

LUIZ ANDRÉ RODRIGUES DE LIMA

**EFEITO PROTETOR E/OU RESTAURADOR DO CHÁ DA CASCA
DE NOZ-PECÃ (*Carya illinoensis*) SOBRE A ESPERMATOGÊNESE
DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO
TESTICULAR**

RECIFE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIEŒNCIA ANIMAL

LUIZ ANDRÉ RODRIGUES DE LIMA

**EFEITO PROTETOR E/OU RESTAURADOR DO CHÁ DA CASCA
DE NOZ-PECÃ (*Carya illinoensis*) SOBRE A ESPERMATOGÊNESE
DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO CHOQUE TÉRMICO
TESTICULAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

RECIFE

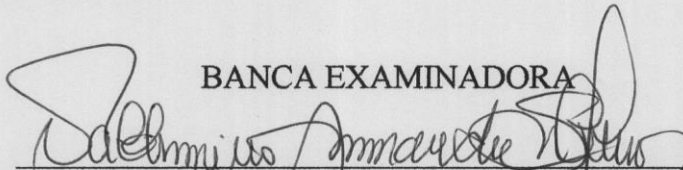
2011

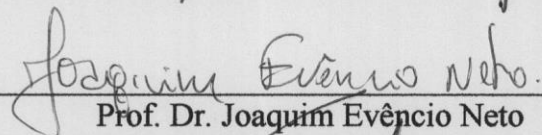
LUIZ ANDRÉ RODRIGUES DE LIMA

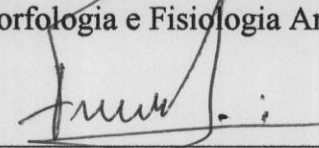
**Efeito protetor e/ou restaurador do chá da casca de noz-pecã
(*Carya illinoensis*) sobre a espermatogênese de ratos Wistar
submetidos ao choque térmico testicular**

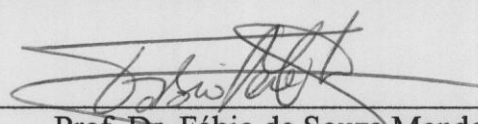
Aprovada em 10 / 02 / 2011

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE


Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE


Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE


Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Ficha catalográfica

L732e Lima, Luiz André Rodrigues de
Efeito protetor e/ou restaurado do chá da casca de
noz-pecã [*Carya illinoensis*] sobre a espermatogênese
de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular/
Luiz André Rodrigues de Lima. -- 2011.
84 f.: il.

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Júnior.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2011.
Referências.

1. *Carya illinoensis* 2. Noz-pecã 3. Espermatogênese
4. Estresse oxidativo 5. Antioxidante I. Silva Júnior, Valdemiro
Amaro da, orientador II. Título

CDD 636.08926

Dedico esta conquista a Deus.

*“A vitória pertence aos mais
perseverantes.”*

(Napoleão Bonaparte)

AGRADECIMENTOS

A Deus, ser supremo, por ter me iluminado, por estar continuamente me guiando e me dando forças em toda e qualquer caminhada.

Aos meus pais Luiz e Iracilda por me ensinarem o ofício de viver e a minha família, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao meu Orientador Professor Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior pela oportunidade, pelos conhecimentos ensinados, pela atenção, dedicação e disponibilidade e pela confiança que em mim foi depositada.

As amigas Simone Macedo e Sandra Torres pela total dedicação em todas as fases desta pesquisa, e principalmente pela amizade construída. Serei eternamente grato.

Ao Comandante do 4º Batalhão de Polícia do Exército, Coronel José Antônio de Sá Junior pela autorização para cursar o mestrado.

A amiga Rosângela Albuquerque pelo apoio nesta fase.

Aos integrantes do Laboratório de Histologia, Cássia Regina, Érica Albuquerque, Paulo Roberto, Bruno Tenório, Henrique, Jéssica e Vanessa pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal por terem contribuído para minha formação.

A amiga Dalila Benvegnú, por não ter medido esforços para a realização das análises enzimáticas, e ao amigo Glaybson Ricardo pelo apoio didático e amizade.

Aos animais que tiveram suas vidas sacrificadas nos experimentos, meu respeito e consideração.

A todos os amigos que presentes ou distantes contribuíram com seu apoio.

Ao Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria pela doação matéria vegetal.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela concessão da Bolsa REUNI, e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela possibilidade de realização deste curso.

RESUMO

O calor aplicado diretamente sobre o testículo tem fornecido novas informações sobre os mecanismos desencadeadores dos danos à espermatogênese. A casca da noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] é um sub-produto de origem vegetal de baixo custo e com elevado potencial antioxidante, constituída por polifenóis, taninos condensados, substâncias flavonóides e proantocianinas. O objetivo deste trabalho foi verificar se o chá de noz-pecã apresenta efeito preventivo e/ou restaurador contra as ações deletérias produzidas pelo calor no parênquima testicular, assim como avaliar a capacidade deste em acelerar a recuperação do processo espermatogênico. Foram utilizados 45 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) divididos em três grupos: G1- choque térmico, G2 - chá de noz-pecã pré-choque térmico e G3 - chá de noz-pecã pré e pós-choque térmico. Os animais foram avaliados aos 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico quanto às alterações histopatológicas e histomorfométricas dos testículos, assim como, determinou-se níveis plasmáticos de testosterona. Parâmetros de estresse oxidativo (EO) foram avaliados no homogenato de testículo através da peroxidação lipídica (LPO), medida por meio da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Grupo carbonil, glutathiona reduzida (GSH), níveis de vitamina C (VIT C), atividade da catalase e conteúdo protéico também foram determinados. Neste trabalho foi constatada tendência de recuperação do peso testicular dos animais dos grupos G2 e G3 aos 30 e 60 dias. O peso epididimário dos animais do grupo G3, aos 15 e 30 dias apresentou uma melhora significativa em relação aos grupos G1 e G2. Os pesos da próstata e vesícula seminal em G2 e G3 aumentaram em relação ao grupo G1, aos 30 dias. A administração do chá da casca de noz-pecã preveniu a redução do volume total de células de Leydig no período de 30 dias pós-injúria. O volume total de túbulos seminíferos foi recuperado mais rapidamente nos grupos G2 e G3 aos 30 dias do que o grupo G1. O volume de epitélio seminífero seguiu o mesmo padrão do túbulo seminífero, porém aos 60 dias. No tocante à túnica própria e vasos sanguíneos, os animais tratados com chá tiveram redução volumétrica neste parâmetro aos 60 dias. O comprimento total dos túbulos seminíferos foi preservado nos animais que fizeram uso contínuo do chá de noz-pecã. Os níveis plasmáticos de testosterona foram mantidos aos 15 dias nos grupos G2 e G3, e posteriormente notou-se tendência de diminuição destes níveis aos 30 e 60 dias. Por outro lado, os níveis plasmáticos de testosterona nos animais do grupo G1 aumentaram gradativamente dos 15 aos 60 dias. De acordo com os achados histopatológicos, constatou-se que a administração prévia de chá de noz-pecã ao insulto térmico proporcionou uma melhor qualidade na recuperação do processo espermatogênico aos 30 e 60 dias. O tratamento com chá de noz-pecã foi capaz de prevenir o aumento do TBARS e diminuição do GHS nos testículos. Não houve diferença significativa nos níveis de VIT C, grupos carbonil, atividade da catalase e no conteúdo protéico dos testículos dos animais. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com chá da casca de noz-pecã, tanto administrado previamente aos animais como depois da injúria térmica testicular apresentaram efeitos preventivos e restauradores da espermatogênese.

Palavras-chave: *Carya illinoensis*. Noz-pecã. Espermatogênese. Estresse Oxidativo. Antioxidante.

ABSTRACT

The directly heat applied on the testis has given new information about the mechanisms triggers of spermatogenesis damages. Pecan nut shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch], is a vegetal by-product with low cost and elevated antioxidant potential and therefore can be considered a promissory substance, because it is rich in polyphenols, condensed tannins, flavonoids substances and proanthocyanidins. The aim of this study was to verify whether the pecan nut tea has been protective effects against deleterious actions, produced by heat in the testicular parenchyma and its capacity to accelerate the spermatogenesis recovery process. Forty-five male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) were used and divided in three groups. The testicular heat shock (HS) were been applied in all animals. The first one group G1 hadn't received pecan nut tea on its diet; the second G2, only received the cited tea before (HS) and the third group G3 received the pecan nut tea before and after HS. The animals were evaluated on 15, 30 and 60 days after heat shock according to histopathological and histometrical testis alterations as well plasmatic testosterone. The occurrence of oxidative stress (OS) was observed through the determination of lipid peroxidation (LP), measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Carbonyl group, reduced glutathione (GSH), vitamin C levels, catalase activity and protein content in testis were evaluated. In this work was observed a recover of testis weight recover in animals belong to G1 and G2 groups at 30 and 60 days. The epididymal weight of G3, at 15 and 30 days showed an improvement when related with G1 and G2 groups. The prostate and seminal gland weight in G2 and G3 had an improvement in weight when compared with G1 group, at 30 day. The pecan nut tea prevented a total Leydig cell volume reduction at 30 day post thermal injury. The total volume of seminiferous tubules was quickly recovered on G2 and G3 groups at 30 days than G1 group. The seminiferous tubule volume followed the same pattern of seminiferous tubule. Regarding to tunica propria and blood vessel, animals treated with pecan nut tea had a reduction of this parameter at 60 days. The total length of seminiferous tubules was maintained in animals that took continuously pecan nut tea. The plasmatic levels of testosterone were maintained at 15 days in G2 and G3 groups, and after that was noted a lower testosterone levels tendency at 30 and 60 days. By the other side, testosterone levels in animals of G1 group become higher gradually at 15 until 60 days. According to histopathological findings was noted that prior administration of pecan nut tea, before heat shock had better effect on recovery of spermatogenic process at 30 and 60 days. The treatment with pecan nut tea was able to prevent the TBARS increase and GSH depletion in testis. There weren't significant changes on the plasmatic vitamin C levels, carbonyl groups, catalase activity and protein content in the testis of animals.

Keywords: *Carya illinoensis*. Pecan Nut. Spermatogenesis. Oxidative Stress. Antioxidant.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Peso testicular (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 37
- Tabela 2** - Peso epididimário (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 38
- Tabela 3** - Peso da próstata (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 39
- Tabela 4** - Peso da glândula seminal (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 40
- Tabela 5** - Volume total das células de Leydig (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 42
- Tabela 6** - Volume total de Epitélio seminífero (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 44
- Tabela 7** - Lúmen tubular (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 45
- Tabela 8** - Túnica própria do túbulo seminífero (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 47
- Tabela 9** - Túbulos seminíferos (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 48
- Tabela 10** - Vasos sanguíneos testiculares (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 50
- Tabela 11** - Espaço linfático (μ L) do parênquima testicular de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 51
- Tabela 12** - Volume líquido do testículo (μ L) de ratos Wistar submetidos a choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). 52

Tabela 13 - Comprimento Total de Túbulo Seminífero (m) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).53

Tabela 14 - Dosagem de testosterona plasmática (ng/ml) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Peso testicular (g), de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico.....37
- Figura 2** - Peso epididimário (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico.....38
- Figura 3** - Peso da próstata (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico.....40
- Figura 4** - Peso da glândula seminal (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico. ...41
- Figura 5** - Volume total das células de Leydig (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.42
- Figura 6.** Volume total de epitélio seminífero (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.44
- Figura 7** - Lúmen tubular (μ L) de ratos Wistar controle e submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.....46
- Figura 8** - Túnica própria do túbulo seminífero (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.47
- Figura 9** - Túbulos seminíferos (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.49
- Figura 10** - Vasos sanguíneos testiculares (μ L) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.....50
- Figura 11** - Espaço linfático (μ L) do parênquima testicular de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.52

Figura 12 - Volume líquido do testículo (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.....	52
Figura 13 - Comprimento Total de Túbulo Seminífero (m) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).	53
Figura 14 - Dosagem de testosterona plasmática (ng/ml) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico.	55
Figura 15 - Parênquima testicular de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de Noz-Pecã e avaliados com 30 dias após a injúria térmica.	57
Figura 16 - Parênquima testicular de ratos Wistar submetidos a choque térmico testicular, tratados ou não com chá de Noz-Pecã e avaliados com 60 dias após a injúria térmica.	60
Figura 17 - Efeito do chá da casca de noz-pecã (EAB) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (A e B) e proteínas carboniladas (C e D) em testículos de ratos expostos ao choque térmico.	64
Figura 18 - Efeito do Extrato Aquoso Bruto (EAB): chá da casca de noz-pecã sobre os níveis de glutathione reduzida (A e B) e vitamina C (C e D) em testículos de ratos expostos ao choque térmico.	65
Figura 19 - Efeito do Extrato Aquoso Bruto (EAB): chá da casca de noz-pecã sobre os níveis a atividade da catalase (A e B) e os níveis de proteína (C e D) em testículos de ratos submetidos ao choque térmico.	67

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Disposição dos grupos experimentais, número de animais segundo os tempos de observação e método de fixação tecidual.....	31
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
g	Gramma
mg	Miligramma
mL	Mililitro
P	Nível de significância estatístico
%	Percentual
®	Marca registrada
Kg	Quilogramma
mg	Miligramma
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
P53	Proteína supressora de gene tumoral
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
ROS	Oxigênios Reativos
HS	Choque Térmico
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
HSP	Proteína de Choque Térmico
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
CAT	Catalase
VIT C	Vitamina C
EAB	Extrato Aquoso Bruto
GSH	Glutationa reduzida
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
MDA	Malondialdeído

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	METABOLISMO OXIDATIVO	18
2.1.1	Espécies reativas do oxigênio	18
2.2	ANTIOXIDANTES E MECANISMOS DE DEFESA	22
2.3	PERSPECTIVAS PARA O USO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS	24
2.4	ESTRUTURA, FUNCIONAMENTO DO TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE	25
2.5	PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPS)	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	31
4.2	DOSAGEM DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA	33
4.3	DETERMINAÇÃO DE INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM HOMOGENATO DE TESTÍCULO	34
4.3.1	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	34
4.3.2	Quantificação dos níveis de proteína carboniladas em homogenato de testículo	34
4.3.3	Níveis de glutathiona reduzida	35
4.3.4	Níveis de vitamina C	35
4.3.5	Atividade enzimática da catalase	35
4.3.6	Dosagem protéica	35
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	Achados histopatológicos de testículo de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de Noz-Pecã e avaliados com 30 dias após a injúria térmica	56
6.2	Achados histopatológicos de testículo de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de Noz-Pecã e avaliados com 60 dias após a injúria térmica	58
6.3	Resultados enzimáticos das amostras de homogeneizado testicular	63
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Muitos estudos têm demonstrado uma relação inversa entre o consumo de frutas, vegetais e cereais com a incidência de doenças cardiovasculares, câncer, aterosclerose e doenças inflamatórias. Essas doenças estão associadas à oxidação dos sistemas biológicos, que envolvem a geração e reação em cadeia de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) no organismo, e que desempenham papel chave no surgimento destas patologias. Essas ERO são responsáveis por alterações em alguns componentes celulares podendo desencadear reações em cadeia nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, afetando sua integridade estrutural e funcional (RICE-EVANS et al., 1997; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Todos os tecidos são susceptíveis a danos pelo calor. Contudo, os testículos são diferentes, uma vez que eles são danificados pela exposição de temperaturas normalmente encontradas dentro do abdômen. Embora estes se originem dentro da cavidade abdominal, em alguns mamíferos sua migração para o escroto só ocorre durante o desenvolvimento fetal ou neonatal (SETCHELL, 1998).

Segundo Lasota et al. (2004), os espermatozoides dos mamíferos têm uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana, além de apresentarem uma baixa concentração de enzimas antioxidantes em seu citoplasma. Estas características os tornam particularmente sensíveis aos efeitos das ERO. Não obstante, níveis de peroxidação lipídica também estão significativamente aumentados antes da descida dos testículos para a bolsa escrotal em ratos (PELTOLA et al., 2005).

Estudos demonstraram que em casos de temperatura elevada, os mecanismos fisiológicos de termorregulação não são suficientes para manter a temperatura da gônada masculina, determinando sua degeneração (FLORENTINO et al., 2003).

O calor aplicado diretamente sobre o testículo tem fornecido novas informações sobre os mecanismos desencadeadores dos danos à espermatogênese e de tratamentos que podem prevenir os danos testiculares através do bloqueio da apoptose (SETCHELL, 2006).

As células germinativas testiculares são vulneráveis ao estresse térmico e sofrem apoptose em resposta a temperaturas supra-escrotais. A proteína supressora de gene tumoral (p53) é um potente mediador bioquímico da apoptose induzida pelo choque térmico (KUMAGAI et al., 2002). Segundo relatos de Yin et al. (1997), verificou-se apoptose em espermátides e espermatócitos de testículos de ratos e camundongos expostos a temperaturas elevadas.

Nesse contexto, ainda pouco se sabe a respeito do efeito que o estresse térmico testicular acarreta no organismo como um todo, considerando-se, particularmente, o metabolismo oxidativo, com branda ou considerável produção de substâncias reativas que venham a comprometer a higidez dos animais (FLORENTINO et al., 2003; SANTOS e SIMPLÍCIO, 2000; XAVIER, 2007).

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparados a do substrato oxidável (ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, carboidratos ou DNA), podem retardar ou inibir a oxidação de lipídeos ou outras moléculas de maneira eficaz (BIANCHI e ANTUNES, 1999; ZHEG e WANG, 2001).

Alimentos de origem vegetais como as frutas, e ainda os temperos e as especiarias têm sido estudados como fonte de antioxidantes naturais (DIMITRIOS, 2006; KORNSTEINER, et al., 2006). Apesar de o grande número de trabalhos realizados, muitos alimentos ainda não foram estudados, principalmente quando se trata de plantas de cultivo e consumo limitado em determinada região, que não são conhecidas por grande parte da população. Desta forma, a avaliação de alimentos populares e tradicionais pode oferecer muitos benefícios para promoção da saúde humana (PRADO, 2008).

Entre os alimentos tradicionalmente utilizados, as nozes têm sido recomendadas na dieta em função de apresentar efeitos benéficos à saúde. A noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch], pertence à família Juglandaceae, e é originária do sul dos Estados Unidos da América e norte do México (HANACOCK, 1997). No Brasil, o Gênero *Carya*, conhecido como nogueira-pecã, se desenvolve e é comercializada principalmente no Estado do Rio Grande do Sul (JOLY, 1993).

A noz-pecã apresenta baixo conteúdo de ácidos graxos saturados, e índices elevados de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (ORO et al., 2008). Além disso, apresenta em sua composição moléculas bioativas, como esteróis, tocoferóis, compostos fenólicos e taninos condensados. Estes compostos apresentam comprovada atividade antioxidante, pois estabilizam e sequestram radicais livres (HUDTHAGOSOL, 2011; KORNSTEINER, WAGNER e ELMADFA, 2006; KRIS-ETHERTON et al., 1999; MALIK, et al., 2009).

Segundo Worley (1994), o processamento da noz-pecã resulta na obtenção de um volume relativamente elevado de casca (40 a 50%), um subproduto industrial de cor avermelhada. Essas cascas vêm sendo utilizadas pela população do sul do Brasil na forma de chá para auxiliar no tratamento de várias patologias. Seus possíveis efeitos benéficos podem estar relacionados à presença de substâncias com ação antioxidante. No entanto, os dados

referentes à composição e atividade antioxidante, ainda são escassos (PRADO, 2008; PRADO, et al. 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO OXIDATIVO

O estresse oxidativo é verificado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. Isso pode ocorrer por aumento excessivo na primeira, diminuição da segunda e/ou ambos. Os principais radicais livres são: superóxido, hidroxil, oxigênio singlete e ainda o peróxido de hidrogênio, que embora não seja um radical livre, é considerado uma espécie reativa de oxigênio (FERREIRA, 1997).

As EROs desempenham um papel fisiológico muito importante, atuando na detoxificação e também na sinalização celular. Entretanto, quando sua produção excede, elas acabam gerando uma série de danos, verificados por meio da peroxidação aos lipídeos, alteração na estrutura das proteínas e danos ao DNA (THOMAS, 2000).

2.1.1 Espécies reativas do oxigênio

Muitos estudos têm demonstrado que a incidência de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, arterosclerose e doenças inflamatórias estão associadas à produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) (PRADO, 2008).

As EROs são moléculas que contêm um elétron isolado (não pareado) em sua última camada eletrônica, constituindo espécies instáveis, com meia vida curta e extremamente reativas (BIANCHI e ANTUNES, 1999; JORDÃO JÚNIOR, et al., 1998; THOMAS, 2000). As ERO podem ser geradas no citoplasma, na membrana plasmática (BIANCHI e ANTUNES, 1999) ou na cadeia transportadora de elétrons da membrana mitocondrial durante o processo de fosforilação oxidativa (BEATTIE, 2003). Espécies tóxicas de oxigênio também são formadas nos peroxissomos pelo sistema citocromo P450 (BEATTI, 2003).

Essas ERO são capazes de danificar as estruturas do DNA, carboidratos, lipídios, proteínas e componentes celulares, podendo desencadear reações em cadeia nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, e afetar sua integridade estrutural e funcional (RICE-EVANS et al., 1997; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; THOMAS, 2000).

Segundo Ferreira e Matsubara (1997), radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, visto que alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como na sua maioria esses agentes são derivados do oxigênio, é mais indicado utilizar o termo Espécie Reativa do Oxigênio (ERO).

