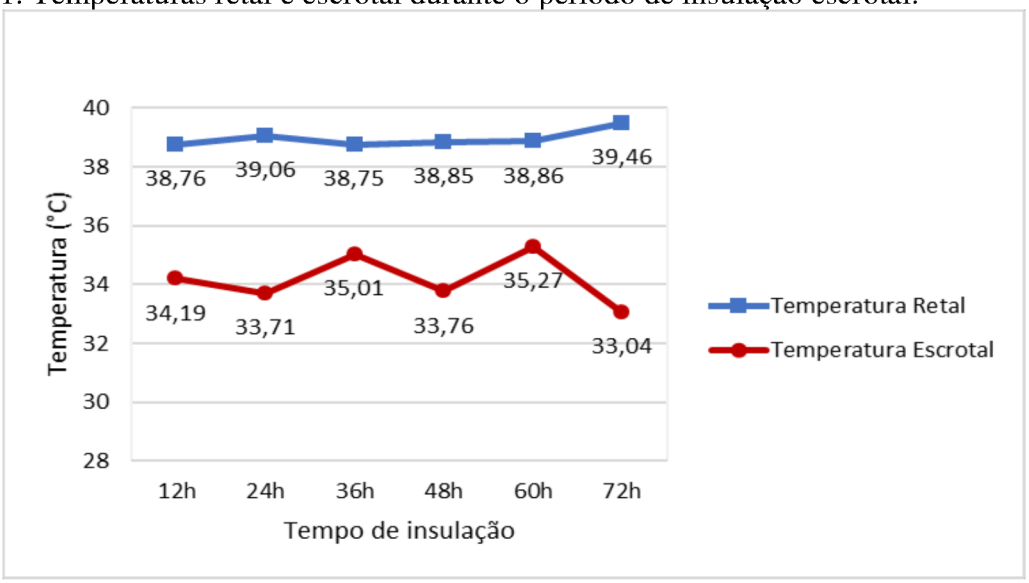
A insulação escrotal foi realizada através da colocação de bolsas térmicas no escroto dos animais, sendo essa composta por uma dupla camada plástica, intermediada por uma camada de algodão, semelhante à descrita por (PEZZINI e colaboradores, 2006), durante 72 horas. As temperaturas retal e escrotal foram monitoradas durante o período de insulação a cada 12 horas, usando um termômetro digital com um sensor externo.

A medida do perímetro escrotal e o escore de consistência testicular foram verificados semanalmente antes da coleta. A avaliação do parênquima testicular foi realizada por ultrassonografia (MyLab Tm30 Gold, transdutor de 7,5 MHz) após a coleta do sêmen, também com intervalo semanal. Os testículos foram coletados ao final do experimento, utilizando a técnica cirúrgica de orquiectomia bilateral. Três fragmentos de cada testículo foram coletados, um proximal, um medial e um distal, e homogeneizados em Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) para avaliar o estresse oxidativo. Três outros fragmentos foram fixados em solução de Bouin para avaliação histológica. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: (1) potencial antioxidante total (FRAP), conforme método descrito por (BENZIE e STRAIN 1996), (2) níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), conforme descrito por (LOETCHUTINAT e colaboradores. 2005), (3) níveis de peroxidação lipídica (TBARS), pelo método descrito por (OHKAWA e colaboradores. 1979).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A temperatura média retal obtida no período de estresse térmico (insulação escrotal) foi de 38,9 ° C, enquanto a temperatura média do escroto foi de 34,2 ° C, com temperatura máxima de 35,3 ° C alcançada nas 60 h de insulação escrotal (Figura 1).

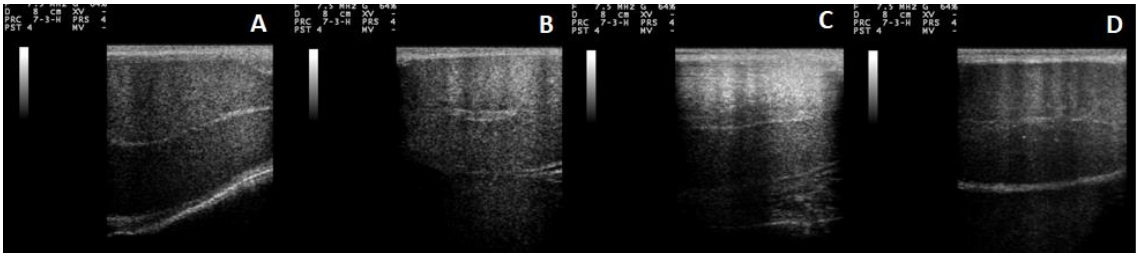
Figura 1. Temperaturas retal e escrotal durante o período de insulação escrotal.



