UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

EFEITO DO γ-ORYZANOL NA DEGENERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR INSULAÇÃO ESCROTAL EM CARNEIROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EDUARDA ESCOBAR

Uruguaiana, RS, Brasil
2018

EDUARDA ESCOBAR

EFEITO DO γ-ORYZANOL NA DEGENERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR INSULAÇÃO ESCROTAL EM CARNEIROS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Francielli Weber Santos Cibin

Uruguaiana
2018

EDUARDA ESCOBAR

EFEITO DO γ-ORYZANOL NA DEGENERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR INSULAÇÃO ESCROTAL EM CARNEIROS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Produção e Reprodução Animal.

Dissertação defendida e aprovada em março de 2018.
Banca examinadora:

_____

Profa. Dra. Francielli W. Santos Cibin
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA
Orientadora

_____

Prof. Dr. Guilherme de Medeiros Bastos
Universidade Federal do Pampa– UNIPAMPA

_____

Dr. Henrique Löf
LÖF Reprodução Equina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força e fé necessárias para seguir em frente, superando os tropeços da vida com sabedoria todos os dias.

A minha família por todo o apoio e incentivo prestado, por ser meu alicerce na vida, onde sei que posso me apoiar sempre que houver a necessidade.

À Universidade Federal do Pampa, através do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, bem como a Capes pelo auxilio financeiro.

À minha orientadora Francielli W. Santos Cibin pela oportunidade de ser sua orientada, por confiar em mim e por toda ajuda e ensinamentos que me foi prestado.

Aos colegas de laboratório que sempre tiverem dispostos a ajudar, ensinar e aprender.

À equipe de IC's que muito fizeram por este trabalho, sempre dedicados e interessados.

Ao laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Pampa, em especial ao professor Tiago Gallina por todo o apoio prestado para a realizações dessa pesquisa.

À equipe de funcionários, em especial ao Arthur que além de prestar ajuda durante todo o experimento tornou-se um grande amigo.

À toda equipe Biotech pela participação, ajuda, e disponibilidade prestadas a essa pesquisa.

Aos professores pela disponibilidade, dedicação, orientação e ensinamentos prestados.

Às minhas amigas Janice, Bruna e Ingryd por estarem sempre comigo, mesmo que distantes.

Enfim, agradeço a todos que torceram por mim, estiveram comigo, na busca dos meus ideais.

Muito obrigada!

Cada pessoa é aquilo que crê, fala do que gosta, retém o que procura, ensina o que aprende, tem o que dá e vale o que faz.

Chico Xavier

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Universidade Federal do Pampa

EFEITO DO γ-ORYZANOL NA DEGNERAÇÃO TESTICULAR INDUZIDA POR INSULAÇÃO ESCROTAL EM CARNEIROS

AUTORA: Eduarda Escobar

ORIENTADORA: Francielli W. Santos Cibin

Uruguaiana, março de 2018

Fatores que afetam a fertilidade de reprodutores repercutem em baixa taxa de prenhes e afetam negativamente a produtividade e lucratividade do rebanho. O aumento da temperatura testicular é um efeito causador de degeneração testicular e consequente falha na qualidade e produção seminal em carneiros. Entre os mecanismos relacionados com o dano testicular, está o estresse oxidativo. O y-oryzanol é um componente do óleo de farelo de arroz, que vem sido descrito como potente antioxidante, e também por demonstrar melhoras significativas quando testado a nível de sistema reprodutor masculino. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com 33mg/PM/dia de y-oryzanol diante à degeneração testicular induzida através de insulação escrotal em carneiros. Para isso foram utilizados 8 carneiros, os quais foram divididos em 2 grupos: Controle (submetido a insulação escrotal sem o tratamento) e Gamma (submetido a insulação escrotal e ao tratamento com γ-oryzanol). Os carneiros foram submetidos a insulação escrotal induzida pela colocação de bolsa térmica durante 72 horas. Os animais do grupo Gamma receberam 33 mg/PM de y-oryzanol por via oral uma vez ao dia, iniciando 7 dias antes da insulação, durante a insulação e 20 dias após a insulação, totalizando 30 dias de tratamento. Amostras de sêmen e sangue foram coletadas durante o experimento para avaliações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo, integridade de membrana, motilidade e morfologia seminal, bem como dosagem de testosterona plasmática. Exames ultrassonográficas do parênquima testicular e avaliações clínicas de consistência e perímetro escrotal foram feitas com intervalo semanal. Coletas de tecido testicular para análise bioquímica de estresse oxidativo foram realizadas ao final no