No metabolismo normal, além de ERO, também são sintetizadas espécies derivadas do nitrogênio (ERN) como: o óxido nítrico (NO^\cdot), o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o peroxinitríio (ONOO^\cdot); espécies derivadas do cloro, como o ácido hipocloroso (HOCl), o cloreto de nitrila (NO_2Cl), as cloroaminas e as espécies derivadas do enxofre, como os radicais tíflas ($-\text{RS}$) (VASCONCELOS, 2007). A presença de metais como o Fe, o Cu e Mn, é requerida para catalisar as reações oxidativas dos lipídeos, sendo a catálise facilitada pela temperatura, pressão, luz e concentração de oxigênio (VALENZUELA e NIETO, 2001).

Quando o radical livre de oxigênio ataca uma molécula de ácido graxo insaturado, esta se converte em um radical livre de alta reatividade que pode ser atacado pelo oxigênio molecular gerando diferentes tipos de produtos intermediários, como peróxidos, alcóxidos, epóxidos, entre outros compostos (GORDON, 2001). Estes produtos possuem propriedades radicalares que ao se estabilizarem subtraem hidrogênios de ácidos graxos, transformando-os em radicais livres de ácidos graxos. Esta etapa, chamada de propagação, é um processo autocatalítico que não requer a participação dos radicais livres de oxigênio da etapa de iniciação. Durante a propagação, a formação de peróxidos adquire velocidade, acompanhada pelo consumo elevado de oxigênio causando grandes modificações estruturais no lipídio (VALENZUELA e NIETO, 2001).

Embora muitas das vezes as ERO sejam responsáveis por lipoperoxidação das membranas celulares, conforme Scneider e Oliveira (2004) sabe-se que estes agentes são de extrema utilidade nos processos vitais de fagocitose e de desintoxicação. Metabólito como o óxido nítrico, por exemplo, é conhecido como um regulador da atividade de fatores de transcrição e outros determinantes da expressão gênica.

Citocinas, fatores de crescimento e hormônios neurotransmissores usam as ERO como mensageiros intracelulares secundários (BRENNEISEN, et al., 2005; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

No tocante as espécies reativas do oxigênio, o radical superóxido é produzido nas

mitocôndrias, microsomas e peroxissomas. Também é gerado através de enzimas como a xantina oxidase e NADPH oxidase (NORDBERG e ARNÉR, 2001; VASCONCELOS, et al., 2007). Em decorrência de sua baixa reatividade molecular, atua apenas no local de formação, pois não tem a capacidade de penetrar em membranas lipídicas (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Entretanto, de acordo com Andrade Júnior (2005), as reações desencadeadas pelo superóxido podem gerar radicais hidroxilas e peróxil que em meio ácido podem formar peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio embora não seja considerado uma ERO, ele é um agente oxidante e redutor fraco capaz de penetrar nas membranas lipídicas e iniciar o processo de peroxidação lipídica (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

O radical hidroxila é o mais reativo dos intermediários. Esta ERO pode reagir com aminoácidos, fosfolipídeos, ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e com ácidos orgânicos, o que pode ocasionar mutação ou inativação do DNA, inativação de proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrílas (-SH) a pontes dissulfeto, assim como pode iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares ocasionando lipoperoxidação (FERREIRA e MATSURABA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al., 2007).

Outras ERO incluem o oxigênio singlete e o ozônio que podem levar à peroxidação dos lipídeos. Acrescenta-se a este último o forte poder oxidativo de proteínas e DNA (VASCONCELOS et al., 2007).

De maneira geral, as ERO podem reagir e causar danos a todas as classes de moléculas biológicas (VOET et al., 2000). A extensão desse dano depende não somente da natureza e da quantidade de ERO, mas também do momento e da duração da exposição, associado aos fatores extracelulares como temperatura, tensão de oxigênio e ambiente (ARGAWAL et al., 2003).

Dentre os constituintes celulares e extracelulares mais afetados estão os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares. Os fosfolipídios presentes nas membranas plasmáticas e nas organelas estão sujeitos à peroxidação com consequente formação de hidroperóxidos. Estes por sua vez, dão origem a compostos citotóxicos, como aldeídos, entre eles o hidroxinonal e o malondialdeído (BEATTIE 2003; CHIHUAILAF, CONTRERAS e WITTEW, 2002).

Recentemente mostrou-se que, em resposta ao estresse térmico, a degeneração das células germinativas ocorre através da morte celular programada (apoptose) caracterizada pela fragmentação de DNA (BILLING et al., 1995; MIEUSSET et al., 1995; TAPANAINEM et

al., 1993). Neste processo, o fator 1 da transcrição do choque térmico é ativado, induzindo apoptose de espermatócitos, resultando em infertilidade de ratos (NAKAI et al., 2000).

A peroxidação dos lipídeos ocasiona também o aumento da permeabilidade da membrana, levando ao influxo de Ca^{2+} e de outros íons, com conseqüente turvamento celular. Além disso, quantidade excessiva de Ca^{2+} nas mitocôndrias pode desencadear apoptose (BEATTIE, 2003).

Outra conseqüência da ação das ERO é o dano ao DNA mitocondrial e nuclear, resultando em mutações. O DNA mitocondrial por possuir a cadeia transportadora de elétrons é mais susceptível aos danos por ERO que o DNA nuclear. Este por sua vez possui histonas que o protege das ERO (CHIHUAILAF, CONTRERAS e WITTWER, 2002).

Elevadas temperaturas ambientais podem interferir negativamente no desempenho reprodutivo dos animais e na qualidade espermática, sendo a motilidade individual progressiva e o percentual de células morfológicamente anormais as características mais afetadas (MARTINS, 2003; VALLE et al., 2005).

Segundo Lasota et al. (2004), os espermatozoides dos mamíferos têm uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana, além de apresentarem uma baixa concentração de enzimas antioxidantes em seu citoplasma. Estas características os tornam particularmente sensíveis aos efeitos das ERO. Não obstante, níveis de peroxidação lipídica também estão significativamente aumentados antes da descida dos testículos para a bolsa escrotal em ratos (PELTOLA et al., 1995).

Existe considerável variação em termo de susceptibilidade ao estresse térmico entre indivíduos e entre diferentes espécies, o que parece ser decorrente da habilidade que cada animal possui em manter a temperatura testicular, assim como da susceptibilidade das diferentes células germinativas (SETCHELL, 2006).

Entretanto, o mecanismo de morte celular relacionado ao estresse térmico parece ser apoptose e não necrose, e pode envolver espécies reativas do oxigênio, proteína supressora de tumor (p53), óxido nítrico sintase (NOS), translocação do fator pró-apoptótico Bax do citoplasma para aposição perinuclear, a liberação do citocromo C da mitocôndria e diversas caspases (SETCHELL, 2006).

Segundo Nichi (2003), o aumento da produção de ERO durante o estresse térmico testicular parece ser decorrente do aumento da taxa metabólica e correspondente aumento da demanda por oxigênio sem aumento da circulação sanguínea, o que provocaria um quadro de hipóxia tecidual, condição predisponente para a produção de ERO.

O calor aplicado diretamente sobre o testículo tem fornecido novas informações sobre os mecanismos desencadeadores dos danos à espermatogênese e de tratamentos que podem prevenir os danos testiculares através do bloqueio da apoptose (SETCHELL, 2006).

2. 2 ANTIOXIDANTES E MECANISMOS DE DEFESA

Antioxidante são compostos quando presentes em baixas concentrações comparados a do substrato oxidável (ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, carboidratos ou DNA), podem retardar ou inibir a oxidação de lipídeos ou outras moléculas de maneira eficaz (BIANCHI e ANTUNES, 1999; ZHEG e WANG, 2001).

De acordo com o mecanismo de ação, esses agentes podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. O primeiro grupo inclui as enzimas glutathione peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) que atuam como detoxificadores do agente antes que ele cause lesão. O segundo grupo de antioxidante é constituído por compostos sintetizados pelo próprio organismo como a bilirrubina, a ceruloplasmina, os hormônios sexuais, a melatonina, a coenzima Q e pelo ácido úrico, assim como outros adquiridos pela dieta ou por via suplementação como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), o β -caroteno e os grupos fenólicos de plantas (flavonóides) que tem a função de reparar a lesão ocorrida (VASCONCELOS et al., 2007).

A glutathione (GSH) é considerada um dos agentes antioxidantes mais importante do sistema de defesa antioxidante celular (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Apresenta-se sob quatro formas: a GSH-Px 1 ou clássica que é encontrada no citosol de todas as células; GSH-Px 2 ou intestinal, específica do trato intestinal; GSH-Px 3 ou pulmonar presente no revestimento interno do pulmão; e a GSH-Px 4 que atua no sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas (NORDBERG e ARNÉR, 2001; VASCONCELOS et al., 2007). Conforme Nordberg e Arnér (2001), também foi encontrada atividade enzimática da GSH-Px 4 em células espermáticas.

A enzima superóxido-dismutase (SOD) catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a catalase (CAT) tem como função primordial de catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular (NORDBERG e ARNÉR, 2001). A ação conjunta dessas enzimas com GSH-Px evita o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja formação de radical hidroxila, contra o qual não

existe sistema enzimático de defesa (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Dentro do sistema de proteção antioxidante não enzimático, a coenzima Q ou ubiquinona tem a função de inibir a iniciação da peroxidação lipídica além de impedir a formação de radicais peroxila e regenerar a vitamina E do radical tocoferila. De forma semelhante, o ácido úrico (URH₃) também apresenta atividade antioxidante por reagir com radicais peroxila antes que estes penetrem na célula. (VASCONCELOS et al., 2007).

De acordo com a origem, os antioxidantes podem ser classificados como sintéticos e naturais. Os primeiros são utilizados para estabilizar óleos, gorduras e alimentos contendo altos teores de lipídeos. Geralmente são compostos sintéticos derivados de estruturas fenólicas contendo mais de um grupo OH ou metoxila. Estes agentes tendem a estabilizar os ácidos graxos através de reações com radicais livres, quelando íons metálicos e interrompendo a fase de propagação da oxidação lipídica (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Existem vários compostos sintéticos com ação antioxidante, porém somente alguns são utilizados. Estas restrições se devem, sobretudo, aos estudos de toxicidade, em que pesquisas têm demonstrado uma relação entre o uso de antioxidantes sintéticos e o surgimento de efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH et al., 2001; WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005). Em face disso, há preferência em se usar os antioxidantes naturais, pelo fato de serem considerados mais saudáveis, a usar os antioxidantes sintéticos, estes de segurança questionável (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Entre os antioxidantes naturais mais utilizados industrialmente estão o ácido ascórbico e seus derivados, carotenóides, tocoferóis, tocotrienóis e compostos fenólicos de extrato de diversas fontes naturais (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Alimentos como frutas, vegetais e grãos têm sido reportados como fontes de antioxidantes (KORNSTEINER et al., 2006).

A inibição da produção de peróxidos e a eficiência dos tocoferóis dependem de diversos fatores, do sistema lipídico testado, da temperatura, da luz, do tipo de substrato, do solvente utilizado, bem como da presença de sinergistas e de espécies químicas que possam agir como pró-oxidantes e da concentração de tocoferóis (WANASUNDARA e SHAHIDI, 2005).

Os tocoferóis podem ser encontrados nos óleos vegetais poliinsaturados na forma livre e nos gérmen das sementes dos cereais, entre eles, o óleo de noz-pecã, no qual se pode encontrar de 88 a 420 mg/kg de tocoferóis totais (YOSHIDA, NIKI e NOGUCHI, 2003).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos de origem natural também se deve às propriedades de óxido-redução, que desempenham um papel importante na absorção e

neutralização de radicais livres, quelando os oxigênios triplete e singlete ou decompondo peróxidos (BRENNAN e PAGLIARINI, 2001; ZHENG e WANG, 2001). Dentro desse grupo estão os derivados dos ácidos benzóicos e cinâmicos, as cumarinas, os flavonóides e os derivados de polimerização como os taninos e as ligninas (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2007).

2. 3 PERSPECTIVAS PARA O USO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS

Nos últimos anos, os antioxidantes extraídos de frutas, vegetais e especiarias têm recebido atenção especial, pois inibem a peroxidação lipídica e protegem as células contra os danos causados pela oxidação (MOURE et al., 2001).

Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando a atividade antioxidante de uma ampla variedade de substâncias, entre elas os compostos fenólicos. Esta atividade biológica tem sido atribuída às propriedades de óxido-redução dos compostos fenólicos, desempenhando um importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (BASILE et al., 2005).

Entre os alimentos tradicionalmente utilizados, as nozes têm sido recomendadas na dieta tendo em vista seus efeitos benéficos à saúde. A noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch], pertence à família Juglandaceae e é originária do sul dos Estados Unidos e norte do México (HANACOCK, 1997). No Brasil, o Gênero *Carya*, conhecido como nogueira-pecã, se desenvolve no sul e sudeste (JOLY, 1993).

A indústria de alimentos processados gera uma quantidade substancial de subprodutos ricos em compostos fenólicos, que podem vir a constituir uma fonte alternativa de antioxidantes naturais. O processamento da noz-pecã resulta na obtenção de um volume relativamente elevado de casca (40 a 50%). Essa casca é tradicionalmente utilizada no preparo de chá pela população do sul do Brasil, que atribui a ele, propriedades benéficas para a saúde. No entanto, os dados referentes à composição e atividade antioxidante da casca da noz-pecã produzida no sul do Brasil, ainda são escassos (PRADO, 2008). Estudos têm demonstrado ainda uma relação inversa entre o consumo desses alimentos com a incidência de doenças cardiovasculares e câncer (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Embora o conteúdo fitoquímico da noz possa variar de acordo com o cultivar, época do ano e composição do solo, a noz-pecã apresenta baixo conteúdo de ácidos graxos

saturados, e índices elevados de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (KORNSTEINER et al., 2006).

Evidências indicam também a presença de moléculas bioativas, tais como esteróis, tocoferóis entre outros compostos fenólicos possuem atividade antioxidante através da estabilização de radicais livres (KORNSTEINER, WAGNER e ELMADFA, 2006; KRIS-ETHERTON et al., 1999).

2. 4 ESTRUTURA, FUNCIONAMENTO DO TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE

O testículo possui duas funções: a exócrina – relativa à espermatogênese – e a endócrina – que se ocupa da produção hormonal responsável pela diferenciação sexual, pelas características sexuais secundárias e pela libido (VARNER e JOHNSON, 2007).

A estrutura testicular é composta pelo parênquima, envolto pela túnica albugínea que se infiltra separando o órgão em diferentes lóbulos. A túnica é composta de colágeno e fibras elásticas, células mióides e uma rede de vasos sanguíneos. O parênquima testicular ocupa entre 80 e 90% da massa testicular total. Os túbulos seminíferos representam aproximadamente 70% do parênquima. A porção intertubular é composta por células de Leydig, fibroblastos, linfócitos, mastócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo (COSTA e PAULA, 2003).

O escroto penduloso aumenta a área de superfície que facilita a exposição do cone vascular ao meio ambiente e permite que os testículos fiquem distantes do corpo do animal (BLANCHARD et al., 1992).

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

Fatores hormonais que estimulam e modulam a espermatogênese se faz necessário, particularmente para o testículo com localização extra-abdominal, o controle da temperatura

entre 2 e 6°C abaixo da temperatura corporal (KASTELIC et al., 1995; WAITES e SETCHELL, 1990). A termorregulação testículo-escrotal é um fenômeno complexo onde numerosos mecanismos locais desempenham papel fundamental. O cone vascular, formado pelas veias do plexo pampiniforme circundando a artéria testicular, permite a troca contracorrente de calor, a regulação do fluxo sanguíneo e a perda de calor por irradiação (BARTH, 1993).

A espermatogênese é um processo extremamente complexo, dependente de mecanismos que compreendem o código genético das células germinativas e uma rede de comunicação entre estas células germinativas e as células somáticas que estão presentes no testículo (VERHOEVEN et al., 2007). Esse processo é regulado por uma complexa e interligada rede de interação endócrina, parácrina e autócrina entre diversos tipos celulares (ROSER, 2008).

A espermatogênese no rato tem duração de 58 dias (FRANÇA et al., 1998, 2005). A espermatogênese pode ser subdividida em três fases: (a) Fase proliferativa ou espermatogonial, caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias; (b) fase meiótica ou espermatocitogênica, onde ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e duas divisões que resultam na formação de células haplóides denominadas espermátides; (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides sofrem várias alterações morfofisiológicas, tais como a formação do acrossoma, do flagelo e condensação nuclear, resultando na formação do espermatozóide (FRANÇA et al., 2005; SHARPE, 1994;).

As células de Sertoli estão localizadas nos túbulos seminíferos e possuem papel fundamental na espermatogênese. Estas células formam barreiras denominadas junções de oclusão, constituídas de desmossomos, junções do tipo “gap” e junções à base de actina (LUI e CHENG, 2007). A junção de oclusão, também denominada barreira hematotesticular, divide o epitélio seminífero em duas regiões distintas: o compartimento basal, onde se encontram as espermatogônias e os espermátócitos primários na fase inicial da prófase meiótica e outro denominado compartimento adluminal, onde se encontram os espermátócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermátócitos secundários e espermátides. As células de Sertoli também desempenham funções como o fornecimento de nutrientes, suporte físico (sustentação) para as células germinativas, mediação do hormônio folículo estimulante (FSH) e da testosterona na espermatogênese. As células de Sertoli têm participação ativa no fornecimento de nutrientes, no processo de espermiacção (liberação) das espermátides para o lúmen tubular, fagocitose dos

corpos residuais (excesso de citoplasma das células germinativas) e das células germinativas que sofrem apoptose (RUSSEL et al., 1990).

As células de Leydig também possuem papel fundamental para a espermatogênese. Localizadas no compartimento intertubular, elas possuem como principal função a produção de andrógenos (VERHOEVEN et al., 2007) mediada por estímulos de LH (hormônio luteinizante) e controlada através de um processo de retroalimentação negativa realizada pela testosterona na adenohipófise e no hipotálamo (ROSER, 2008). Nas células de Sertoli, células mióides, células musculares lisas dos vasos e nas próprias células de Leydig existem receptores para andrógenos. Um dos principais andrógenos produzidos pelo organismo é a testosterona, que também é responsável pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal, aparecimento dos caracteres sexuais secundários, manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade e manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e epidídimo (LUKE e COFFEY, 1994; ROSER, 2008; SHARPE, 1994).

Além destas células, também estão presentes no testículo outras células somáticas, tais como as células endoteliais e os fibroblastos (FRANÇA et al., 2005).

Medidas testiculares estão associadas com produção espermática diária (OSINOWO et al., 1992; SOUZA e COSTA, 1992), número de espermátides por células de Sertoli e área dos túbulos seminíferos, além de apresentarem relação inversa com a taxa de degeneração de células germinativas em touros (MOURA e ERICKSON, 1997; PALASZ et al., 1994). Assim, a diminuição na consistência do parênquima testicular está associada à redução na produção de espermatozóides (COULTER e FOOTE, 1979) e aumento do número de espermatócitos e espermátides degeneradas em todos os estágios do ciclo da espermatogênese em touros (MULLER et al., 1992).

As células de Leydig e de Sertoli parecem ser mais resistentes ao calor, enquanto as células germinativas são as mais termossensíveis do testículo. Todos os estágios da espermatogênese são susceptíveis ao calor, com o grau de lesão dependendo da extensão e da duração do insulto térmico. A regeneração da função espermática, após o dano causado pelo calor, depende da divisão contínua da espermatogônia A0, originada de um reservatório altamente resistente de *stem cells*, e do intervalo de tempo do término da injúria à restauração de espermatozoides normais no ejaculado, correspondente ao período de início da diferenciação na espermatogênese até a ejaculação (SETCHELL, 1998; WAITES et al., 1990).

A regeneração do epitélio seminífero pode ocorrer rapidamente e, se o período de hipertermia não for muito longo. Entretanto, esta recuperação pode ocorrer aos 60 dias após a

remoção do agente causal (McENTEE, 1990). Nos insultos severos, em que a espermatogônia A é atingida, pode ocorrer azoospermia (FONSECA e CHOW, 1995). No entanto, a regeneração do epitélio germinativo é possível e dependerá da sobrevivência das espermatogônias e das células de Sertoli. Se não for possível a regeneração, pode-se instalar fibrose ou calcificação nos testículos (McENTEE, 1990). A fase regenerativa é marcada por recuperação da concentração, da motilidade, do vigor e do número de espermatozoides morfológicamente normais, que, apesar da desorganização do epitélio germinativo durante a fase de degeneração, demonstra grande capacidade de recuperação devido à resistência das espermatogônias e das células de Sertoli (BARTH, 1993; GABALDI, 2000; FONSECA e CHOW, 1995).

Embora alguns autores afirmem que há poucas explicações sobre a morte celular por estresse térmico, Rockett et al. (2001) explicam que o processo de degeneração testicular pelo aumento de temperatura está relacionada a um grupo de proteínas conhecidas como proteínas do choque térmico (HSP), principalmente a HSP70.