A menor diferença média entre a temperatura testicular e a temperatura retal alcançada neste estudo foi de 3,5 ° C. (ALVES e colaboradores, 2016) mostraram que uma diferença de 5,92 ° C, foi capaz de causar alterações nos espermatozóides de ovinos submetidos ao estresse térmico por insulação escrotal.

Observando as imagens de ultra-som, verificou-se um aumento significativo de pontos hiperecogênicos nas semanas 6, 7 e 10 (Figura 2B, C e D, respectivamente) em comparação com o período de pré-insulação (Figura 2A). Entre os grupos não houve diferença significativa.

Figura 2. Imagem ultrassonográfica sagital média de testículos de carneiro. A. Semana 1 (pré-insulação), B. Semana 6, C. Semana 7, D. Semana 10.



Em relação a consistência testicular, observou-se uma redução significativa na semana 2, que foi imediatamente após o estresse térmico em ambos os grupos. Na semana 5 observou-se uma recuperação parcial nos grupos Controle e Gama (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre os grupos.

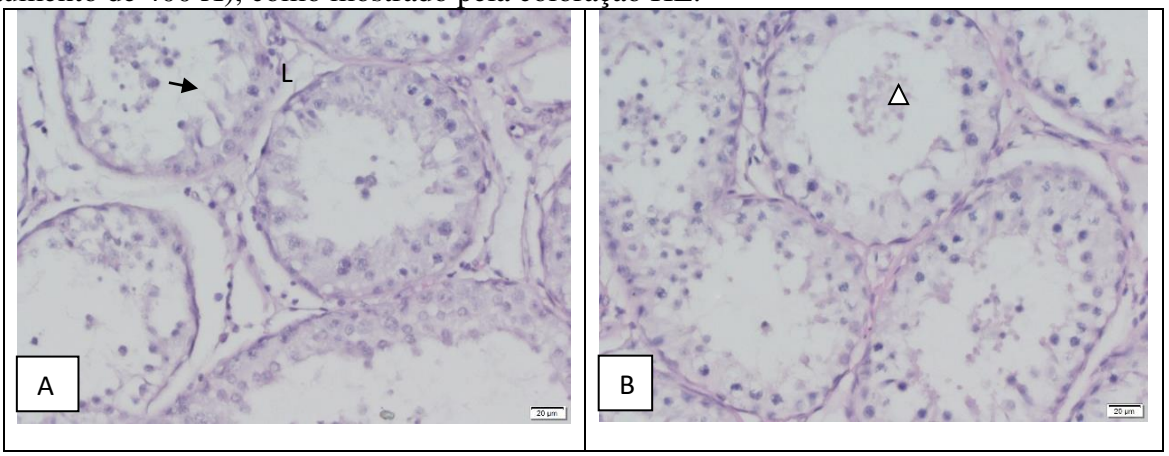
Tabela 1: A consistência testicular foi avaliada semanalmente ao longo do período experimental. A avaliação foi pontuada entre 1 e 5; com 5 indicando consistência firme (Normal) e 1 indicando consistência muito flácida.

Semana	Controle	Gamma
1	5,00 ± 0,00a	5,00 ± 0,00a
2	3,00 ± 0,82b	2,75 ± 0,96b
3	3,25 ± 0,50b	3,50 ± 0,58b
4	3,75 ± 0,50b	3,25 ± 0,96b
5	4,50 ± 0,58a	4,50 ± 1,00a
6	4,50 ± 0,58ab	4,00 ± 0,82ab
7	4,00 ± 0,82ab	3,75 ± 0,96ab
8	4,50 ± 0,58a	4,50 ± 0,58a
9	4,25 ± 0,50a	4,50 ± 0,58a
10	4,75 ± 0,50a	4,25 ± 0,50a
11	4,25 ± 0,50a	4,50 ± 0,58a