experimento através de orquiectomia. Os resultados apontaram a ocorrência da degeneração testicular induzida pela insulação escrotal, provadas pela redução do perímetro escrotal e aumento da flacidez testicular imediatamente após o insulto, além do aumento tardio de pontos hiperecoicos no parênquima mediante a ultrassonografia e redução da motilidade na 10º semana. O tratamento com γ-oryzanol reduziu as ROS em testículo, aumentou FRAP na 10º semana, impediu o aumento de TBARS, manteve maior número de espermatozoides íntegros na 3ª semana, porém aumentou os defeitos totais a partir da 5ª semana. Embora o γ-oryzanol tenha mostrado uma proteção, em parte, nos parâmetros oxidativos avaliados no sêmen e testículo, essa terapia não conseguiu melhorar outros parâmetros estudados. Além disso, a suplementação com γ-oryzanol causou maior número de anormalidades morfológicas totais em sêmen. O presente estudo compartilha informações inéditas sobre o uso de γ-oryzanol oral em carneiros com degeneração testicular, na intenção de terapias para essa patologia tão importante no sistema de produção e que ainda não possui tratamento estabelecido.

Palavras-chave: γ-oryzanol, degeneração testicular, insulação escrotal, estresse oxidativo, carneiros.

ABSTRACT

Dissertation of Master`s Degree

Program of Post-Graduation in Animal Science

Federal University of Pampa

EFFECT OF γ-ORYZANOL ON TESTICULAR DEGENERATION INDUCED BY SCROTAL INSULATION IN RAMS

AUTHORA: Eduarda Escobar

ADVISOR: Francielli W. Santos Cibin

Uruguaiana, march, 2018

Factors affecting reproductive fertility have a low pregnancy rate and negatively affect herd productivity and profitability. The increase in testicular temperature is a causative effect of testicular degeneration and consequent failure in quality and seminal production in sheep. Among the mechanisms related to testicular damage is the oxidative stress. γ-oryzanol is a component of rice bran oil, which has been described as a potent antioxidant, and also demonstrates significant improvements when tested at the level of the male reproductive system. In this context, this study aimed to evaluate the effects of supplementation with 33mg / PM / day of y-oryzanol in the face of testicular degeneration induced by scrotal insulation in sheep. For this, eight rams were used, which were divided into 2 groups: Control (submitted to scrotal insulation without treatment) and Gamma (submitted to scrotal insulation and γ-oryzanol treatment). The sheep were subjected to scrotal insulation induced by thermal bag placement for 72 hours. Gamma animals received 33 mg / MW oral y-oryzanol once daily, starting 7 days before insulation, during insulation and 20 days after insulation, totaling 30 days of treatment. Samples of blood and semen were collected during the experiment for biochemical evaluations related to oxidative stress, membrane integrity, motility and seminal morphology, as well as plasma testosterone dosage. Ultrasound examinations of the testicular parenchyma and clinical evaluations of consistency and scrotal perimeter were performed with weekly interval. Testicular tissue collections for biochemical analysis of oxidative stress were performed at the end of the experiment by orchiectomy. The results indicated the

occurrence of testicular degeneration induced by scrotal insulation, as demonstrated by the reduction of the scrotal perimeter and increase in testicular flaccidity immediately after insult, as well as the late increase of hyperechoic points in the parenchyma by ultrasonography and reduction of motility in the 10th week. Treatment with γ-oryzanol reduced ROS in the testis, increased FRAP by the 10th week, increased TBARS, maintained a higher number of intact spermatozoa at week 3, but increased total defects from week 5 onwards. Although γ-oryzanol showed protection in part in the oxidative parameters evaluated in the semen and testis, this therapy did not improve other parameters studied. In addition, supplementation with γ-oryzanol caused a higher number of total morphological abnormalities in semen. The present study shares unpublished information on the use of γ-oryzanol oral in rams with testicular degeneration, in the intention of therapies for this pathology so important in the system of production and that still does not have established treatment.