2. 5 AS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP)

As HSP formam um grupo diversificado de proteínas encontradas em bactérias, plantas e animais (SHARP et al., 1999), classificadas em seis famílias de acordo com seu peso molecular: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e pequenas HSPs, dentre estas a HSP27 (JOLLY e MORIMOTO, 2000). Estas proteínas podem ser constitutivas ou induzidas, sendo encontradas nos mais diferentes compartimentos da célula. As proteínas HSP90 e HSP60 são constitutivas, enquanto que a HSP70 e a HSP27, além de serem constitutivas, também são induzidas por estresses como calor, estresse oxidativo, isquemia, etc. (GARRIDO et al., 2001; SHARP et al., 1999; VALENTIM et al., 2003).

As principais funções das HSP são transportar proteínas para o interior da célula; guiar a conformação de proteínas do citosol, do retículo endoplasmático e da mitocôndria; degradar as proteínas instáveis; dissociar complexos protéicos; prevenir a agregação de proteínas; controlar a atividade de proteínas reguladoras e remodelar proteínas com conformação alterada (GARRIDO et al., 2001; SAMALI e ORRENIUS, 1998).

A HSP27, pequena proteína de choque térmico, protege vários tipos celulares contra o estresse (KATO et al., 1995) e sua atividade pode ser regulada através do aumento de sua

expressão em condições estressantes e da fosforilação (BRUEY et al., 2000; MEHLEN et al., 1996; MEHLEN et al., 1997). A HSP70, assim como a HSP27, também possui ação antiapoptótica em situações de estresse celular (GARRIDO et al., 2001). A HSP105, proteína do choque térmico específica das células germinativas (ITOH e TASHIMA, 1990; 1991) é transportada do citoplasma para o núcleo da célula após dois dias de transferência do testículo para a cavidade abdominal de ratos. Esta proteína liga-se a p53 em células cultivadas dos testículos sob temperatura semelhante àquela da bolsa escrotal (32,5 °C), fato que não ocorre quando submetidos a 37 ou 42 °C (KUMAGAI et al., 2000).

Segundo Sies (1993), as lesões estruturais no testículo são marcantes quando altas temperaturas são induzidas sobre este órgão e seguramente as consequências não se restringem apenas ao testículo, mas também ao organismo como um todo, uma vez que é acompanhado por aumento na produção de radicais livres, determinando alterações no metabolismo celular sistêmico, no qual espécies oxidativas inofensivas podem se formar no interior celular e serem transportadas para outros sítios onde poderão ser ativadas e provocar oxidação de componentes celulares longe de onde foram produzidas

Do ponto de vista reprodutivo, tem sido crescente o interesse sobre meios que possibilitem a manutenção da fertilidade, tanto de caráter individual como plantéis mantidos em ambientes com altas temperaturas. Partindo-se do princípio que as mudanças na temperatura podem interferir na taxa de fertilidade dos machos, devido a processos degenerativos testiculares, é que se lançou a hipótese de que a utilização do chá da casca de noz-pecã (*Carya illinoensis*), por possuir atividade antioxidante comprovada em virtude de sua alta concentração de compostos fenólicos e taninos condensados, sequestradores de radicais livres, possa acelerar o processo de recuperação da espermatogênese nos testículos submetidos à injúria térmica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito preventivo e/ou restaurador do chá da casca de noz-pecã (*Carya illinoensis*) sobre as ações deletérias produzidas pelo calor no parênquima testicular de ratos Wistar e avaliar a capacidade deste chá em acelerar o processo de recuperação do processo espermatogênico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar os pesos: testicular, epididimário, prostático e o da vesícula seminal nos grupos experimentais.
- b. Determinar proporções volumétricas entre componentes do parênquima testicular nos períodos pós-choque térmico.
- c. Determinar os níveis de peroxidação lipídica por meio TBARS no homogenato dos testículos de ratos submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã.
- d. Determinar os níveis de glutathione reduzida, catalase, vitamina C, grupos carbonílas e conteúdo protéico no parênquima testicular de ratos submetidos à injúria térmica, tratados ou não com chá de noz-pecã.
- e. Determinar os níveis plasmáticos de testosterona nos grupos experimentais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 45 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), pertencentes ao biotério da Área de Fisiologia do DMFA/UFRPE, os quais foram mantidos na temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração industrial peletizada com níveis nutricionais adequados. Água e comida foram oferecidas *ad libitum* até o final do experimento. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRPE (CEUA-UFRPE 23082.008169/2010) em concordância aos princípios de pesquisa com uso de animais.

Os ratos com 90 dias de idade foram escolhidos por amostragem não probabilística de conveniência e submetidos aos diversos tratamentos, de acordo com o grupo experimental: grupo G1- controle com choque térmico (n=15); grupo G2 - Chá de noz-pecã Pré Choque Térmico (n=15); e grupo G3 - Chá de noz-pecã Pré e Pós Choque Térmico (n=15) (Quadro 1).

Grupos experimentais	Duração do tratamento com chá pré-choque térmico	Dias de coleta após submissão de testículo ao choque térmico/número de animais		
		15	30	60
Choque Térmico (G1) (n=15)	-	5	5	5
Chá Pré Choque Térmico (G2) (n=15)	30 dias	5	5	5
Chá Pré e Pós Choque Térmico (n=15)	30 dias	5	5	5

Quadro 1 – Disposição dos grupos experimentais, número de animais segundo os tempos de observação.

Administrou-se *ad libitum* chá da casca de noz-pecã, durante 30 dias antes do choque térmico testicular, aos animais dos grupos G2 e G3. Ao grupo G1, administrou-se água *ad libitum* durante todo período experimental. Aos 120 dias, a fim de se realizar o choque térmico testicular, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (50mg/Kg) e posteriormente foram posicionados em um suporte plástico adaptado ao banho-maria. Os testículos foram imersos na água, a temperatura de 43°C por 15 minutos. Após a exposição térmica testicular, os animais foram transferidos para caixas de polipropileno e mantidos em temperatura ambiente até a recuperação da anestesia (LUE et al., 1999). Os animais de cada grupo foram perfundidos após 15, 30 e 60 dias do choque térmico. para avaliar o efeito temporal da injúria térmica testicular sobre o processo espermato gênico

Para tal, cada animal foi heparinizado (125 UI/100g de peso corporal) e anestesiado por injeção intraperitoneal de Tiopental sódico (50mg/kg; ROCHE, Brasil). Posteriormente foi realizada coleta de sangue total por punção no seio venoso (confluência das veias cavas), centrifugação e acondicionamento de duas alíquotas de 1 ml de plasma sanguíneo em ependorffs à -20°C, para posterior dosagem de testosterona. Após coleta de sangue realizou-se perfusão intracardiaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (500 UI/L; AKZO ORGANON TEKNIKA) e nitroprussiato de sódio (100mg/L; SIGMA), por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Ao final deste período, o testículo direito de cada animal foi imediatamente removido, pesado e homogeneizado a 10 volumes (10 ml /g testículo) em solução Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, centrifugado (5000 rpm/min). O sobrenadante foi armazenado e mantido em tubos ependorffs para posterior análise bioquímica de indicadores de estresse oxidativo.

Em seguida, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído (VETEC, Brasil) a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos.

Após a perfusão com solução fixadora foram removidos e pesados: testículo esquerdo, epidídimos, próstata e glândula seminal.

Seccionou-se os testículos em fragmentos de até 2 mm de espessura, os quais foram submetidos à refixação na mesma solução de perfusão. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA®). Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram feitos, posteriormente corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados morfológicamente e morfometricamente.

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de graticula micrométrica (Olympus) com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica de testículo em aumento de 400X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6615 pontos para cada animal.

O testículo foi dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do primeiro foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lúmen; enquanto no segundo foram analisados as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. Como a densidade do testículo é em torno de 1,03 a 1,04 (França, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada componente do testículo, expresso em µL, foi estabelecido a partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o peso líquido

do testículo (mg). O valor deste último foi obtido pela subtração 6,5% da albugínea do peso testicular bruto (RUSSELL e FRANÇA, 1995).

4. 2 DOSAGEM DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA

A dosagem foi realizada pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm, conforme descrito por BROWN *et al.* (2004).

Para este ensaio inicialmente 66,7µl do anticorpo (Polyclonal anti-testosterona R156/7, Coralie Munro, University of California, Davis, USA.) foi diluído em 5 ml de tampão (coating buffer: Na₂CO₃, NaHCO₃, H₂O ultra pura, pH ajustado para 9,6). Posteriormente 50µl desta solução de anticorpo foi adicionado em cada poço da placa (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp). Após isso, a placa foi coberta com selador plástico e mantida a 4°C por 12 horas no máximo.

Uma vez preparada a placa, preparou-se curva padrão, por meio de diluições seriadas de 250µl do padrão de concentração 600 pg/50µl de testosterona (17-hydroxy-4-androsten-3-one, Steraloids, Sigma A6950) até a concentração de 2,3 pg/50µl, em 250µl de solução de ensaio de ELISA (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; BSA - Sigma Aldrich, A7906; H₂O ultra pura, pH ajustado para 7,00). O hormônio conjugado com a enzima HRP (Testosterone-horseradish Peroxidase) foi diluído (33,3µl em 5 ml da solução de ensaio de ELISA).

Imediatamente antes de dar início ao ensaio, a placa foi lavada 5 vezes com a solução (NaCl; Tween 20 – Sigma, P1379; H₂O ultra pura) e o excesso de solução foi retirado batendo-se a placa em papel toalha. Posteriormente, nos poços correspondentes foram pipetados 50µl dos padrões, controles e amostras e logo após 50µl da HRP, com o cuidado que não se ultrapassasse mais que 10 minutos neste processo. A placa foi novamente coberta com o selador e deixada em incubação por exatamente 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, repetiu-se o procedimento de lavagem.

Finalmente, preparou-se, imediatamente antes do uso, a solução de substrato para ELISA combinando 40µl 0,5M H₂O₂, 125µl 40 mM ABTS (Calbiochem, ABTSTM Chromophore, Diammonium Salt) e 12,5 ml de solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; H₂O ultra pura, pH ajustado para 4,00). Foi adicionado 100µl em todos os poços contendo padrão, controle ou amostra. A placa foi coberta, para incubar em temperatura ambiente e sob agitação (Multi-Pulse Vortexer; modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®),

até que a densidade óptica dos poços zero ficasse entre 0.9 e 1. Procedeu-se então a leitura no leitor de microplacas (TECAN).

Todas as amostras foram lidas em duplicata, com coeficiente de variação intra e inter-ensaio menor do que 10%.

4. 3 DETERMINAÇÃO DE INDICADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM HOMOGENATO DE TESTÍCULO

4. 3. 1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) testiculares foram determinadas de acordo com o método descrito por Ohkawa et al. (1979). Esta determinação foi estimada através de um cromógeno rosa produzido pela reação entre o ácido tiobarbitúrico com malondialdeído (MDA) a 100 °C, medido espectrofotometricamente a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol MDA/g tecido.

4. 3. 2 Quantificação dos níveis de proteína carboniladas em homogenato de testículo

Para determinação dos níveis de proteína carbonil foi empregado o método de Yan et al. (1995) com pequenas modificações. Inicialmente a solução de proteína foi misturada com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH; 10 mM em 2M HCl). Após a incubação à temperatura ambiente durante 1 hora em um ambiente escuro, foi adicionado tampão desnaturante (solução tampão de fosfato de sódio 150 mM, pH 6.8, contendo 3% de dodecil sulfato de sódio), etanol (99,8%) e hexano (99,5%), foi agitado em vórtex por 40 segundos e centrifugado por 15 minutos. Posteriormente, a proteína isolada da interface foi lavada duas vezes com acetato de etila/etanol 1:1 v/v e suspenso no tampão desnaturante. Cada amostra em DNPH foi lida a 370 nm em espectrofotômetro, contra a correspondente amostra em HCl (branco) e o total de carbonilação foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de $22,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, de acordo com Levine et al. (1989). Os resultados foram expressos em nmol carbonil/g tecido.

4. 3. 3 Níveis de glutathiona reduzida

O conteúdo de GSH no testículo foi determinado depois da reação com ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A coloração amarela desenvolvida foi lida a 412 nm, de acordo com Boyne e Ellman (1972) e modificações de Jacques-Silva et al. (2001). Uma curva padrão utilizando cisteína foi usada para calcular o conteúdo de GSH nas amostras de testículos, sendo os resultados foram expressos em $\mu\text{mol GSH/g tecido}$.

4. 3. 4 Níveis de vitamina C

O conteúdo de vitamina C foi determinado conforme descrito por Galley et al. (1996) com algumas modificações (JACQUES-SILVA et al., 2001). Este método produz um cromógeno de cor laranja após reação com dinitrofenilhidrazina a 37 °C, medido espectrofotometricamente a 520 nm. Uma curva padrão utilizando ácido ascórbico foi usada para calcular o conteúdo de vitamina C no tecido testicular, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g VIT/g tecido}$.

4. 3. 5 Atividade enzimática da catalase

A atividade enzimática da catalase foi espectrofotometricamente quantificada nas amostras de tecido testicular pelo método de Aebi (1984). Essa determinação envolve o desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença do homogenato celular (pH 7, 25 °C) a 240 nm. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/g tecido}$.

4. 3. 6 Dosagem protéica

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), que envolve a formação de um cromógeno de cor azul após adição do Folin Ciocalteu, medido espectrofotometricamente a 625 nm.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos através da estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão); e quando necessárias estas médias foram

avaliadas mediante técnica de análise de variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações com o intuito de analisar quais grupos diferiram entre si. Para as construções gráficas, utilizou-se o pacote matemático Graphic pad versão 3.0 da Prism, como também as planilhas do Excel versão 7.0 da Microsoft. O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

O calor aplicado diretamente sobre os testículos tem fornecido novas informações sobre os mecanismos desencadeadores dos danos à espermatogênese e de tratamentos que podem prevenir os danos testiculares através do bloqueio da apoptose (SETCHELL, 2006).

As células germinativas testiculares são vulneráveis ao estresse térmico e sofrem apoptose em resposta a temperaturas supraescrotais. (KUMAGAI et al., 2002). Desta maneira, o efeito mais marcante da exposição aguda ou crônica do testículo ao calor é a redução do seu peso. Isto ocorre em ratos no período entre 1 e 2 dias após uma única exposição do testículo a uma temperatura de 41°C por 60 minutos ou 43°C por 30 minutos (SETCHELL, 1998a; SETCHELL et al., 1996; WAITES e SETCHELL, 1990).

Acredita-se que os efeitos do calor sobre os testículos são completamente reversíveis, mas alguns estudos mais recentes têm comprovado que isto nem sempre acontece. Entretanto, o peso testicular não retornou aos valores normais mesmo depois de 60 dias de uma única exposição testicular ao calor (SETCHELL, 1998a). Medidas testiculares estão associadas com produção espermática diária (OSINOWO et al., 1992; SOUZA e COSTA, 1992), número de espermátides por células de Sertoli e área dos túbulos seminíferos, além de apresentarem relação inversa com a taxa de degeneração de células germinativas em touros (BERNDTSON et al., 1987; PALASZ et al., 1994). A diminuição na consistência do parênquima testicular está associada à redução na produção de espermatozoides (COULTER e FOOTE, 1979) e aumento do número de espermátocitos e espermátides degeneradas em todos os estágios do ciclo da espermatogênese em touros (MULLER et al., 1992).

Tabela 1. Peso testicular (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
15	0.76 \pm 0.06	0.70 \pm 0.08	0.69 \pm 0.11	0.4623
30	0.79 \pm 0.11	1.11 \pm 0.43	1.31 \pm 0.47	0.1282
60	0.94 \pm 0.10	1.07 \pm 0.33	1.32 \pm 0.31	0.1266

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular.

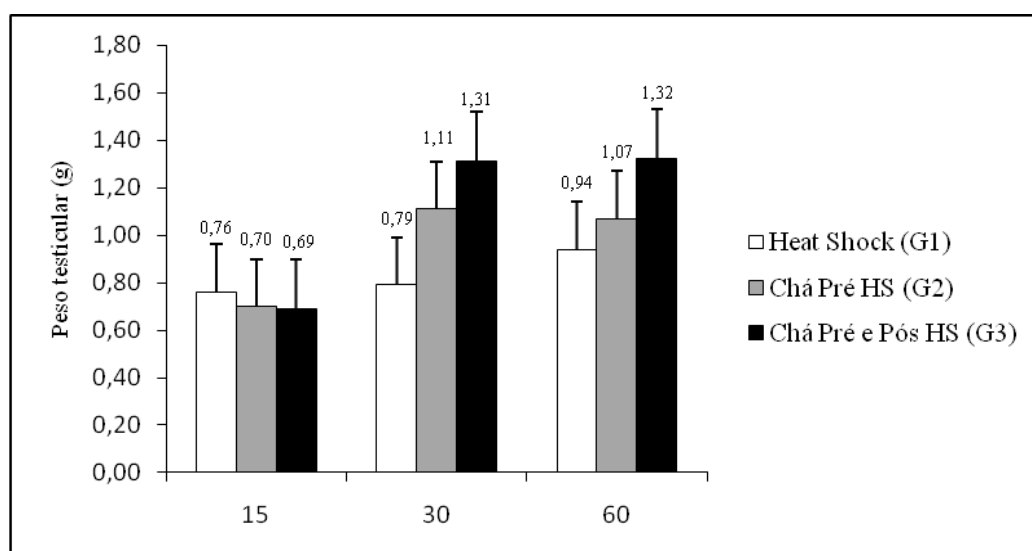


Figura 1. Peso testicular (g), de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico.

Com relação ao peso testicular, apresentado na tabela 1 e figura 1, não houve diferença significativa neste parâmetro entre os tratamentos dos diferentes tempos experimentais. Contudo, observou-se tendência à redução de peso testicular, de maneira uniforme, aos 30 e 60 dias nos animais que sofreram choque térmico, e que não foram tratados com o chá de noz-pecã. Vale ressaltar que os animais de 30 dias submetidos ao choque térmico e tratados previamente com o chá de noz-pecã, grupo G2, apresentaram tendência de recuperação em 29% no peso testicular; assim como os animais do grupo G3 tratados pré e pós-choque com chá de noz-pecã apresentaram tendência de recuperação de 40%. De forma análoga, para os animais dos grupos G2 e G3, aos 60 dias pós-choque, a tendência de recuperação no peso do testículo foi de 12% e 29% respectivamente em relação ao grupo G1.

De acordo com os nossos resultados é possível afirmar que o chá da casca de Noz Pecã devido a sua riqueza em ácidos graxos monoinsaturados, elevada capacidade antioxidante, pelo fato de possuir alto teor de compostos fenólicos e taninos condensados (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007) tenha proporcionado uma melhor recuperação do peso testicular, uma vez que, estas substâncias presentes na casca da noz possuem propriedade sequestradoras de ERO. É importante salientar que a exposição do parênquima testicular a altas temperaturas desencadeia a formação de radicais livres podendo que podem causar danos celulares irreversíveis levando a morte celular por apoptose (SETCHELL, 2006).

Tabela 2. Peso epididimário (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média ± desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
15	0.45 ± 0.03a	0.33 ± 0.06a	0.65 ± 0.13b	0.0002
30	0.41 ± 0.04a	0.57 ± 0.06a	0.57 ± 0.10b	0.0037
60	0.42 ± 0.08	0.50 ± 0.07	0.52 ± 0.21	0.4705

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

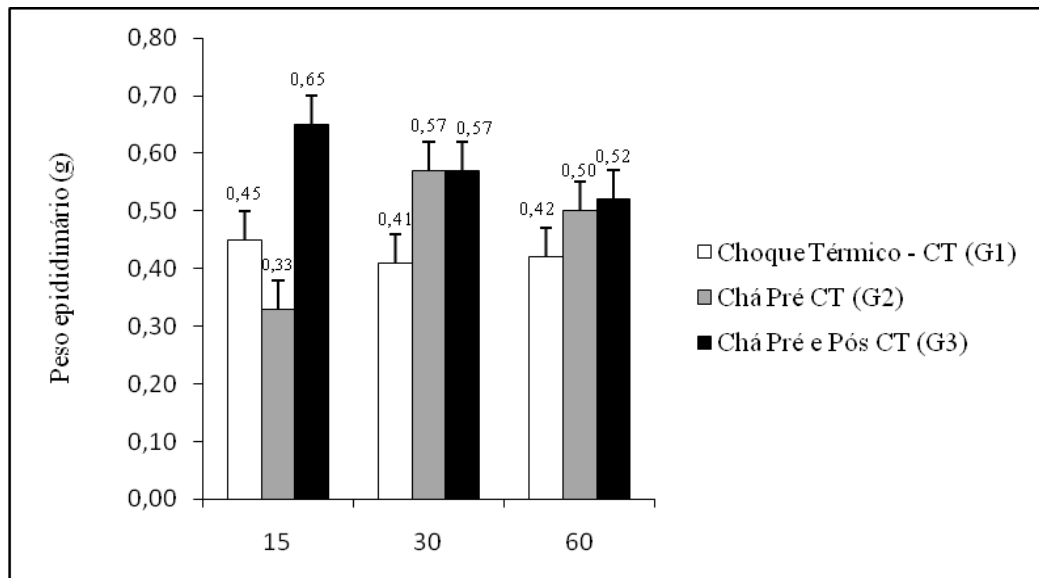


Figura 2. Peso epididimário (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média ± desvio padrão). Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico.

No tocante à tabela 2 e figura 2, referente ao peso epididimário de ratos Wistar submetidos à injúria térmica testicular, aos 15 dias do ensaio experimental, constatou-se uma

redução no peso deste órgão nos animais dos grupos G1 e G2, observamos que houve diferença extremamente significativa no peso epididimário entre os grupos G3. Por outro lado, aos 30 dias, os grupos G2 e G3 apresentaram peso epididimário superior ao G1 ($P = 0,0037$). Aos 60 dias, não se observou diferença significativa entre os grupos.