Ao final do período experimental, os animais foram orquiectomizados e os testículos foram utilizados para a avaliação histológica e para a análise do estresse oxidativo. Na avaliação histológica foi possível notar que as células espermatogênicas no epitélio germinativo foram separadas umas das outras por numerosos espaços vazios, revelando uma desorganização do epitélio espermatogênico. No lúmem dos túbulos seminíferos (Figura 3),

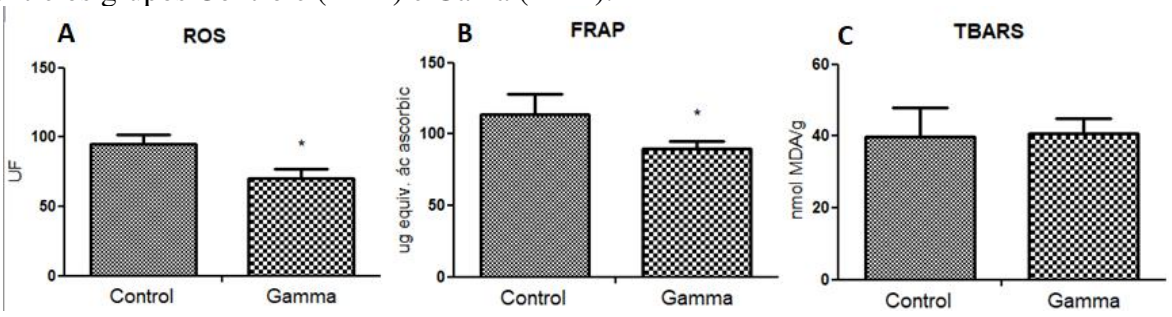
foi encontrado um grande número de células germinativas e raramente encontrou-se espermetozoides maduros. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 3. Fotomicrografia de túbulos seminíferos de carneiros expostos: [A] Túbulos seminíferos desorganizados, [B] Espaços intercelulares e (△) e células germinativas esfoliadas (aumento de 400 X), como mostrado pela coloração HE.



Os animais tratados com gamma-orizanol mostraram uma redução significativa (aproximadamente 26%) nos níveis de ERO nos testículos em comparação com o grupo controle (Figura 4). A capacidade antioxidante total (ensaio FRAP) foi menor no grupo Gamma do que no grupo Controle. Não houve diferença significativa no nível de peroxidação lipídica dos testículos entre os grupos.

Figura 4. A- Espécies reativas de oxigênio (ERO), B- Potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) e, C-peroxidação lipídica (TBARS). * indica diferenças significativas (P <0,05) pelo teste t entre os grupos Controle (n = 4) e Gama (n = 4).



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, este estudo mostrou os efeitos do estresse por calor nos testículos de carneiros. Embora o gamma-orizanol tenha mostrado proteção parcial dos parâmetros oxidativos avaliados, a terapia não foi capaz de amenizar os demais parâmetros estudados. Assim, mais estudos são necessários para entender o mecanismo do dano testicular induzido pelo estresse térmico e o uso da suplementação de gamma-orizanol.

5. REFERÊNCIAS

ARLAS TR, PEDERZOLLI CD, TERRACIANO PB, TREIN CR, BUSTMANTE-FILHO IC, CASTRO FS, MATTOS RC. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. Anim Reprod Sci 2008; 107:(3) 306

ALVARENGA MA, PAPA FO. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. Rev Bras Reprod Anim 2009; n. 6, p. 204-209

ALVES MPR, ANDRADE AFC, ARRUDA RP et al. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. Theriogenology 2016; 86:795-805.

BENZIE, I. F. F.; STRAINS, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a mensure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, 239, p. 70-76, 1996.

KASTELIC JP, COOK RB, COULTER GH. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. Anim Reprod Sci 1997; v. 45, p. 255-61.

LOETCHUTINAT, C.; et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxugen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7' - dicholofluorescein diacetate assay. **Radiat. Phys. Chemical**. 72, p. 323-331, 2005.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical. Biochemistry**. 95, p. 351-358, 1979.

PEZZINI TG et al. Seminal characteristics of Curraleiro and Holstein bulls submitted to scrotal insulation. Pesq Agropec Bras 2006; 41(5):863-868, May. ISSN 0100-204X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240555700020 >.

XU, Z.; NA HUA.; GODBER, J.S. Antioxidant activity tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-Azobis (2-methiylpropionamidine) Dihydrochloride. J. Agric. Food Chem., v.49, p. 2077-2081, 2001.