Key words: γ-oryzanol, testicular degeneration, scrotal insulation, oxidative stress, rams.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: componentes do γ-oryzanol 19
Figura 2: Semelhanças estruturais entre o colesterol e componentes do γ-oryzanol..... 20

ARTIGO

Figure 1: Experimental design: A- division of groups and specifications; B- Timeline.....27
Figure 2: Rectal and scrotal temperatures during the insulation period……..……..…..31
Figure 3: Scrotal perimeter (cm) following the experimental period of the Control and Gamma groups. Week 1 is representative of pre-insulation period and week 2 is post-insulation period……..…….32
Figure 4: Middle sagittal ultrasonographic image of testis of ram. A. first week (pre-insulation). B. sixth week. C. seventh week. D. tenth week……...33
Figure 5: Photomicrograph of seminiferous tubules from exposed rats: [A] Disorganized seminiferous tubules, [B] Note intercellular spaces and (Δ), Exfoliated germ cells . (400x) HE staining……..…34
Figure 6: A- Reactive oxygen species (ROS), B- Ferric reducing potential (FRAP) and, C- Lipid peroxidation (TBARS). * indicate statistical difference (P<0,05) by Student`s t-test between Control (n=4) and Gamma (n=4) groups…….……....34
Figure 7: 17β Hydroxy-steroid dehydrogenase enzyme activity in testicular tissue. Statistical analysis used was student's t-test between Control (n = 4) and Gamma (n = 4) groups……..35
Figure 8: Plasma testosterone levels obtained every 14 days…….35
Figure 9: Mean of total motility expressed in% over weeks. Week 1 represents pre-isolation period and week 2 immediately after isolation (*) significant difference between groups. Level of significance p> 0.05…….....36
Figure 10: Mean of total defects expressed in% over weeks. Week 1 represents preinsulation period and week 2 period immediately after isolation (*) significant difference between groups. Level of significance p> 0.05……..……..37
Figure 11: Membrane integrity means in number of spermatozoa in 300 cells, over the weeks. Week 1 represents pre-isolation period and week 2 period immediately after isolation (*) significant difference between groups. Level of significance p> 0.05.....37
Figure 12: A. Reactive Oxygen Species, B. Lipid Peroxidation and C. Total Antioxidant Capacity. Averages over the weeks. Week 1 represents pre insulation period and week 2 period immediately

after insulation. (*) significant difference between groups. Level of significance (P <0.05).....38

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1: Testicular consistency following experimental period evaluated weekly. To evaluation was used the score: 1-5 being 5 firm constipation (Normal) and 1 very flaccid…33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....14
2.1 Termorregulação testicular: aspectos anatômicos.....14
2.2 Degeneração testicular.....15
2.2.1 Etiologia e patogênese.....17
2.2.2 Diagnóstico.....18
2.2.3 Tratamento.....18
2.3 Estresse oxidativo.....18
2.4 γ-oryzanol.....19
3. OBJETIVOS.....23
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....24
5. CONCLUSÃO.....49
6. REFERÊNCIAS.....50

1.INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil conta com aproximadamente 18 milhões de cabeças de ovinos, sendo que os rebanhos mais expressivos em números estão no nordeste do país e no Rio Grande do Sul (entre 1 a 4 milhões de cabeça) (IBGE-2015). A fronteira oeste do Rio Grande do Sul dispõe do maior rebanho ovino do estado, com número de cabeças entre 100 e 400 mil. Essa mesma região, nos últimos anos, tem alcançado as temperaturas mais altas do estado nos períodos quentes, atingindo até 41°C (Tempo e Clima SG, 2012), com aumentos de até 3°C em relação a temperatura máxima média do estado (Walter, 2014). Desta forma, o estresse térmico representa um grande risco para a espécie ovina, principalmente no que se refere a carneiros reprodutores. A fertilidade é um dos quesitos mais importantes para ruminantes de produção, tanto para os destinados a cadeia da carne, do leite, quanto da lã. Uma vez que o reprodutor é responsável por gerar maior número de descendentes, comparados com as fêmeas, sua fertilidade influencia diretamente na lucratividade do sistema de produção animal (Barbosa *et al*, 2005).

A degeneração testicular tem sido considerada como uma das causas mais comuns na redução da fertilidade em machos das espécies domésticas (Jainudeen & Hafez, 1983) sendo mais evidente o comprometimento de animais que vivem em condições climáticas desfavoráveis (Gabaldi & Wolf, 2002). Foi relatada como sendo a maior causa de baixa fertilidade em garanhões (Alvarenga & Papa, 2009). Em levantamento feito no Brasil com 628 touros, a degeneração foi a patologia mais frequente encontrada (40,3%) nos casos de baixa fertilidade ou infertilidade (Vale Filho, 1974). Nos bovinos de origem europeia (*Bos taurus*) criados em regiões de clima quente a patologia é corriqueiramente diagnosticada devido a não adaptação de determinadas raças às altas temperaturas (Brito *et al* 2004).