Temperaturas supraescrotais podem alterar os espermatozóides maduros durante o estágio final de desenvolvimento na região da cabeça do epidídimo, ocorrendo alterações estruturais e metabólicas; este gameta pode fertilizar, mas ocorre a morte embrionária subsequente (GABALDI e WOLF, 2002). De acordo com Creasy (2003), a redução do peso epididimário é indicativa de diminuição da espermatogênese no testículo, e redução do conteúdo no epidídimo. Segundo Cao et al. (2009), o estresse térmico é capaz de induzir diferentes graus de diminuição no índice epididimário e na concentração espermática pós-choque térmico. Além disso, segundo os mesmos autores, após o estresse térmico a HSP70 foi expressa principalmente no citoplasma das células com estereocílios, porém não se observou esta expressão em células claras e basais. Portanto, de acordo com o nosso experimento o choque térmico pode influenciar o epidídimo e suas funções, porém a utilização do chá da casca da Noz-Pecã pode ter influenciado em minimizar os efeitos do calor sobre o peso epididimário, principalmente no 15º e 30º dias após a injúria térmica.

Tabela 3. Peso da próstata (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
15	1.14 \pm 0.40	0.33 \pm 0.06	0.65 \pm 0.13	0.7867
30	0.41 \pm 0.04a	0.57 \pm 0.06b	0.57 \pm 0.10b	0.0045
60	0.42 \pm 0.08	0.50 \pm 0.07	0.52 \pm 0.21	0.7368

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

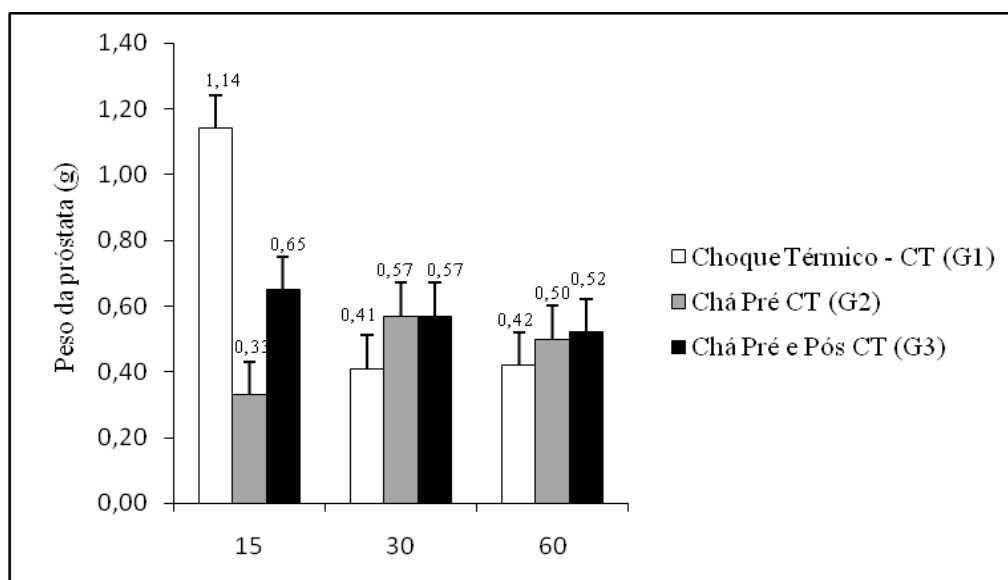


Figura 3. Peso da próstata (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico.

De acordo com os resultados da tabela 3 e figura 3 referentes ao peso da próstata de ratos Wistar, expresso em gramas, foi observado que chá de noz-pecã administrado antes do choque térmico testicular, bem como antes e depois do choque influenciou positivamente na recuperação do peso prostático em relação ao grupo controle após 30° dia.

Tabela 4. Peso da glândula seminal (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
15	126 \pm 0.24	0.88 \pm 0.41	1.23 \pm 0.19	0.1245
30	1.18 \pm 0.20a	1.92 \pm 0.23b	2.08 \pm 0.38b	0.0006
60	1.96 \pm 0.57	1.77 \pm 0.75	1.70 \pm 0.34	0.7715

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

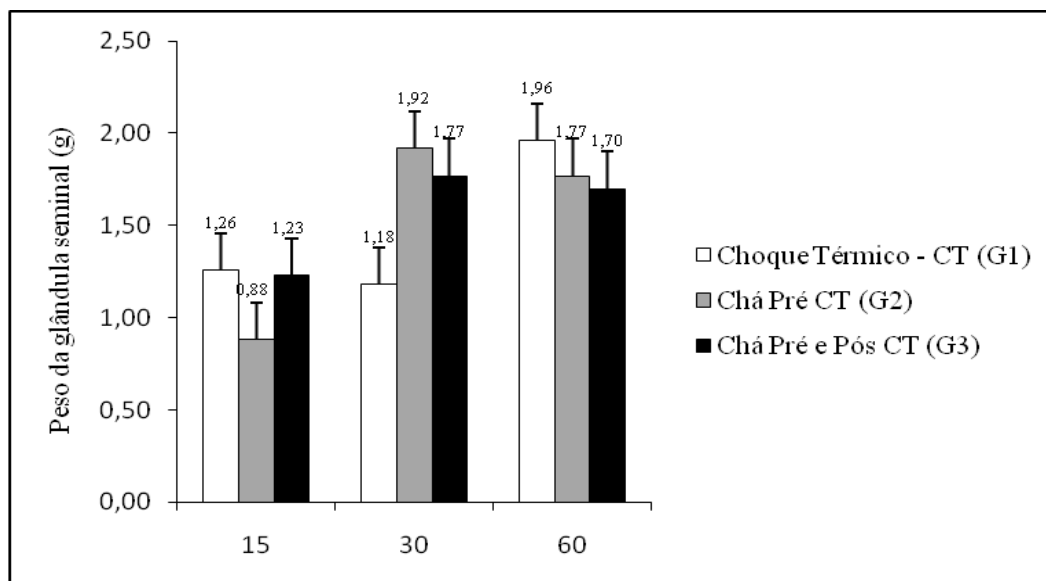


Figura 4. Peso da glândula seminal (g) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão). Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico.

Com relação ao peso da glândula seminal, expresso em gramas, apresentado na tabela 4 e figura 4, aos 15 dias não se observou diferença significativa entre os grupos de tratamento. Entretanto, aos 30 dias do ensaio experimental houve um aumento muito significativo no peso deste órgão nos animais que receberam chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular (G2), bem como naqueles que receberam o chá antes e depois do choque térmico (G3) em relação ao grupo que sofreu injúria testicular induzida pelo calor, porém não recebeu tratamento com o chá de noz-pecã, grupo G1. ($P = 0,0006$). Desta forma, a administração do chá influenciou positivamente na recuperação do peso deste órgão em relação ao grupo controle após 30° dia. Aos 60 dias, não se observou diferença significativa de peso entre os grupos.

É do conhecimento de vários autores na área de biologia reprodutiva em mamíferos que a atividade da próstata e da glândula seminal, no indivíduo adulto possui íntima correlação com os níveis de andrógenos, principalmente a testosterona testicular, uma vez que a orquiectomia ou drogas com atividades farmacológicas antiandrogênicas promovem atrofia das glândulas sexuais acessórias (LUKE e COFFEY, 1994). Por outro lado, o aumento dos níveis séricos de testosterona e andrógenos de outras fontes pode produzir hiperplasia ou hipertrofia de glândulas sexuais acessórias (BRUENGGGER et al., 1986; MCGINNIS et al., 2002). A capacidade secretora de testosterona não é correlacionada com o número de células de Leydig por grama de testículo, volume de vasos sanguíneos, forma alongada das células ou

macrófagos e, sim com o volume destas células e com o seu número por testículo (SILVA JUNIOR, 2006).

Neste trabalho os diferentes protocolos experimentais nos quais se utilizou o chá de Noz-Pecã produziram recuperação nos pesos da próstata e glândula seminal aos 30 dias após a injúria testicular. Os níveis plasmáticos de testosterona avaliados aos 30 dias não foram diferentes estatisticamente entre os grupos. Sabendo-se da relação andrógeno-dependente da próstata e da vesícula seminal em relação à testosterona, a recuperação do peso destes órgãos pode estar relacionada à capacidade produtora de testosterona nos animais tratados. Isto pode ser justificado pelo aumento volumétrico das células de Leydig observada nos animais submetidos ao choque térmico e tratados com chá de Noz-Pecã e avaliado 30 dias depois da injúria testicular.

Tabela 5. Volume total das células de Leydig (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	10.2 \pm 6.8a	42.6 \pm 14.3a	67.3 \pm 49.0b	0.0321
60	79.6 \pm 32.4a	29.2 \pm 7.7b	36.7 \pm 9.0b	0.0036

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

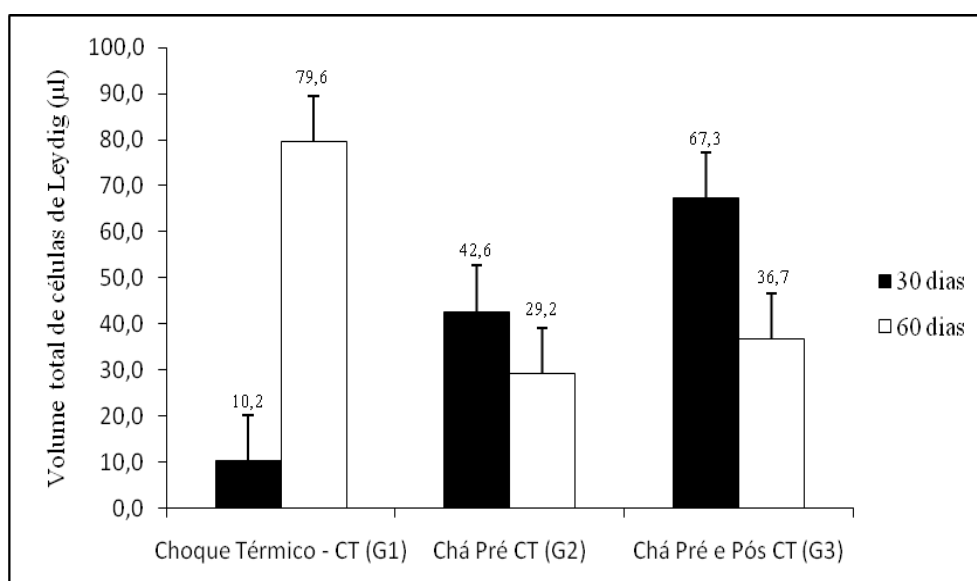


Figura 5. Volume total das células de Leydig (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.

Considerando os resultados apresentados na tabela 5 e figura 5, aos 30 dias do período experimental ocorreu diminuição significativa no volume total de células de Leydig (μl) no grupo submetido ao choque térmico testicular (G1) em relação aos grupos G2 e G3 que receberam chá de noz-pecã ($p < 0,05$). Por outro lado, houve diminuição muito significativa neste parâmetro aos 60 dias nos animais que receberam o chá de noz-pecã em relação ao grupo G1, animais que sofreram injúria testicular térmica e não receberam o chá de noz-pecã.

As células de Leydig constituem-se na fonte de andrógenos testiculares que são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol. Baseado em inúmeros trabalhos realizados em diferentes laboratórios pode-se observar diferenças na população de células de Leydig por grama de testículo, como também no volume da célula em várias espécies de mamíferos (EWING e KEENEY, 1993; SILVA JUNIOR e FRANÇA, 2001). Além disso, França et al. (2005) relacionaram a quantidade e o tamanho das células de Leydig, bem como o volume do retículo endoplasmático a capacidade destas células quanto a produção de testosterona.

As células germinativas em todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero são susceptíveis ao calor, com o grau de lesão dependendo da extensão e da duração do insulto térmico. Contudo, as células de Leydig e de Sertoli parecem ser mais resistentes ao calor, enquanto as células germinativas são mais termossensíveis (WAITES e SETCHELL, 1990). Entretanto, é importante ressaltar que peróxido de hidrogênio gerado a partir do choque térmico pode agir diretamente sobre as células de Leydig diminuindo a produção de testosterona através da inibição da atividade do complexo enzimático P450_{scc} e a expressão da proteína StAR (TSAI et al., 2003).

No presente experimento foi observado que os animais tratados com o chá da casca de Noz-Pecã antes e depois da injúria térmica, avaliados aos 30 dias, possuíam o volume total das células de Leydig superior aos demais grupos, muito embora não se tenha constatado diferenças quanto ao nível de testosterona plasmática neste período de avaliação entre os grupos. Paradoxalmente, nos animais submetidos à injúria térmica, tratados com o chá da casca de Noz-Pecã e avaliados aos 60 dias constatou-se redução bastante significativa ($p = 0,0036$) no volume total das células de Leydig. Apesar desta redução, não foi verificada alterações significativas nos níveis de testosterona neste período da avaliação. Contudo, nota-se tendência de aumento 48 e 75% nos níveis de testosterona do grupo G1 em relação a G3 e G2, respectivamente. A princípio, as diversas substâncias antioxidantes presentes em abundância no chá da casca de Noz-Pecã contribuíram para recuperação deste parâmetro aos 30 dias, uma vez que seus constituintes fitoquímicos possuem efeito protetores principalmente

por sua atividade sequestradora de radicais livres (SAWA et al., 1999) preservando a viabilidade celular (LI et al., 2000).

Por outro lado, o mesmo não pode ser mencionado no período de 60 dias de avaliação, haja vista que a redução do volume total das células de Leydig está relacionada ao aumento da volumetria dos túbulos seminíferos observado nos animais que receberam o chá.

Tabela 6. Volume total de Epitélio seminífero (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	373.3 \pm 85.7	638.0 \pm 298.9	769.3 \pm 297.8	0.0631
60	525.5 \pm 38.8a	738.0 \pm 268.8b	890.7 \pm 221.1b	0.0418

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

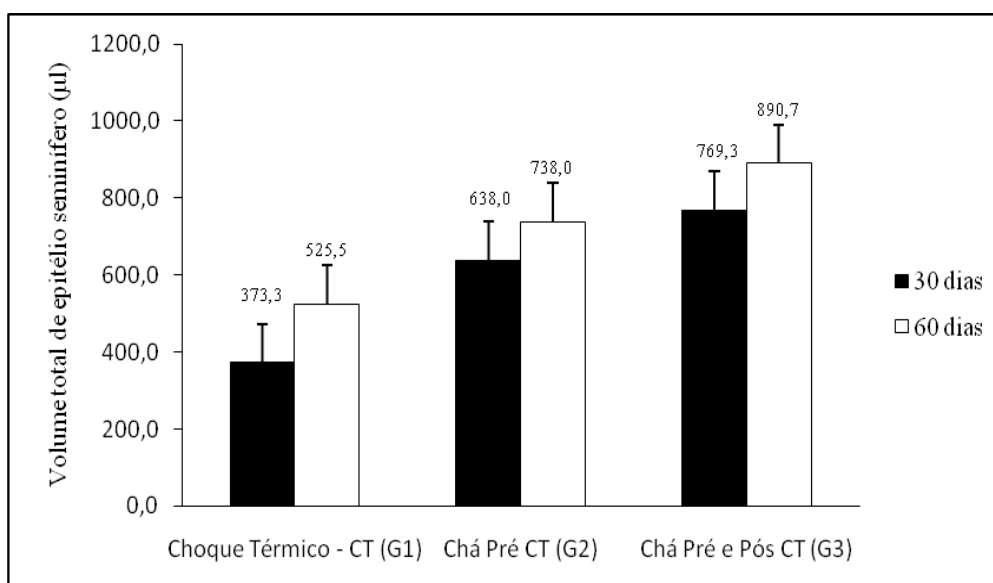


Figura 6. Volume total de epitélio seminífero (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.

De acordo com os resultados mostrados na tabela 6 e figura 6 não se observou diferença significativa no volume total de epitélio seminífero (μL) aos 30 dias. Contudo, observou-se que os animais deste tempo experimental apresentaram tendência de aumento deste parâmetro em 42% e 52% nos grupos que receberam chá de noz-pecã, grupos G2 e G3 respectivamente. De forma análoga, porém significativa, aos 60 dias, a administração do chá acelerou a recuperação deste parâmetro, pois houve um aumento do volume total de epitélio

seminífero (μL) tanto nos animais que receberam o chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular, assim como naqueles que receberam co-tratamento com chá antes e depois do choque térmico em relação ao grupo submetido à injúria térmica, porém que não recebeu o chá ($p < 0,05$).

O insulto térmico testicular pode promover a degeneração do epitélio seminífero rapidamente. Entretanto, se o período de hipertermia não for muito longo, a recuperação completa pode ocorrer em um período curto de tempo apresentando melhoria visível 60 dias após a remoção do agente causal (McENTEE, 2002). No entanto, a regeneração do epitélio germinativo é possível e dependerá da sobrevivência das espermatogônias e das células de Sertoli. Se não for possível a regeneração, pode-se instalar fibrose ou calcificação nos testículos (THOMSON, 1990; McENTEE, 2002). A fase regenerativa é marcada por recuperação da concentração, da motilidade, do vigor e do número de espermatozoides morfológicamente normais, que, apesar da desorganização do epitélio germinativo durante a fase de degeneração, demonstra grande capacidade de recuperação devido à resistência das espermatogônias e das células de Sertoli (BARTH, 1993; FONSECA e CHOW, 1995; GABALDI, 2000). No presente trabalho foi possível observar que a administração do chá da casca de noz-pecã surtiu efeito protetor e restaurador sobre o epitélio germinativo. Provavelmente, as propriedades antioxidantes já comprovadas do chá de *Carya illinoensis* (PRADO et al., 2009) possibilitaram uma redução dos efeitos dos ERO gerados a partir da injúria térmica sobre o testículo. Alguns quimioterápicos promovem danos severos a tecidos nobres devido a indução da formação de ERO. De acordo com Benvegnú et al. (2010) o extrato aquoso da casca de noz-pecã promoveu efeitos protetores contra a toxicidade geral induzida pela ciclofosfamida no coração, rins, fígado e bexiga.

Tabela 7. Lúmen tubular (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	7.8 \pm 9.8a	89.0 \pm 42.4b	99.3 \pm 53.8b	0.0065
60	82.0 \pm 30.0	88.7 \pm 21.1	128.6 \pm 56.8	0.1678

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

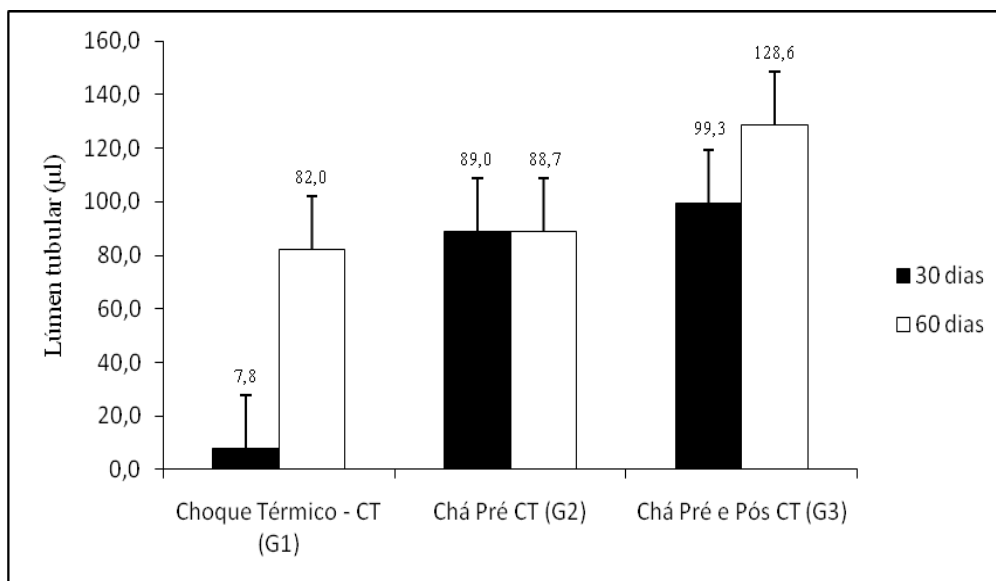


Figura 7. Lúmen tubular (µL) de ratos Wistar controle e submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.

Com relação aos resultados apresentados na tabela 7 e figura 7, referentes ao volume do lúmen tubular, expresso em microlitros, houve no 30º dia do ensaio experimental uma redução significativa no lúmen tubular do grupo G1 em relação aos grupos G2 e G3 ($p < 0,05$). Entretanto, aos 60 dias pós-choque não se observou diferenças significativas nos grupos estudados.

A redução deste parâmetro, em torno de 88 a 87%, apresentada pelo grupo submetido ao choque térmico testicular, e que não recebeu chá de noz-pecã durante o experimento (G1) em relação aos demais grupos, se deu provavelmente pela redução de lúmen, ocasionado pelo acúmulo de células de descamação tubular decorrente da lesão provocada pelo calor.