A patogênese da degeneração testicular causada por altas temperaturas inicia-se com o aumento do metabolismo celular, causado pela temperatura, sem o aumento proporcional da vascularização, causando dessa forma a hipóxia celular (Poul *et al*, 2009). O quadro de hipóxia celular culmina com o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo, como consequência deste aumento, ocasionar um estresse oxidativo, causando dano celular ou tecidual (Hansen, 2009) O resultado desses mecanismos são alterações degenerativas do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos (Arthur, 1979) que afetam a qualidade e a capacidade da produção espermática conforme a gravidade do insulto ocorrido.

O tratamento para a degeneração testicular ainda não está totalmente estabelecido, o que se preconiza é a identificação e retirada do agente causador associado a administração de uma terapia de suporte com antioxidantes, por exemplo (Alvarenga & Papa, 2009). Desta forma, estudos que buscam terapias alternativas para minimizar os efeitos deletérios associados a degeneração testicular são importantes. Estas terapias teriam como princípio a restauração do epitélio tecidual e/ou a prevenção do dano oxidativo associado ao insulto.

O γ-oryzanol é um nutracêutico proveniente do óleo do farelo de arroz, constituído por uma variedade de ésteres de ferulatos (Scavariello & Arellano, 1998). Os principais constituintes do γ-oryzanol são considerados potentes antioxidantes (Xu *et al*, 2001; Xu & Godber, 2001). O efeito antioxidante do γ-oryzanol sobre dano induzido por cádmio no sistema reprodutor masculino de camundongos foi demostrado por Spiazzi e colaboradores (2013), tendo resultados positivos na prevenção da peroxidação lipídica e recuperação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutationa-S-transferase (GST). Outro trabalho investigando os efeitos da suplementação alimentar com óleo do farelo de arroz comercial (Gama-Horse, HT Nutri®, Brasil) sobre os parâmetros espermáticos de garanhões foi realizado por Arlas e colaboradores (2008), onde os autores sugeriram um aumento do potencial antioxidante total do sêmen associado a melhora na integridade de membrana e aumento na motilidade espermática.

Considerando o processo oxidativo envolvido na degeneração tecidual causada pelo aumento da temperatura testicular e conhecendo os efeitos antioxidantes do γ-oryzanol, bem como sua possível influência na síntese de esteróides, o trabalho visa avaliar o efeito da suplementação com esse componente do óleo do farelo de arroz diante de um dano induzido pela insulação escrotal em carneiros. Desta forma, busca-se uma alternativa de tratamento e/ou prevenção para a degeneração testicular, sendo esta uma problemática comum em reprodutores ovinos, que pode ser agravada na região oeste do Rio Grande do Sul devido às altas temperaturas registradas durante o verão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Termorregulação testicular: aspectos anatômicos

Os mamíferos domésticos possuem os testículos alojados em uma bolsa chamada de escroto e ficam posicionados externamente a cavidade abdominal (Hanzen, 2009). Algumas espécies silvestres como os elefantes, por exemplo, não possuem escroto e os testículos ficam localizados internamente na cavidade abdominal. Isso contradiz a hipótese mais antiga baseada na "cooling hypothesis" proposta por Moore (1962 apud Kleisner *et al* 2010, p27) que afirma que a espermatogênese só ocorrerá de forma eficaz em condições onde a temperatura testicular esteja abaixo da temperatura corporal, justificando o posicionamento testicular externo à cavidade abdominal. A teoria de Werdelim e Nilsonne (1999) sugere que o escroto vem sido perdido ao longo da evolução, conforme a adaptação da espermatogênese a temperaturas mais altas, pois a descida do testículo ao escroto é um processo que requer grande demanda energética. Já Keiner *et al* (2010) defende a ideia de que diferenças na localização testicular são resultantes de diferentes pressões de seleção entre as espécies, que buscam garantir o desenvolvimento e armazenamento espermático, bem como a proteção do órgão contra agentes físicos, distúrbios fisiológicos e genéticos (Kleisener *et al*, 2010).

Apesar de diversas teorias sobre o posicionamento testicular, nos mamíferos domésticos e no homem a espermatogênese ocorre de forma plena quando os testículos encontram-se com temperaturas mais baixas do que a temperatura interna corporal (Hansen, 2009). Essa diferença de temperatura é delimitada entre 2 a 6°C abaixo da temperatura corporal (Kastelic *et al*, 1996).