A degeneração testicular pode estar relacionada ao envelhecimento, deficiências nutricionais, choque térmico, hormônios, neoplasias, irradiação e trauma, entre outros, que causam interrupção do processo espermatogênico. Este evento se caracteriza inicialmente pela descamação das células germinativas no lúmen tubular e redução da altura do epitélio seminífero, necrose e apoptose das células do epitélio germinativo e hialinização dos túbulos seminíferos (FOSTER, 1997; ORTEGA-PACHECO et al., 2006). Estas células são um achado patológico comum nos testículos degenerados e se formam em virtude da desestabilização do citoesqueleto que mantém a integridade das pontes entre as células germinativas e as células de Sertoli, resultando na liberação das células germinativas no lúmen tubular (RUSSELL et al., 1990).

Portanto, no presente ensaio experimental pode-se observar a redução aos 30 dias no volume luminal nos animais não tratados pode estar relacionada à descamação de células

germinativas e obliteração do lúmen reduzindo assim a sua volumetria total no parênquima testicular. Por outro lado, os animais tratados não apresentaram esta condição.

Tabela 8. Túnica própria do túbulo seminífero (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	13.9 \pm 9.3	23.3 \pm 9.4	20.3 \pm 4.9	0.0919
60	46.2 \pm 7.8a	13.9 \pm 3.0b	24.6 \pm 7.4b	0.0001

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

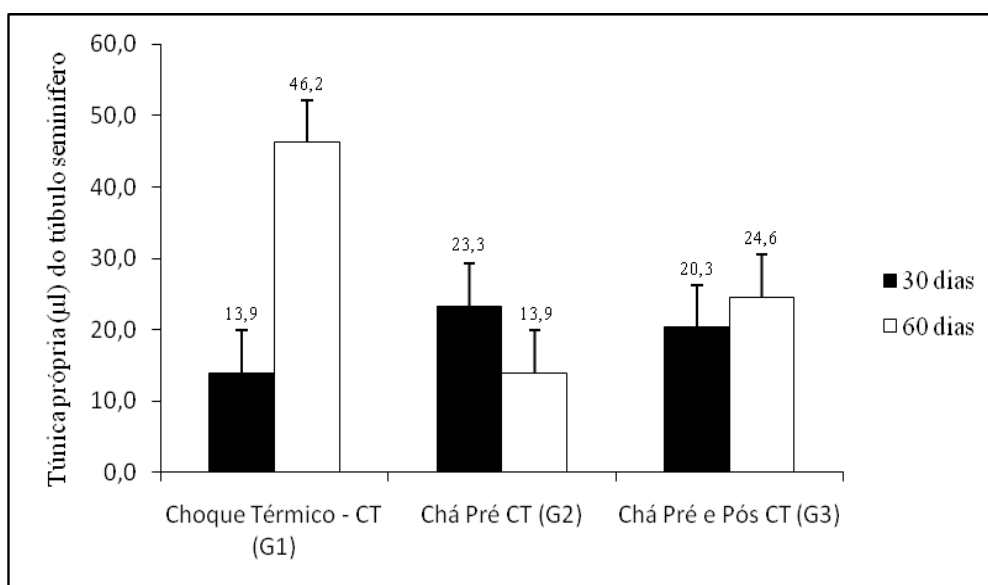


Figura 8. Túnica própria do túbulo seminífero (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.

De acordo com a tabela 8 e figura 8, podemos observar que não ocorreu variação significativa entre os diferentes grupos experimentais com relação ao volume da túnica própria do túbulo seminífero aos 30 dias. Contudo, aos 60 dias pós-choque térmico testicular constatou-se que o grupo de animais submetido ao choque e não tratado com chá de noz-pecã, apresentou aumento significativo no volume total da túnica própria do túbulo seminífero, expresso em microlitros.

Em processos degenerativos testiculares ocorre espessamento da túnica própria, caracterizada por estímulo a deposição da matriz extracelular. Em testículos criptorquídicos observa-se com frequência espessamento elétron-denso homogêneo da lâmina basal dos túbulos seminíferos, fibrose da túnica própria e do tecido conjuntivo intertubular (TRISTÃO, 1986).

Reforçando o autor citado anteriormente, o espessamento da lâmina própria de túbulos seminíferos degenerados e não degenerados de testículos criptorquídicos ocorre devido ao aumento do conteúdo de fibras colágenas e de glicoconjugados (PINART et al., 2001).

As espécies de oxigênio reativo são geradas durante o estresse térmico e causam a morte de células espermatogênicas. Alternativamente, desde que uma curta exposição ao calor desencadeia danos nocivos às células espermatogênicas, as ERO geradas podem funcionar como um sinal para morte celular além de causar dano oxidativo diretamente sobre as células (ISHII et al., 2005).

No presente trabalho, a utilização do chá da casca de noz-pecã de maneira continua após a injúria térmica testicular preveniu o aumento no volume total de túnica própria no testículo, provavelmente devido à ação antioxidante e/ou antiinflamatória dos componentes da infusão da casca de noz-pecã sobre o parênquima testicular.

Tabela 9. Túbulos seminíferos (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	395.0 \pm 77.5a	795.3 \pm 294.3ab	888.9 \pm 336.2b	0.0260
60	650.7 \pm 50.4	840.6 \pm 274.9	1043.9 \pm 269.8	0.0513

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

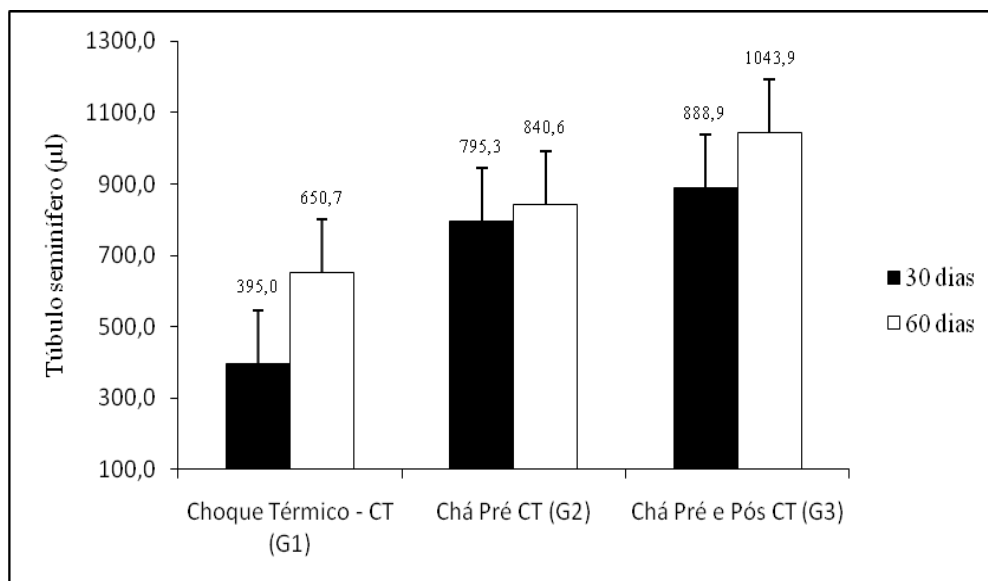


Figura 9. Túbulos seminíferos (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.

O percentual volumétrico de túbulos seminíferos que ocupa o parênquima testicular em ratos é de 89%, e tem correlação direta com parâmetros testiculares, como comprimento tubular, produção espermática e população de células de Sertoli (FRANÇA e RUSSELL, 1995). A redução do volume de túbulos seminíferos pode ocorrer em resposta ao estresse térmico levando a degeneração das células germinativas através da morte celular programada (apoptose) caracterizada pela fragmentação de DNA (BILLING et al., 1995; MIEUSSET et al., 1995; TAPANAINEM et al., 1993). Neste processo, o Fator 1 da transcrição do choque térmico é ativado, induzindo apoptose de espermatócitos, resultando em infertilidade de ratos (NAKAI et al., 2000).

Em camundongos *sod1*-knockout para superóxido dismutase, as espécies reativas de oxigênio geradas durante o choque térmico causam morte das células espermatogênicas e atrasam a recuperação do parênquima testicular. Portanto, os radicais livres gerados no choque térmico podem funcionar como sinal de morte celular ou causar danos oxidativo diretos as células (ISHII et al., 2005).

No presente trabalho, pôde-se constatar que o chá de Noz-Pecã, administrado à dieta, apresentou efeito preventivo contra os danos oxidativos causados pelo choque térmico testicular nos animais do grupo G2, e efeito preventivo e restaurador nos animais que receberam co-tratamento com chá antes e depois do evento térmico no que diz respeito ao volume se túbulos seminíferos.

Tabela 10. Vasos sanguíneos testiculares (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	31.3 \pm 7.6	20.5 \pm 9.1	24.0 \pm 15.5	0.3400
60	46.5 \pm 21.8a	21.4 \pm 6.9b	27.2 \pm 9.1ab	0.0400

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

De acordo com tabela 10 e figura 10, observou-se ao 30º dia do ensaio experimental tendência à redução no volume de vasos sanguíneos testiculares (μL) nos grupos G2 e G3 em relação ao grupo G1. Porém, somente aos 60 dias pós-choque, a redução foi significativa para o volume de vasos sanguíneos testiculares dos animais dos grupos G2 e G3, que receberam chá de noz-pecã como suplemento à dieta tanto anterior como posterior ao choque térmico testicular ($p < 0,05$).

A redução deste parâmetro pode ser explicada pelo aumento percentual volumétrico dos túbulos seminíferos no parênquima testicular dos animais tratados com o chá. Além disso, pode-se observar que os animais não tratados e avaliados aos 60 possuíam aumento do volume vascular, provavelmente em função de um maior espaço intertubular devido à redução do volume de túbulos seminíferos. Este aumento vascular também pode ter sido estimulado por ação de ERO e substâncias proinflamatórias.

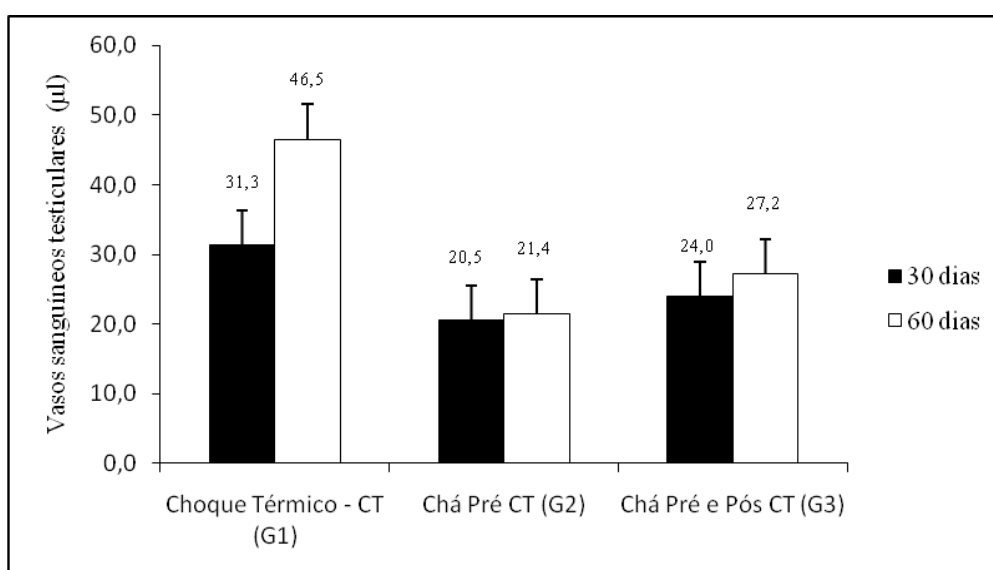


Figura 10. Vasos sanguíneos testiculares (μL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.

De acordo com Abbas et al. (2005) o aumento de vasos sanguíneos em processos degenerativos testiculares decorrentes da aplicação de calor pode estar relacionado com processos inflamatórios, congestão e edema, assim como danos oxidativos decorrentes do aumento de ERO (KIM et al., 2010).

O choque térmico vascular causa elevação de ERO, assim como altera a sensibilidade do músculo liso vascular, aumentando sua resposta ao agonista angiotensina II. Segundo Won et al. (2009) as espécies reativas de oxigênio induzidas por HSP27 exercem papel estimulador da proliferação da túnica íntimas dos vasos. Isto poderia em parte explicar o papel dos componentes antioxidantes encontrados no chá da casca de Noz-Pecã em relação à redução do volume vascular testicular dos animais tratados.

Tabela 11. Espaço linfático (μL) do parênquima testicular de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	317.1 \pm 87.2	177.7 \pm 125.4	245.8 \pm 119.1	0.1857
60	194.8 \pm 103.6	104.0 \pm 33.2	119.1 \pm 22.2	0.0950

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

De acordo com resultados apresentados na tabela 11 e figura 11 foi observada no 30º dia do ensaio experimental tendência à redução no espaço linfático do parênquima testicular (μl) nos grupos G2 e G3 em relação ao grupo G1. Além disso, aos 60 dias pós-choque, observou-se nos animais que receberam chá de noz-pecã como suplemento à dieta tanto anterior como posterior à injúria térmica houve redução deste parâmetro em 47 e 39%, respectivamente.

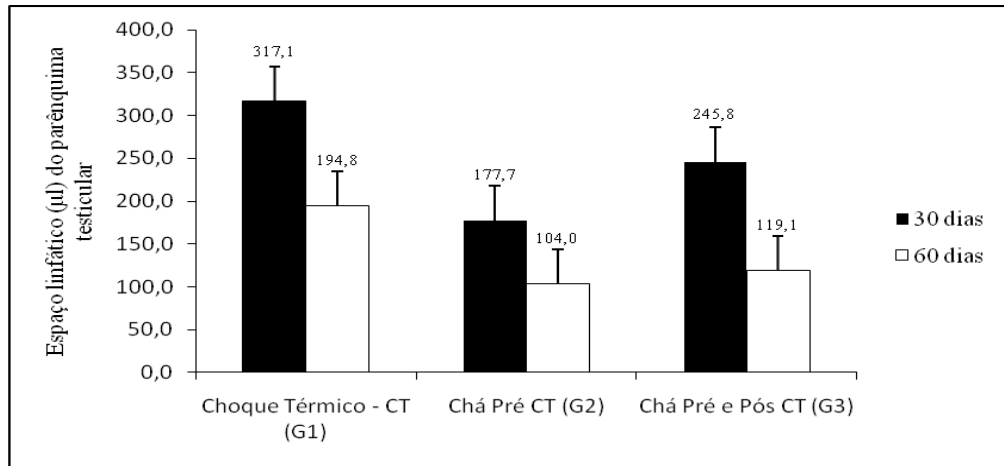


Figura 11. Espaço linfático (µL) do parênquima testicular de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.

Tabela 12. Volume líquido do testículo (µL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média ± desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	744.3 ± 108.3	1036.2 ± 401.0	1226.2 ± 440.4	0.1319
60	852.9 ± 76.8	995.2 ± 317.1	1226.9 ± 295.5	0.1034

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular.

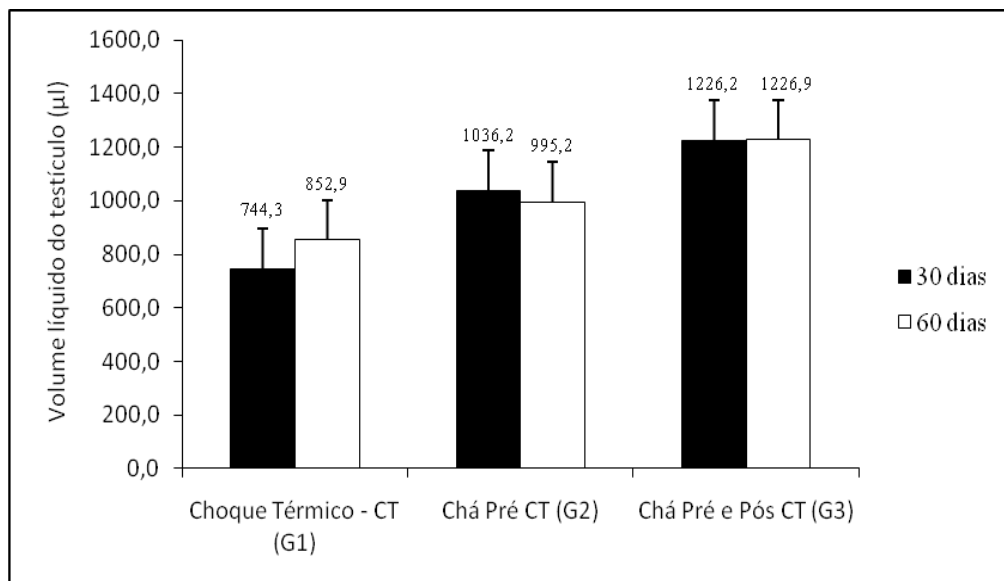


Figura 12. Volume líquido do testículo (µL) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico.

De acordo com os dados apresentados na tabela 12 e figura 12, referentes ao volume líquido do testículo ou peso líquido do testículo (μl) de ratos Wistar submetidos à injúria térmica testicular induzida pelo calor, e tratados ou não com chá de noz-pecã, constatou-se que não houve diferença significativa em relação aos grupos experimentais. Entretanto, aos 30 dias, constatou-se tendência de aumento deste parâmetro em 28% e 39% nos grupos G2 e G3 respectivamente em relação ao grupo G1. De forma análoga, aos 60 dias pós-choque térmico testicular, os animais dos grupos G2 e G3 apresentaram tendência de recuperação em 14 % e 30 % respectivamente, em relação ao grupo G1.

Tabela 13. Comprimento Total de Túbulo Seminífero (m) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
30	5.52 \pm 1.32a	11.49 \pm 4.70ab	15.36 \pm 6.74b	0.0222
60	3.00 \pm 1.01a	11.89 \pm 2.35ab	20.00 \pm 11.34b	0.0061

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular. Letras distintas na mesma linha indicam $p < 0,05$.

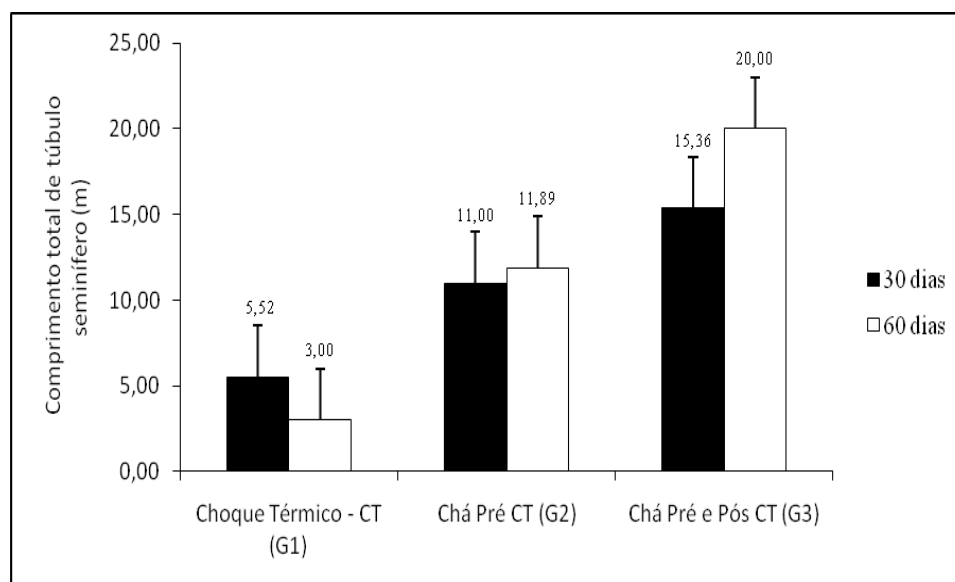


Figura 13. Comprimento Total de Túbulo Seminífero (m) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Na tabela 13 e figura 13 referente ao comprimento total de túbulo seminífero (m) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, constatou-se que em todos os tempos

experimentais houve um aumento significativo no comprimento total de túbulo seminífero por testículo nos grupos submetidos ao choque térmico testicular e tratados com o chá de noz-pecã, grupos G2 e G3, em relação ao grupo submetido à injúria térmica testicular, porém não tratados com chá, grupo G1, ($p < 0,05$).

Este resultado nos mostra a relação direta que existe entre o volume de epitélio germinativo, volume líquido do testículo e o comprimento total de túbulos seminíferos. Estes parâmetros também possuem relação com o peso testicular, o qual por sua vez tem relação direta com a população de células de Sertoli e a produção espermática diária (SILVA JUNIOR et al., 2006).

Camundongos expostos a ambientes não aclimatados com temperatura em torno de 35°C tiveram queda de peso testicular no período de 4 dias (MEISTRICH et al., 1973) e ratos aclimatados durante 3 meses em ambiente a 35°C tiveram cerca de 20% dos túbulos seminíferos severamente afetados, muito embora os túbulos restantes parecessem normais (SOD-MORIAH et al., 1974). Da mesma forma, exposição de carneiros a ambientes quentes durante 14 dias causou redução do peso testicular em cerca de 70% (GOMES et al., 1971). Os efeitos do calor sobre o testículo são bastante patentes quanto as suas conseqüências, contudo neste experimento o uso do chá da casca de noz-pecã parece ter minimizado estes efeitos nos animais tratados.

Tabela 14. Dosagem de testosterona plasmática (ng/ml) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico (Média \pm desvio padrão).

Grupos Experimentais				
Dias pós Choque Térmico	Choque Térmico (G1) (n=5)	Chá Pré + Choque Térmico (G2) (n=5)	Chá Pré e Pós + Choque Térmico (G3) (n=5)	P
15	0.38 \pm 0.18	0.78 \pm 0.38	1.06 \pm 0.54	0.0541
30	0.76 \pm 0.31	0.59 \pm 0.35	0.63 \pm 0.17	0.6269
60	2.21 \pm 1.01	0.55 \pm 0.18	1.14 \pm 0.84	0.2437

n = Número de animais após tempo de exposição. Os animais do grupo G2 e G3 foram pré-tratados por 30 dias com chá de noz-pecã antes do choque térmico testicular.

De acordo com os dados apresentados na tabela 14 figura 14, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de testosterona plasmática (ng/ml) de ratos Wistar submetido à injúria térmica pelo calor, tratados ou não com chá de noz-pecã nos diferentes tempos experimentais. No entanto, foi observado, no 15º dia pós-choque térmico, que os animais dos grupos tratados com chá de noz-pecã, G2 e G3

apresentaram tendência ao aumento da concentração plasmática de testosterona em torno de 51 e 76% respectivamente, em relação ao grupo submetido ao choque térmico testicular e não tratado com chá de noz-pecã, grupo G1. Todavia, nos demais tempos, os níveis de testosterona plasmática dos grupos G2 e G3 apresentaram-se inferiores ao grupo G1.

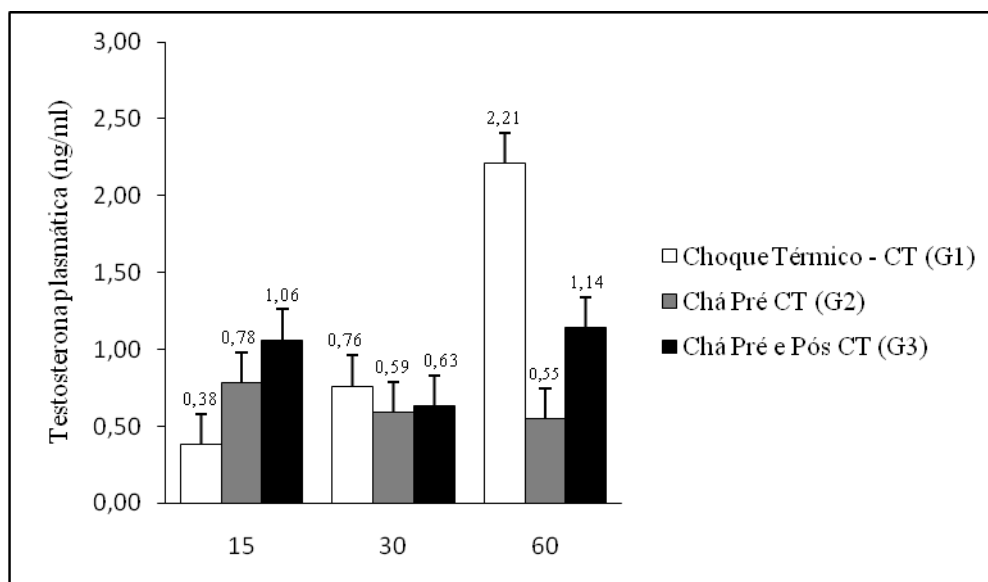


Figura 14. Dosagem de testosterona plasmática (ng/ml) de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de noz-pecã, e avaliados com 15, 30 e 60 dias pós-choque térmico.

Segundo Gabaldi (2000) e Setchell (1998), a exposição do animal a elevadas temperaturas por um período maior de tempo, causa redução nas concentrações plasmáticas de testosterona, ocorrendo um aumento deste hormônio após um período curto de adaptação.

Camundongos submetidos a choque térmico apresentam expressão de HSP70 nas células de Leydig (CAO et al., 2009). Além disso, a expressão desta proteína é indutora dos fenômenos de apoptose em testículos submetidos ao choque térmico (WIDLAK et al., 2007)

Em células de Leydig tumorais de camundongo da linhagem MA-10, o choque térmico reduziu a síntese de progesterona, a quantidade de RNAm para proteína regulatória aguda da esteroidogênese (Star), na atividade da proteína regulatória aguda da esteroidogênese. Estas observações fornecem evidências para uma sub-regulação na expressão da Star (Proteínas Regulatória Aguda da Esteroidogênese) ocasionada pelo choque térmico e conseqüentemente redução na produção de testosterona (MURPHY et al., 2001).

Hipertermia escrotal realizada em ratos durante 6 dias consecutivos a temperatura de 43°C por 30 minutos causou danos morfológicos e comprometeu a esteroidogênese nas células de Leydig (KANTER e AKTAS, 2009).

No presente experimento não se observou redução nos níveis de testosterona, mas a tendência de redução pode estar diretamente relacionada ação do choque térmico sobre as células de Leydig tendo o chá de noz-pecã um provável efeito redutor da ação térmica sobre as células de Leydig devido à recuperação dos níveis séricos de testosterona observada no 15º dia pós-choque térmico nos animais tratados. A provável explicação estaria relacionada à inibição da peroxidação lipídica por parte do chá da casca de noz-pecã graças a sua riqueza em polifenóis, flavonóides poliméricos, taninos condensados, proantocianinas e γ -tocoferol (HADDAD et al., 2006).

6. 1 Achados histopatológicos de testículo de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de Noz-Pecã e avaliados com 30 dias após a injúria térmica

Após 30 dias do choque térmico testicular observou-se nos animais submetidos à injúria e não tratado com chá de Noz-Pecã, o epitélio seminífero degenerado e a presença de aglomerados de células germinativas e restos celulares no lúmen tubular (Figura 15A e B). É importante salientar que foi observado nestes animais um espessamento da túnica própria dos túbulos seminíferos (Figura 15A e B).

Nos animais submetidos à injúria térmica no testículo, porém que foram pré-tratado com chá de Noz-Pecã e avaliados 30 dias após o choque térmico testicular foi possível constatar presença de túbulos seminíferos com baixa celularidade do epitélio germinativo possuindo apenas células germinativas basais e células de Sertoli (15C e D). Contudo, foi constatada presença de túbulos seminíferos com células germinativas do estágio pré-meiótico e pós-meiótico da espermatogênese, e espermátides em alongamento descamadas. Estes achados demonstram que o chá de Noz-Pecã administrado previamente a injúria térmica, proporcionou uma melhor qualidade na recuperação do processo espermatogênico. No interstício constatou-se a grande quantidade de células de Leydig entre os túbulos seminíferos. Esta celularidade pode estar relacionada à diminuição volumétrica dos túbulos devido número não homogêneo de células germinativas nos túbulos seminíferos.

No parênquima testicular de ratos tratado com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes e depois da submissão a injúria térmica foi possível notar a presença de células de Leydig, espaço linfático e vasos sanguíneos delimitados por túbulos seminíferos em diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero (Figura 15E e F). Este arranjo do parênquima testicular observado no grupo G3 aos 30 dias demonstrou a influência do chá de Noz-Pecã na recuperação testicular. Contudo, ainda é possível observar túbulo seminífero no estágio VIII

do ciclo do epitélio germinativo contendo corpos residuais, caudas de espermatozoides no lume tubular, a presença de células germinativas vacuolizadas próximas a borda luminal. Esta vacuolização celular apesar de pouco frequente no grupo G3 neste período é um achado indicativo de degeneração celular hidrópica.

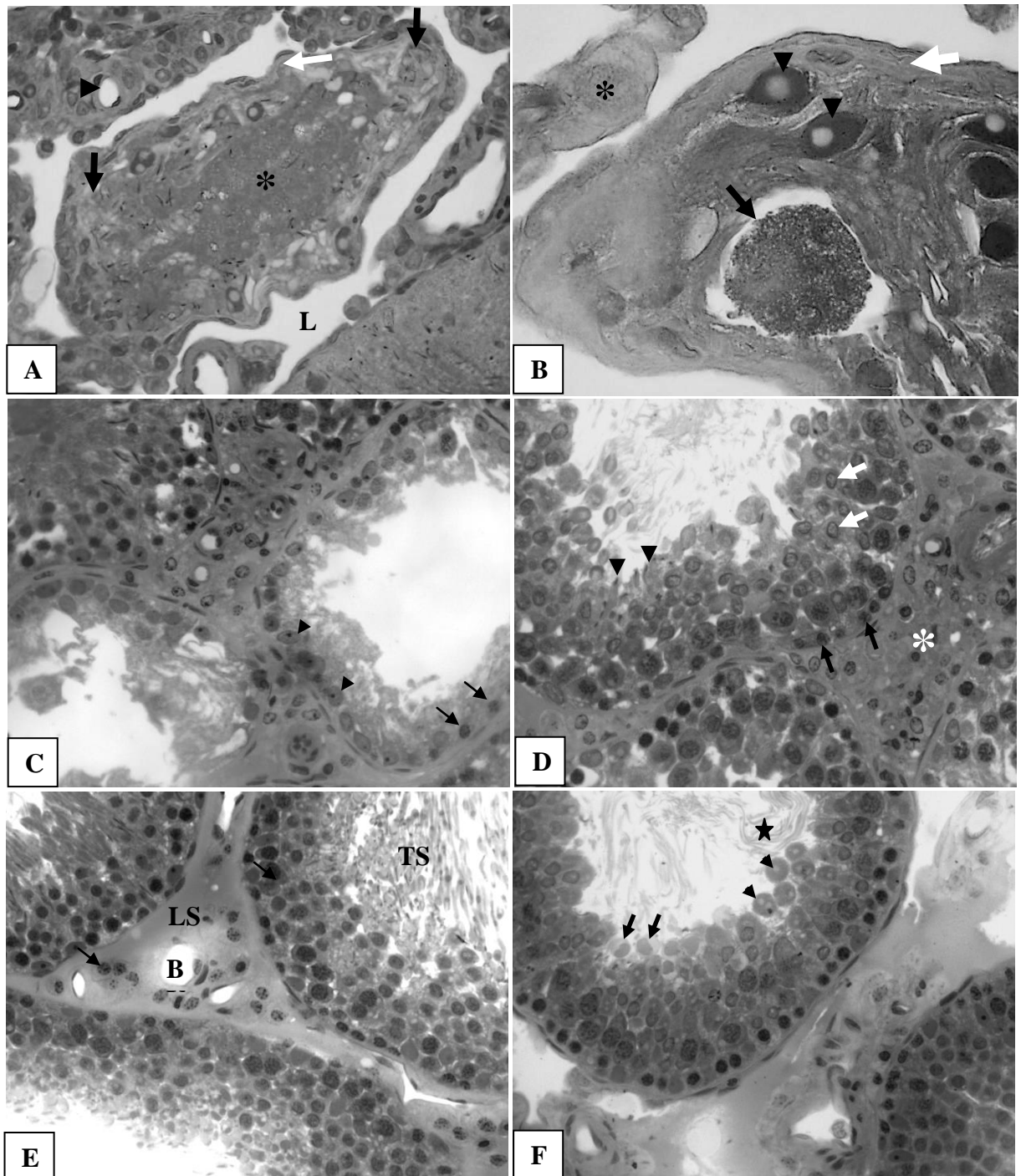


Figura 15 - Parênquima testicular de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de Noz-Pecã e avaliados aos 30 dias após a injúria térmica.

Figura 15A - Nesta fotomicrografia de animal submetido à injúria e não tratado com chá de Noz-Pecã pode-se observar o epitélio seminífero degenerado (seta), túnica própria espessada

(seta branca) e a presença de aglomerados de células germinativas e restos celulares no lúmen tubular (*). Notar vários vasos sanguíneos (cabeça de seta) e o espaço linfático (LE).

Figura 15B - Na fotomicrografia em tela foi possível observar vacuolizações nos núcleos das células de Sertoli (cabeça de seta), célula de Leydig (*), túnica própria espessada (seta branca) e a presença de células multinucleadas gigantes (seta).

Figura 15C - Observar no parênquima testicular de ratos tratados com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes da submissão a injúria térmica, a presença de túbulos seminíferos com baixa celularidade do epitélio germinativo possuindo apenas células germinativas basais (seta) e células de Sertoli (cabeça de seta).

Figura 15D - Detalhe de túbulo seminífero de ratos tratado com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes da submissão a injúria térmica. Notar a presença de células germinativas do estágio pré-meiótico (seta preta) e pós-meiótico da espermatogênese (seta branca) e descamação espermátides em alongamento (cabeça de seta). No intertúbulo notar a grande quantidade de células de Leydig (asterisco).

Figura 15E- Detalhe do intertúbulo do parênquima testicular de ratos tratado com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes e depois da submissão a injúria térmica. Notar a presença de células de Leydig (seta), espaço linfático (LS) e vasos sanguíneos (BV) delimitados por túbulos seminíferos em diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero (TS).

Figura 15F - Detalhe de túbulo seminífero de ratos tratados com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes e depois da submissão a injúria térmica. Observar túbulo seminífero no estágio VIII do ciclo do epitélio germinativo contendo corpos residuais (seta) e caudas de espermatozóides (estrela) no lume tubular. Notar a presença de células germinativas vacuolizadas próximas a borda luminal (cabeça de seta).

6. 2 Achados histopatológicos de testículo de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de Noz-Pecã e avaliados com 60 dias após a injúria térmica.

Nos achados histopatológicos dos ratos submetidos à injúria térmica e não tratados com chá de Noz-Pecã, pode-se observar o epitélio seminífero com a presença das diversas fases de maturação das células germinativas (Fig. 16A). Contudo é relevante chamar a atenção para o discreto espessamento da túnica própria em grande parte dos túbulos seminíferos. É importante salientar que o processo espermatogênico sob o aspecto qualitativo, não se apresentava totalmente reestruturado neste grupo. Mesmo em túbulos reestruturados foi possível notar os núcleos das células de Sertoli e das células germinativas vacuolizadas (Fig. 16B).

Na avaliação estrutural do parênquima testicular de ratos tratados com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes da submissão à injúria térmica e analisada aos 60 dias constatou-se presença de túbulos seminíferos em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero (Fig. 16C e D). O intertúbulo continha células de Leydig, espaço linfático e vasos sanguíneos

dentro dos padrões de normalidade. Apesar da melhora qualitativa do processo espermatogênico nos animais tratados apenas por 30 dias antes da injúria térmica testicular, ainda se constatou a presença de túbulos seminíferos desprovidos de células germinativas.

Nos animais do grupo G3, os quais receberam chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes da submissão à injúria térmica e durante 60 dias após, possuíam o parênquima testicular bem estruturado, com todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero. Em detalhe na figura 16E e F observou-se a presença de túbulos seminíferos no estágio VII, entre os estágios VII-VIII e VI-VII do ciclo do epitélio seminífero. O intertúbulo continha células de Leydig, espaço linfático e vasos sanguíneos dentro dos padrões de normalidade. De acordo com os achados, o chá da casca de Noz-Pecã acelerou o processo de regeneração testicular após injúria térmica, principalmente nos animais que receberam o chá antes e depois do choque térmico.

A degeneração testicular pode ser definida como um processo que causa a deterioração da estrutura do testículo, tendo como consequência perda da função testicular. Esta pode possuir diversos fatores etiológicos, tais como o calor, trauma testicular, exposição ao frio, toxinas, isquemia, deficiências nutricionais, administração exógena de andrógenos, infecções, doenças autoimunes, obstruções do fluxo espermático, neoplasias e radiação (TURNER, 2004).

Dentre as células do epitélio germinativo, os espermátócitos I em paquíteno parecem ser as mais sensíveis ao calor, devido ao aumento significativo do processo de apoptose nestas células (LUE et al., 1999). A qualidade dos embriões está diretamente ligada a qualidade do espermatozóide com isso, células germinativas expostas ao estresse térmico podem desenvolver um mecanismo protetor como também sofrer eliminação ativa através da via indutora da apoptose (JANNES et al., 1998).

O choque térmico ativa em células somáticas um grupo de genes que codificam proteínas de choque térmico as quais funcionam com chaperonas moleculares. O mecanismo básico pelo qual estes genes são ativados decorre da interação de um fator de transcrição específico HSF1 com uma seqüência regulatória denominada de elemento de choque térmico (HSE). Em eucariotas superiores HSF1 está presente em células não-estressadas pelo calor como um monômero ativo, que responde ao estresse celular com a agregação trimérica para formação de um fator de transcrição para proteínas HSP70 as quais ou corrigem defeitos de proteínas danificadas ou induzem apoptose (WIDLAK et al., 2007).

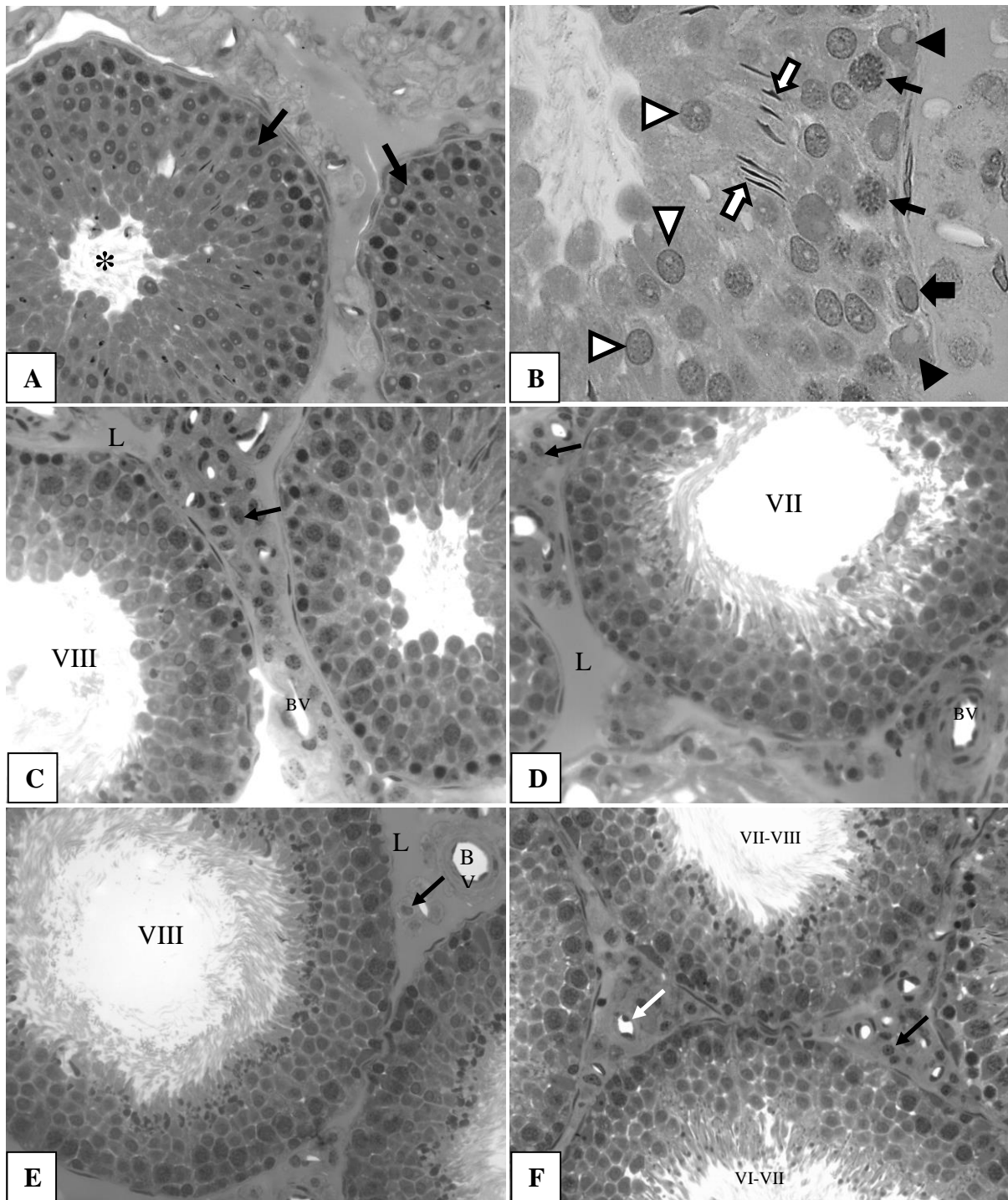


Figura 16 - Parênquima testicular de ratos Wistar submetidos ao choque térmico testicular, tratados ou não com chá de Noz-Pecã e avaliados aos 60 dias após a injúria térmica.

Figura 16A - Nesta fotomicrografia de animal submetido à injúria térmica e não tratado com chá de Noz-Pecã, pode-se observar o epitélio seminífero com a presença das diversas fases de maturação das células germinativas (seta) e o lúmen tubular (*).

Figura 16B - Na fotomicrografia em tela é possível notar os núcleos das células de Sertoli ainda vacuolizados (cabeça de seta cheia) e diferentes fases de maturação das células germinativas: espermatogônia (seta larga cheia), espermatócito primário em paquíteno (seta), espermátide arredondada (cabeça de seta vazia) e espermátide alongada (seta larga vazia).

Figura 16C - Parênquima testicular de ratos tratados com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes da submissão a injúria térmica, e analisados aos 60 dias. Notar a presença de túbulos

seminíferos no estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero (VIII). No intertúbulo notar a presença de células de Leydig (seta), espaço linfático (LS) e vasos sanguíneos (BV).

Figura 16D - Parênquima testicular de ratos tratados com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes da submissão a injúria térmica analisados aos 60 dias. Em detalhe, observar a presença de túbulo seminífero no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (VIII). No intertúbulo notar a presença de células de Leydig (seta), espaço linfático (LS) e vasos sanguíneos (BV).

Figura 16E - Parênquima testicular de ratos tratados com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes da submissão a injúria térmica e durante 60 dias após. Em detalhe observar a presença de túbulo seminífero no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (VII). No intertúbulo notar a presença de células de Leydig (seta), espaço linfático (LS) e vasos sanguíneos (BV).

Figura 16F - Parênquima testicular de ratos tratados com chá de Noz-Pecã durante 30 dias antes da submissão a injúria térmica e durante 60 dias após. Em detalhe observar a presença de túbulos seminíferos nos estágios VII-VIII e VI-VII do ciclo do epitélio seminífero. No intertúbulo notar a presença de células de Leydig (seta) e vasos sanguíneos (seta branca).

No presente experimento, alguns achados histopatológicos foram bastante evidentes aos 30 dias pós-choque térmico tais como: presença de células gigantes sinciciais oriundas de espermatídes arredondadas, espermatócitos I em pré-leptóteno/leptóteno com picnose nuclear, espermatócitos I em paquíteno em apoptose, descamação do epitélio germinativo, espessamento de membrana basal, vacuolização de células de Sertoli, túbulos seminíferos apenas espermatogônias e células de Sertoli. Entretanto, neste período se observou que nos animais tratados com chá da casca de noz-pecã as lesões foram em menor proporção e alguns estágios do ciclo do epitélio seminíferos estiveram presentes.

No período de 60 dias após o choque térmico, podemos constatar que os animais não tratados possuíam túbulos seminíferos com células descamadas no lume dos túbulos seminíferos, afrouxamento do epitélio germinativo e vacúolos nas células de Sertoli, apesar de ter sido observada recuperação parcial do processo espermatogênico. Por outro lado, os animais tratados com chá da casca de noz-pecã o processo espermatogênico possuía todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero e nenhuma alteração compatível com degeneração testicular foi observada neste período de avaliação nos animais tratados com o chá antes e depois da injúria térmica até o momento da avaliação do parênquima testicular.

As lesões testiculares observadas neste experimento para os 30 primeiros dias pós-choque térmico nos animais não tratados estão de acordo com as observada por Rockett et al. (2001) em camundongos adultos. Nestes, o choque térmico testicular desencadeou a formação de vacúolos intratubulares, presença de células gigantes sinciciais de espermatócitos I, células germinativas núcleos picnóticos e alguns núcleos apareceram com fragmentos apoptóticos.

No presente trabalho, a utilização do chá da casca de noz-pecã parece ter exercido efeito inibidor sobre os fatores iniciais que agravam degeneração testicular reduzindo a

gravidade das lesões pelo estresse térmico. Os radicais livres gerados no choque térmico, além do TNF- α , podem funcionar como sinal de morte celular ou causar danos oxidativos direto as células e mesmo que as exposições ao calor sejam curtas, estas desencadeiam severos danos as células espermatogênicas. As propriedades antioxidantes do chá da casca de noz-pecã foram comprovadas em outro modelo experimental. Neste, os componentes antioxidantes do chá foram capazes de minimizar as lesões decorrentes do estresse oxidativo provocadas pela quimioterapia com ciclofosfamida (BENVEGNÚ et al., 2010).

6. 3 Resultados enzimáticos das amostras de homogeneizado testicular

A reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico é um dos marcadores de estresse oxidativo mais utilizados (LUI et al., 1997). Foi reportado ao malondialdeído características como efeito citotóxico, carcinogênico e mutagênico (FERRARI, 1998).

O ensaio de TBARS é um método indireto, mas bem representativo para demonstrar a peroxidação lipídica. A intensidade da peroxidação lipídica pode ser avaliada de acordo com os níveis dos produtos primários, ou ainda com os produtos finais da peroxidação, como por exemplo, o malondialdeído (MDA) que é ensaiado com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e expresso em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Assim, quanto maior os níveis de TBARS, maior o dano aos lipídios (HADDAD et al., 2006; RICE-EVANS et al., 1991).

De acordo com Benconi et al. (1991), os níveis de malondialdeído podem ser influenciados pela quantidade de células susceptíveis à peroxidação lipídica.

Em nosso estudo, conforme podemos observar na figura 18A, os animais submetidos ao choque térmico testicular do grupo Heat Shock (HS) apresentaram aumento significativo da peroxidação lipídica testicular em relação ao grupo controle, verificados por meio da determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresso em nmol MDA/g tecido. Por outro lado, os animais dos grupos de 15, 30 e 60 dias que receberam o chá da casca de noz-pecã antes da injúria térmica apresentaram uma diminuição neste parâmetro. De forma semelhante, conforme se pode constatar na figura 18B, os animais de todos os tempos experimentais co-tratados com chá da casca de noz-pecã antes e depois da injúria térmica tiveram seus níveis de malondialdeído (MDA) inferiores ao grupo submetido ao choque térmico testicular que não recebeu o chá em sua dieta.

Uma possível explicação para diminuição da peroxidação lipídica nos animais que receberam o chá de noz-pecã pode ser devido à grande quantidade de substâncias antioxidantes como o γ -tocoferol existentes na casca da noz-pecã (DIETRICH et al., 2005; HADDAD et al., 2006; KAMAL-ELDIN, 2005). Sabe-se também, que a noz-pecã apresenta ainda uma alta concentração de compostos fenólicos, taninos e pró-antocianinas derivada de flavonóides e capazes de inibir a ação de lipoxigenases, responsáveis por alterações oxidativas (MALIK et al., 2009; PRADO et al., 2009; SHAHIDI e NACZK, 2004).

Estudos em animais concluíram ainda que a atividade antioxidante do γ -tocoferol em relação ao seu isômero α -tocoferol é mais eficiente em capturar radicais livres oriundos do

oxigênio, em inibir a lipoperoxidação, além de apresentar ação antiinflamatória (CHRISTEN, 1997; DEVARAJ et al, 2008; HADDAD, 2004; HUDTHAGOSOL et al., 2011; JIANG et al., 2003; PRADO, 2009; PRIOR et al., 2005).

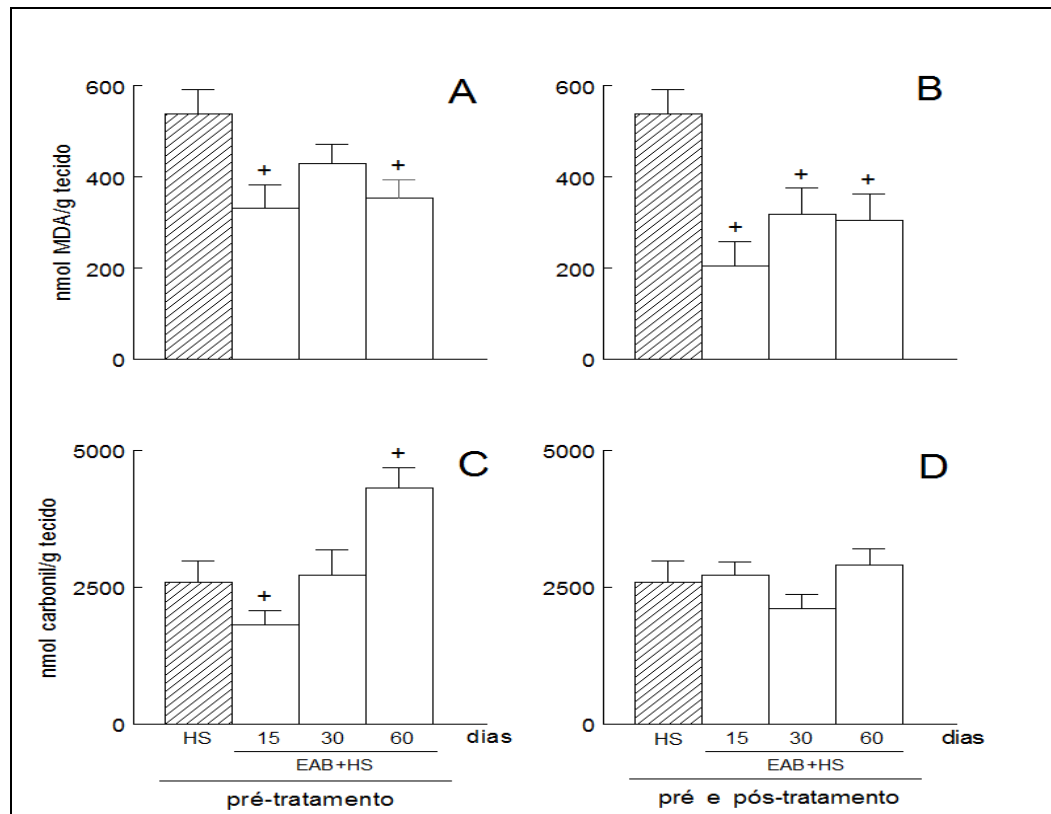


Figura 17. Efeito do chá da casca de noz-pecã (EAB) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (A e B) e proteínas carboniladas (C e D) em testículos de ratos expostos ao choque térmico. + Indica diferença significativa em relação ao grupo HS (Heat Shock/ Choque Térmico).

A detecção de grupos carbonis está sendo muito utilizado como um indicador de dano oxidativo em proteínas. Os níveis de compostos carbonílicos estão aumentados em condições de estresse oxidativo. Estes compostos têm efeitos deletérios sobre o sistema reprodutivo. (URSO e CLARKSON, 2003).

A família (AKR) das enzimas aldocetoreductase catalisa a desintoxicação redutora de diversos compostos carbonílicos de forma NADPH-dependente. E sabido ainda, que o envolvimento de AKR na desintoxicação de carbonilas endogenamente produzidas no sistema reprodutor apresenta diferenças de ação nos tecidos de ratos, em termos de imunorreatividade, no epitélio do epidídimo, canal deferente, vesículas seminais, próstata e testículo (IUCHI et al., 2004).

No testículo de rato as enzimas do grupo carbolina se limitam às células de Leydig, enquanto que em humanos, ela foi detectada em células de Leydig, assim como em células de Sertoli e células germinativas (INAZU et al. 2003).

No tocante aos níveis de proteínas carboniladas mensuradas no homogenato de testículos de ratos expostos à injúria térmica, conforme resultados mostrados na figura 17C e D houve diferença significativa entre os animais submetidos ao choque térmico em relação aos grupos que receberam o chá de noz-pecã aos 15 e 60 dias. Entretanto, verificou-se tendência à redução deste parâmetro em todos os tempos nos animais co-tratados com chá da casca de noz-pecã antes e depois da injúria térmica (Figura 17D).

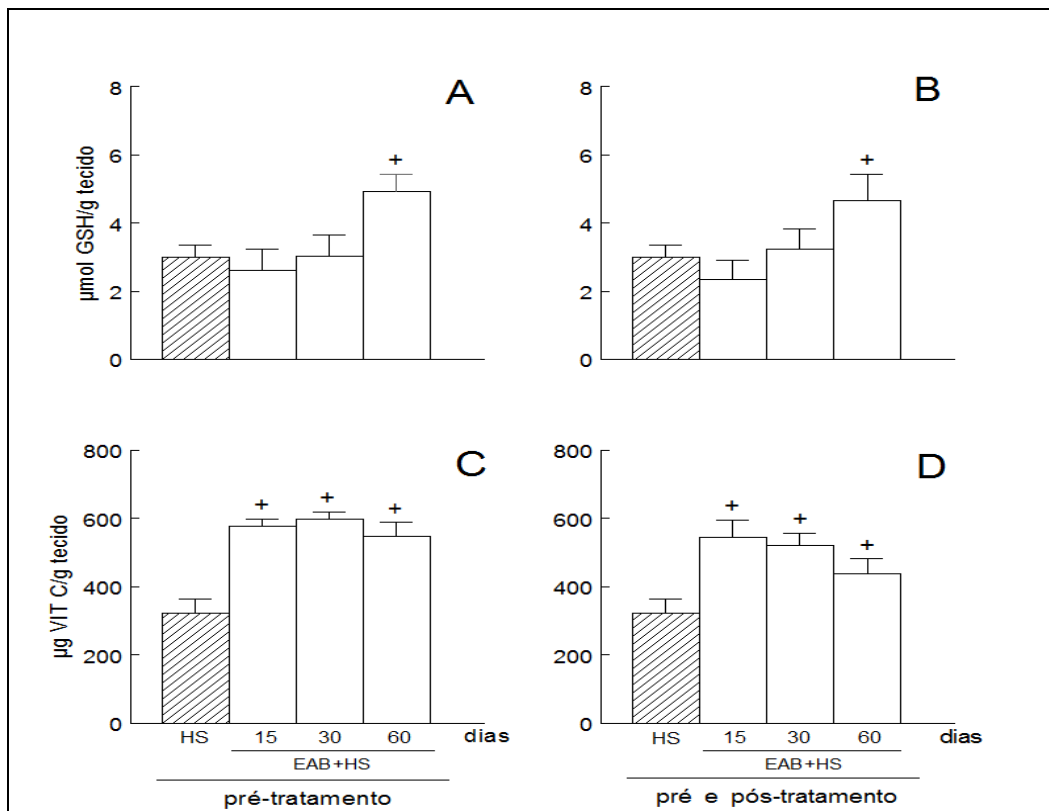


Figura 18. Efeito do Extrato Aquoso Bruto (EAB): chá da casca de noz-pecã sobre os níveis de glutathiona reduzida (A e B) e vitamina C (C e D) em testículos de ratos expostos ao choque térmico. + Indica diferença significativa em relação ao grupo HS (Heat Shock/ Choque Térmico).

A glutathiona (GSH) é considerada um dos agentes antioxidantes mais importantes do sistema de defesa antioxidante celular, protege a célula contra as lesões resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta.

Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento (-SH) presente na cisteína (MATSUBARA e FERREIRA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

No tocante às figuras 18A e B, referente ao extrato aquoso bruto de noz-pecã verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos dos animais submetidos ao choque térmico não tratados com o chá da casca de noz-pecã, e entre os grupos que receberam previamente chá de noz-pecã e co-tratamento pré e pós-choque aos 15 e 30 dias. Entretanto, vale ressaltar os animais submetidos à injúria térmica testicular e que receberam o chá em suas dietas apresentaram tendência significativa à elevação nos níveis testiculares de glutatona reduzida aos 60 dias do ensaio experimental.

Em relação aos níveis de ácido ascórbico (vitamina C) dosados no homogeneizado testicular, apresentados na Figura 18C e D, observou-se diminuição dos níveis de (VIT C) nos animais submetidos ao choque térmico testicular não tratados com chá de noz-pecã. Por outro lado, nos animais submetidos à injúria térmica testicular, o prévio e o co-tratamento antes e depois com o chá da casca de noz-pecã impediram o decréscimo nos níveis de vitamina C em todos os tempos observados. Os níveis de vitamina C aumentaram em todos os tempos experimentais nos animais que receberam o chá da casca de noz-pecã, diferindo significativamente dos grupos apenas submetidos ao choque térmico.

Vale ressaltar que o ácido ascórbico apresenta efeito antioxidante desprezível quando comparado ao efeito antioxidante dos compostos fenólico (KALT et al., 1999). Tendo a casca de noz-pecã uma elevada concentração de compostos fenólicos (HADDAD et al., 2006), dentre estes constituintes, destacam-se o γ -tocoferol (PRADO et al., 2009) e o ácido gálico (BENVEGNÚ, 2010), altamente reconhecidos por sua atividade seqüestradora de radicais livres, é possível inferir que o ácido ascórbico, por atuar na remoção do radical hidroxil tenha contribuído de maneira protetora contra danos oxidativos decorrente da aplicação do calor. Assim, quanto maior os níveis dessas defesas, maior será a proteção celular.

A catalase é uma importante enzima antioxidante, presente principalmente no peroxissoma das células, sendo responsável pela desintoxicação celular, pois previne a geração de radicais livres, e conseqüentemente protege as células contra danos oxidativos, por converter o peróxido de hidrogênio em água, diminuindo os riscos de formação de radicais hidroxilas (NORDBERG e ARNÉR, 2001; VASCONCELOS et al., 2007). Encontrada principalmente na membrana basal do testículo, ela confere proteção completa contra o H_2O_2 (LAMIRANDE, 1992).

O peróxido de hidrogênio é conhecido por causar necrose e apoptose em células (ZHANG et al., 2006). Entretanto, o mecanismo de morte celular relacionada ao estresse

térmico é a apoptose e não necrose, e pode envolver ERO, proteína supressora de tumor (p53), óxido nítrico sintase (NOS), translocação do fator pró-apoptótico Bax do citoplasma para posição perinuclear, a liberação de citocromo C da mitocôndria e diversas caspases (SETCHELL, 2006).

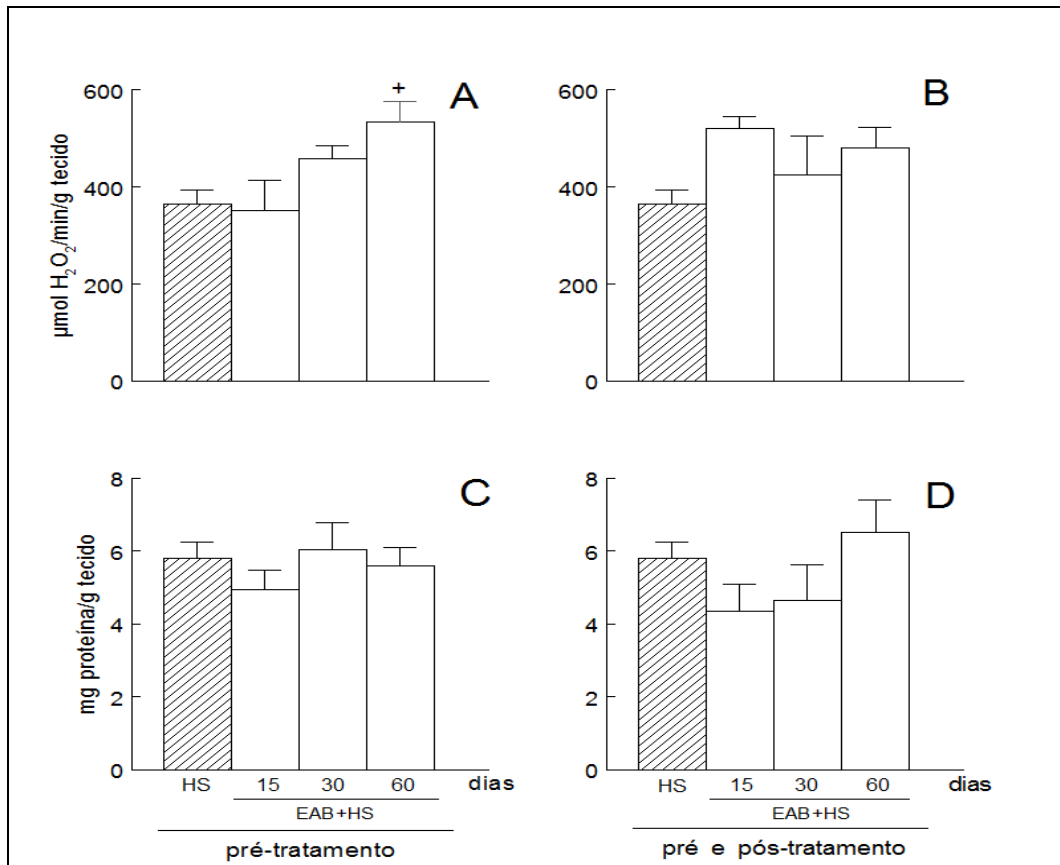


Figura 19. Efeito do Extrato Aquoso Bruto (EAB): chá da casca de noz-pecã sobre os níveis a atividade da catalase (A e B) e os níveis de proteína (C e D) em testículos de ratos submetidos ao choque térmico. + Indica diferença significativa em relação ao grupo HS (heat shock/ Choque Térmico).

Conforme apresentado na figura 19A e B, constatou-se que os animais submetidos à injúria térmica testicular induzida e tratados previamente com o chá de noz-pecã, assim como e os que receberam o co-tratamento do chá nos períodos pré e pós-choque térmico não demonstraram alterações significativas na atividade da catalase 15 e 30 dias em relação ao grupo HS. Entretanto, aos 60 dias pós-choque térmico os níveis de catalase em ambos os tratamentos com o chá da casca de noz-pecã diferiram significativamente.

Benvegnú (2010) ao estudar os efeitos da proteção do extrato aquoso de *Carya illinoensis* sobre a toxicidade induzida por ciclofosfamida no testículo de ratos verificou que o extrato de noz-pecã não influenciou nos níveis de catalase. No entanto, em nosso estudo, pôde-se constatar que aos 60 dias do ensaio experimental houve um aumento na atividade da catalase testicular nos animais que receberam o tratamento prévio com chá (grupo EAB+CT). Já o conteúdo de proteínas totais para esse mesmo grupo, também não mostrou alteração significativa.

No tocante ao conteúdo protéico nos testículos figuras 19C e D, verificou-se um aumento significativo deste parâmetro em todos os tempos experimentais em relação ao grupo HS. Entretanto, salienta-se que nos animais co-tratados com o chá da casca de noz-pecã houve tendência de diminuição dos níveis de conteúdo protéico dos 15 aos 60 dias.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com chá da casca de noz-pecã, tanto administrado previamente aos animais como depois da injúria térmica testicular exerceu efeitos preventivos e restauradores sobre espermatogênese de ratos Wistar.

De acordo com os achados histopatológicos, constatou-se que a administração de chá de noz-pecã antes e depois da injúria térmica testicular proporcionou uma melhor qualidade na recuperação do processo espermatogênico aos 30 e 60 dias.

O choque térmico foi capaz de aumentar os níveis de lipoperoxidação lipídica, determinado pelo método TBARS no homogenato de testículo. O tratamento prévio e o co-tratamento antes de depois com o chá da casca de noz-pecã preveniu este efeito aos 60 dias.

Os níveis de GSH encontraram-se diminuídos nos animais submetidos ao choque térmico testicular. O tratamento prévio e o co-tratamento antes de depois com o chá da casca de noz-pecã preveniu este efeito aos 60 dias.

O choque térmico testicular reduziu os níveis de vitamina C, ao passo que o tratamento com o chá de noz-pecã preveniu este efeito em todos os animais.

Não houve diferença significativa no conteúdo protéico e níveis do grupo carbonil no homogenato dos testículos entre os grupos experimentais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Patologia, Bases Patológicas das Doenças**. 7a Edição - 2a Tiragem: Editora Elsevier Ltda, 2005. 1616 p.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Met Enzymol.**, v. 105, p. 121-26, 1984.
- ANDRADE JÚNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras. Pneumol.** v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005
- BARTH, A. D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Rev. Bras. Repr. Anim.**, v. 1, n. 4, p. 1-11, 1993.
- BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol**, v. 102, p. 32-36, 2005.
- BEATTIE, D. A. Bioenergética e metabolismo oxidativo. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2003, p. 476 – 527.
- BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SHAND, L. M. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.
- BENVEGNÚ, D. M. **Ação protetora da *Carya illinoensis* sobre a toxicidade induzida por ciclofosfamida em ratos**. 2010, 106p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), UFSM – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2010. 106p.
- BENVEGNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, C. S.; MULLER, L. G.; MARTINS, N. M. B.; VERELI, C.; BURGER, M. E. Protective effects of a by-product of the pecan nut industry (*Carya illinoensis*) in the rats *Carya illinoensis* protects against cyclophosphamide-induced toxicity. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 29, n. 3, p. 185-197, 2010.
- BERNDTSON, W. E.; IGBOELI, G.; PARKER, W. G. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biol. Reprod**, v.37, p. 60-74, 1987.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BILLING, H.; FURRUTA, I.; RIVIER, T. C.; TAPANAINEN, J.; PARVINEN, M.; HSUEH, A. J. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stage. **Endocrinology**, 136: p. 5-12, 1995.

BIRCH, A.E.; FENNER, G. P.; WATKINS, R.; BOYD, L. C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4502 - 4507, 2001.

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

BOYNE, A. F.; ELLMAN, G. L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components, **Anal Biochem**, v. 46, n. 2, p. 639-653, 1972.

BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4841 - 4844, 2001.

BRENNEISEN, P.; STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 26, n 45, p. 256-267, 2005.

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

BRUENGER, A.; MARIOTI, A.; ROHR, H. P.; ROHR, H. P./ STAHEL, W.; WIDERKERHR, P.; BARTSCH, G.; CARMICHAEL, S. W.; MAWHINNEY, M. G. Androgen and estrogen effect on guinea pig seminal vesicle muscle: a combined stereological and biochemical study. **Prostate**, v. 9, p. 303-310, 1986.

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

CAO, W.; HUANG, P.; ZHANG, L; WU, H. Z.; ZHANG, J.; SHI, F. X. Acute heat stress increases HSP70 expression in the testis, epididymis and vas deferens of adult male mice. **Zhonghua Nan Ke Xue**. V. 15, n. 3, p. 200-206, 2009.

- CHIHUAILAF, R. H.; CONTRERAS, P. A.; WITTWER, F. G. Patogenesis del estrés oxidativo: conseqüências y evaluación en salud animal. **Veterinaria México**, v. 33, n. 3, p. 265-283, 2002.
- CHRISTEN, S.; WOODALL, A. A.; SHIGENAGA, M. K.; SOUTHWELL-KEELY, P. T.; DUNCAN, M. W.; AMES, B. N. Gamma-tocopherol traps mutagenic electrophilic species such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, N. 94, p. 3217 – 32-22, 1997.
- COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**. v. 4, n. 12, p. 53-72, 2003.
- COULTER, G. H.; FOOTE, R. H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. **Theriogenology**, v. 11, p. 297-310, 1979.
- CREASY, D. M. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the society of toxicology pathology. **Brith Defects Research**, v. 68, p. 408-415, 2003.
- DEVARAJ, S.; LEONARD, S.; TRABER, M. G.; JIALAL, I. Gamma-tocopherol supplementation alone and with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. **Free Radic Biol Med**, n. 44, p. 1203-1208, 2008.
- DIETRICH, M.; TRABER, M. G.; JACQUES, P. F, CROSS, C. E.; HU, Y.; BLOCK, G. Does gamma-tocopherol play a role in primary prevention of heart disease and cancer? A review. **J Am Coll Nutr**. n. 26, p. 292-299, 2005.
- DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 505-512, 2006.
- EWING, L. L.; KEENEY, D. S. Leydig cell: Structure and Function. In: DESJARDINS, C.; EWING, L. L. (eds) **Cell and Molecular Biology of the Testis**. New York. Oxford University Press. Cap. 7, p. 137-165, 1993.
- FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Ver Nutr Campinas**, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1998.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceito, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLORENTINO, C. M.; REIS, J. C.; GUERRA, M. M. P. et al. Efeito do tempo de insulação escrotal sobre a estrutura do parênquima testicular de caprinos (*Capra hircus*, L) sem raça definida. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 6, n. 1, p. 29-38, 2003.

FONSECA, V. O.; CHOW, L. A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 47, n. 5, p. 707-16, 1995.

FOSTER, R. A. Pathology of scrotal contents and accessory sex glands of domesticated animals. **Proceeding of the Reproductive Symposium American College of Theriogenology and Society Theriogenology Hating NE, USA**, p.37-49, 1997.

FRANÇA, L. R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. 1991, 180 p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 199. 180 p.

FRANÇA, L. R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L.; RUSSEL, L. D. Germ cell genotype control cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of reproduction**. v. 59, p. 1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R.; RUSSEL, L.D. The testis of domestic animals. In: **Male reproduction: a multidiciplinary overview**. Ed. Madrid: Churchill Communications Europe España, cap. 16, p. 197-219, 1998.

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**. n. 63, p. 300-318, 2005.

GABALDI, S.H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciê. Agr. Saúde**. FEA, Andradina, v. 2, n.2, p. 66-70, 2002.

GABALDI, S. H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal**. Botucatu, 2000, 85p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), FMVZ - Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2000. 85p.

GALLEY, H.; DAVIES, M. J.; WEBSTER, N. R. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 20, p. 139-143, 1996.

GOMES, W. R.; BUTTER, W. R.; JOHNSON, A. D. Effects of elevated ambient temperature on testis and blood levels and in vitro biosynthesis of testosterone in the ram. **Journal of Animal Science**, v. 33, p. 804-807, 1971.

GORDON, M. H. Measuring antioxidant activity. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. H. **Antioxidants in food: Practical applications**. Published by Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH, England, CRC Press, 2001.

GUIMARÃES, J. A. **Uso do selênio e vitamina E na proteção contra os danos sistêmicos em caprinos induzidos à insulação escrotal**. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

HADDAD, E.; JAMBAZIAN, P.; KARUNIA, M.; TANZMAN, J.; SABATÉ, J. A pecan-enriched diet increases γ -tocopherol/cholesterol and decreases thiobarbituric acid reactive in plasma of adults. **Nutrition Research**, v. 26, p. 397-402, 2006.

HANACOCK, B.G. **Development of Pecã Industry**. In: Texas Pecã Handbook. Texas Agricultura, 1997.

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

HUDTHAGOSOL, C.; HADDAD, E. H.; McCARTHY, K.; PIWEN, W.; ODA, K. Pecans acutely increase plasma postprandial antioxidant capacity and catechins and decrease LDL oxidation in humans. **The Journal of Nutrition**, n. 51, p. 56-62, 2011.

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

ISHII T.; MATSUKI, S.; IUCHI, Y.; OKADA, F.; TOYOSAKI, S.; TOMITA, Y.; IKEDA Y, FUJII, J. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. **Free Radic Res.** v. 39, n.7, p. 697-705, 2005.

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

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

IUCHI, Y.; KANEKO.; MATSUKI, S.; ISHII T, IKEDA, Y.; UCHIDA, K. FUJII Carbonyl stress and detoxification ability in the male genital tract and testis of rats. **Histochem Cell**, v. 121, n. 2, p.123-30, 2004.

INAZU. NORIHISA.; RUEPPA, A. B.; HANSPETER, W.; WERMUTH, BENDICHT. Carbonyl reductase from human testis: purification and comparison with carbonyl reductase from human brain and rat testis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** v. 1116, n. 1, p. 50-56, 2003.

JACQUES-SILVA, M. C.; NOGUEIRA, C. W.; BROCH, L. C.; FLORES, E. M. M.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenides and ascorbic acid changes exposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 119, 2001.

JIANG, Q.; AMES, B. N.; Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. **FASEB J.**, n. 17, p. 816–822.

JOHNSON, R.; GOYETTE, G.; RAVINDRANATH, Y.; HO, Y. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 1407-1417, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 222 p., 1993.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. M.; VANNUVVI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.

KALT, W.; FORNEY, C. F.; MARTIN, A.; PRIOR, R. L. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **J Agric Food Chem**, v. 47, p. 4638-4644, 1999.

KAMAL-ELDIN, A. Minor components of fats and oils. In: **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Specialty Oil & Oil Products**. 6 ed., v. 3, EUA, Wiley – interscience, 2005.

KANTER, M.; AKTAS, C. Effects of scrotal hyperthermia on Leydig cells in long-term: a histological, immunohistochemical and ultrastructural study in rats. **J Mol Histol**. 2009 v. 40, n.2, p. 123 – 130, 2009.

KASTELIC, J.P.; COULTER, G.H. Scrotal and testicular thermoregulation in the bull and ram. **Soc. for Theriogenology – Proc. Annual Meeting**, Florida, p. 67-72, 1993.

KATO, H.; KOGURE, K.; LIU, X.H.; ARAKI, T.; KATO, K.; ITOYAMA, Y. Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Res.**, v. 679, p. 1-7, 1995.

KIM, J. I.; JUNG, S. W.; YANG, E.; PARK, K. M.; ETO, M.; KIM, I. K. Heat shock augments angiotensin II-induced vascular contraction through increased production of reactive oxygen species. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 399, n. 3, p. 452 – 457, 2010.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K.H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, vol.98, p.381 - 387, 2006.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p.71 - 88, 2002.

KUMAGAI, A.; KODAMA, H.; KUMAGAI, J. ; KUMAGAI, J. ; FUKUDA, J. ; KAWAMURA, K. ; TANIKAWA, H. ; SATO, N. ; TANAKA, T. Xanthine oxidase inhibitors uppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. **Mol. Hum. Reprod.** n.1, v.8, p. 118-123, 2002.

KUMAGAI, J.; FUKUDA, J.; KODAMA, H.; MURATA, M.; KAWAMURA, K.; ITOH H.; TANAKA T. Germ cell-specific heat shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. **Eur. J. biochem.** 267, p. 3073-3078, 2000.

LAMIRANDE, E. ; GANGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. Effect on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **J. Androl**, v. 13, n. 5, p. 368-378, 1992.

LASOTA, B.; BLASZCZYK, B.; SEREMAK, B.; UDALA, J. Selenium status and GSH-Px activity in semen and blood of boars at different ages used for artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 309-314, 2004.

LEVINE, L. A.; RICHIE, J. P. Urological complication of cyclophosphamide. **J. Urol**, v. 141, p. 1063-1069, 1989.

LI, A.; BANDY, B.; TSANG, S. S.; DAVISON, A. J. DNA-breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds in vitro. **Free Radic. Res.**, v.B33, p.551-566, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR A, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents, **J Biol Chem.** 193, p.265-275, 1951.

LUE, Y. H.; HIKIM, A. P. S.; RONALD, S.; SWERDLOFF, P. I. M.; TAING, K. S.; BUI, T.; LEUNG, A.; WANG, C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. **Endocrinology**, v. 140. p. 1709-1717, 1999.

LUI, W. Y.; CHENG, C.Y. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis—A molecular and biochemical perspective. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** n. 18, p. 299–311, 2007.

LUKE, M. C.; COFFEY, D. S. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology of reproduction. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. Ed. **The physiology of reproduction.** Ed. 2, New York: Raven Press, v. 1, cap. 23, p. 1435-1488, 1994.

MALIK, N. S.; PEREZ, J. L.; LOMBARDINI, L.; CORNACHIA, R.; CISNEROS-ZEVALLOS.; BRAFORD, J. Phenolic compounds and fatty acid composition of organic and conventional grown pecan kernels. **J. Sci Food Agric**, n. 89, p. 2207-2213, 2009.

MARTINS, R. D.; McMANUS, C.; CARVALHÊDO, A. S.; BORGES, H. V.; SILVA, A. E. D. F.; SANTOS, N. R. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. **Rev. Bras. Zootc.**, v. 32, n. 6, p. 1594-1603, suppl. 1, 2003.

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

McGINNIS, M.Y.; LUMIA, A. R.; POSSIDENTE, B.P. Effects of withdrawal from anabolic androgeic steroids on aggression in adult male rats. **Physiology and Behavior**, v. 75, p. 541-549, 2002.

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

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

MOURA, A. E.; ERICKSON, B. H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationship with testis size and number of Sertoli and germ cells in beef bulls. **J. Reprod. Fert.** v. 111, p. 183-190, 1997.

MULLER, E.; RODRÍGUEZ, H. M.; BRADEN, S. et al., 1992. **Australia Bull**, n. 148.

NAKAI, A., SUZUKI, M., TANABE, M. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. **Embr J**, v. 19: p. 1545-1554, 2000.

NICHI, M. **Sistema e proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados na região de Dourados, MS**. 2003. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NORDBERG, J. ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

ORO, T.; OGLIARI P.J.; AMBONI, R.D.M.C.; BARRERA-ARELLANO, D. y BLOCK, J. M. Evaluación de la calidad durante el almacenamiento de nueces Pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] acondicionadas en diferentes envases. **Grasas y Aceites**, v. 59 (2), p. 132 - 138, 2008.

OSINOWO, O. A.; MARRIE, B. N.; EKPE, G. A. 1992. Preliminary study of postnatal growth and reproductive tract development in Yankasa rams. **Anim. Reprod .Sci.**, 27: 49-54.

ORTEGA-PACHECO, A.; RODRÍGUEZ-BUENFIL, J. C.; SEGURA-CORREA, J. C.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; JIMENEZ-COELHO, M.; LINDE FORSERG, G. Pathological conditions of reproductive organs of male stray dogs in the tropics: Prevalence, risk, factors, morphological findings and testosterone concentrations. **Reprod Dom Anim**, p. 1-9, 2006.

ORTH, J. M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing LL. (eds), **Cell and Molecular Biology of the Testis**, 1st ed. New York: Oxford University Press. p 3-42, 1993.

PALASZ, A. T.; CATES, W. F.; BARTH, A. D.; MAPLETOFT, R. J. The relation ship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 715-729, 1994.

PELTOLA, V.; HUHTANIEMI, I.; AHOTUPA, M. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1146-1150, 1995.

PINART, E.; BONET, S.; BRIZ, M.; PASTOR, L. M.; SANCHO, S.; GARCÍA, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J. Morphological and histochemical characteristics of the lamina propria in scrotal and abdominal testes from postpubertal boars: correlation with the appearance of the seminiferous epithelium. **J Anat.** p. 435-48. 2001

PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M. Antioxidant proprieties of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. **Grasas y aceites**, v. 60, n. 6, p. 330-335, 2009.

PRADO, A. C. P.. **Avaliação da atividade antioxidante da casca e torta de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**. 2008. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

PRIOR, R. L.; GU, L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. **Phytochemistry**, n. 66, p. 2264 – 2280, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANCA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.2, n.4, p.152 - 159, 1997.

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

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

ROSER, J.F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**. n. 107, p. 179-196, 2008.

RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D.. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. cap. 1, p. 1-40.

SAMALI, A. & ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress Chaperon.**, v. 3, p. 228-236, 1998.

- SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 9, p. 1835-1841, 2000.
- SAWA, T.; NAKAO, M.; AKAIKE, T.; ONO, K.; MAEDA, H. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, v.47, p.397-402, 1999.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130 (Suppl. 8S), p. 2073-2085, 2000.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.
- SETCHELL, B. P. Heat and the testis. **Journal of Reproduction Fertility.**, v. 114, p. 179-194 1998a.
- SETCHELL, B. P. The parkes lecture heat and the testis. **J. Reprod. Fertil.** v.114, p. 179-194, 1998b.
- SETCHELL, B. P. The effects of heat on the testes of mammals. **Anim. Reprod.**, v. 3, n. 2, p. 81-91, April/June. 2006.
- SHAHID, F.; NACZK, M. *Cereals, Legumes and Nuts*, In: **Phenolics in food and Nutraceutical**. Boca Raton, CRC Press LLC, 2004.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: Regulatory Status. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6. ed., v.1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.
- SHARP, P. R.; MASSA, S.; SWANSON, R. A. Heat shock protein protection. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 97 – 99, 1999.
- SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E.; NEILL, J.D. Ed. **The physiology of reproduction**. ed. 2, New York: Raven Press, v. 1, cap. 22, p. 1363-1434, 1994.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal Biochemistry**. v. 215, p. 213-219, 1993.

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

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

SOUZA, J. A. A. T.; COSTA, F. A. L. Características do sêmen e correlação com outros parâmetros reprodutivos em ovinos deslanados. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS – PESQUISA COM CAPRINOS E OVINO NO CCA, 1992, Teresina, PI. **Anais...** Teresina, 1992. p. 80-86.

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

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v.16, n. 7/8, p. 716-718, 2000.

TRISTÃO, M. A. P. Estudo histopatológico e ultra-estrutural do testículo criptorquídico. **Arq. Bras. Med**, v. 60, n. 3, p. 197-202, 1986.

TSAI, SHIOW-CHWEN; CHIEN-CHEN, LU.; CHIU-SHUANG, LIN; PAULUS, S. WANG. Antisteroidogenic Actions of Hydrogen Peroxide on Rat Leydig Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 90, p. 1276-286, 2003.

TURNER, T. T.; BANG, H. J.; LYSIAK, J. L. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. **J Urol**. v. 172, p. 2574-2578, 2004.

VALENTIM, L. M.; GEYER, A. B.; TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; WORM, P. V.; RODNIGHT, R.; GEYER, A. B.; HORN, A. P.; TAVARES, A. A.; CIMAROSTI, H.; NETTO, C. A.; SALBEGO, C. G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p. 379-386, 2003.

VALENZUELA, A. B.; NIETO S. K. Los antioxidantes: protectores de la calidad en La industria alimentaria. **Asociación Argentina de Grasas y Aceites. Libro 10° Aniversario. Recopilación de Artículos Técnicos de 1990 - 2000.** ed 1 - 41, Tomo III, p. 85 – 94, 2001.

VALLE, A.; FUENTES, A.; PUERTA, M. Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo Suizo nacidos en el trópico. **Rev. Fac. Agron.**, v. 22, p. 52-61, 2005.

VARNER, D. D; JOHNSON, L. From a sperm's eye view – revisiting our perception of this intriguing cell. In: Proceedings of the American Association of Equine Practitioners. 53. p. 104-177. 2007

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T.. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERHOEVEN, G.; DENOLET, E.; SWINNEN, J.V.; WILLEMS, A.; SAUDERS, P.T.K.; SHARPE, R.M.; DE GENDT, K. The role of androgens in the control of spermatogenesis: lessons from transgenic models involving s Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor. **Anim. Reprod.** v. 4, n. 1/2, p. 3-14, 2007.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 931p.

WAITES, G. W. H.; SETCHELL, B. P. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G.E. **Marshall's physiology of reproduction**. 1ed., Londres: Churchill Livingstone, 4ed. v. 2, 1990. p. 1-105.

WANASUNDARA, P. K. P. D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects**. 6. ed., v. 1, EUA, Wiley – Interscience, 2005.

WIDLAK, W.; WINAIARSKI, B.; KRAWCZYK, A.; VYDRA, N.; MALUSECKA, E.; KRAWCZYK, E. Inducible 70 kDa heat shock protein does not protect spermatogenic cells from damage induced by cryptorchidism. **International Journal of Andrology**. v. 30, n. 2, p. 80-87, 2007.

WON, K. J; LEE S. C.; LEE, C. K.; LEE, H. M.; LEE, S. H.; FANG, Z.; CHOI, O. B.; JIN, M.; KIM, J.; PARK, T.; CHOI, W. S.; KIM, S. K; KIM, B. Cordycepin attenuates neointimal formation by inhibiting reactive oxygen species-mediated responses in vascular smooth muscle cells in rats. **J Pharmacol Sci**, v.109, n. 3, p.403-12, 2009.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In: C. R. Santerre (Ed.), **Pecan technology**. New York: Chapman &Hall, p. 39 – 45, 1994.

XAVIER, G. C. **Efeito da suplementação alimentar com selênio + vitamina “E” em caprinos submetidos à insulação escrotal.** 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

YIN, Y. Z.; HAWKINS, K. L.; DEWOLF, .C. et al., 1997. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. **J. Androl.**,v.18, p.159-165.

ZHANG, J.; STANLEY, R. A.; ADAIM, A.; MELTON, L.; SKINNER, M. A. Free radical scavenging and cytiptotective activies of phenolic antioxidants. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 50, p. 996-1005, 2006.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165 - 5170, 2001.