As estruturas anatômicas essenciais para garantir as baixas temperaturas testiculares são: o plexo pampiniforme, os músculos da túnica dartus e cremaster, a superfície do escroto com as glândulas sudoríparas (Blazquez *et al*, 1988; Hansen, 2009). O plexo pampiniforme localiza-se no funículo espermático e corresponde a um emaranhado de artérias e veias que permite o resfriamento do sangue arterial a partir do contato indireto com o sangue venoso que vem dos testículos (Kastelic *et al*, 1996; Hansen 2009; Barros *et al*, 2011). Alguns animais conseguem a diminuição de até 4°C na temperatura do sangue arterial através do mecanismo de contracorrente do plexo pampiniforme (Hafez & Hafez, 2003). Animais com

deposição de gordura nessa região têm o mecanismo do plexo pampiniforme prejudicado, isso ocorre com frequência em bovinos com essa condição (Kastelic. 2014).

A túnica dartus é uma estrutura muscular lisa localizada abaixo da pele do escroto, atua na regulação da temperatura contraindo e relaxando, diminuindo ou aumentando a superfície para troca de calor do escroto (Sanger, 2003). Para alterar a posição do escroto em relação ao corpo existe o músculo cremaster, que além de aproximar ou distanciar os testículos da fonte de calor corporal, parece interferir no fluxo sanguíneo (Sanger, 2003). A superfície escrotal é importante pela sua capacidade de radiação, permitindo a troca de calor (Kastelic *et al*, 1997), mas também por possuir glândulas apácrinas que permitem a sudorese (Nunes, 2015).

Nos mamíferos todo sistema de termorregulação é controlada pelo hipotálamo e alguns receptores específicos presentes nas superfícies corpóreas, nos grandes vasos e no cérebro, gerando assim informações para que a região testicular em equilíbrio térmico (Rhoades & Tanner, 2005)

2.2 Degeneração testicular

2.2.1 Etiologia e patogênese

A perda da termorregulação testicular ocasionada por fatores que aumentem sua temperatura, levam a um processo chamado degeneração testicular (Moule & Waites, 1963). Muitos são esses fatores, entre eles as altas temperaturas ambientais, processos febris sistêmicos, crisptorquidismo, dermatites escrotais, edema, hidrocele e excesso de gordura escrotal (Nascimento & Santos 2003, Alvarenga & Pappa, 2009). Ainda, a degeneração pode ocorrer como consequência de infecções, inflamações e traumas testiculares ou vasculares e também por deficiências nutricionais, como a de vitamina A (Livera *et al*, 2002; Zervos *et al*, 2005).

Chacur *et al* (2013) notaram efeitos significativos sobre a qualidade espermática na época mais quente do ano em bovinos, com redução da motilidade espermática principalmente. Algumas raças possuem resistência às alterações de temperatura, assim como outras são mais sensíveis, como as raças europeias, por exemplo (Pezzini *et al*, 2006)

A degeneração testicular é uma das principais patologias envolvidas em casos de redução da fertilidade de reprodutores em inúmeras espécies. Em garanhões foi relatada como a maior causa de baixa fertilidade (Alvarenga & Papa, 2009). Em bovinos, um levantamento feito no Brasil com 628 touros, apontou a degeneração testicular como sendo a patologia mais frequentemente encontrada, representando (40,3%) dos casos de baixa fertilidade ou infertilidade (Vale Filho, 1974). Em raças exóticas, ou seja, menos adaptadas a climas quantes, o quadro pode ocorrer em maior proporção, como o que ocorre nos bovinos de origem europeia (*Bos taurus*) criados em regiões de clima quente em que a patologia é corriqueiramente diagnosticada devido a não adaptação de determinadas raças às altas temperaturas (Brito *et al* 2004).

A patogênese da degeneração testicular causada por altas temperaturas inicia-se com o aumento do metabolismo celular, causado pelo aumento da temperatura, sem o aumento proporcional da vascularização, causando dessa forma a hipóxia celular. A hipoxia ocorre quando a tensão do oxigênio é reduzida a níveis abaixo do necessária para a função celular normal em um tecido específico. Isso pode ser em resposta ao fluxo sanguíneo inadequado no tecido ou à redução da capacidade de transporte de oxigênio (Poul *et al*, 2009). O quadro de hipóxia celular culmina com o aumento das espécies reativas de oxigênio ou seja, com a ocorrência do estresse oxidativo (Hansen, 2009) que é responsável por causar alterações nucleares como a descondensação da cromatina, fragmentação do DNA e alterações no formato nuclear (Poul *et al*, 2009).

A degeneração progressiva normalmente ocorre, podendo ser de discreta a avançada. O acometimento tecidual pode ocorrer em um ou em ambos os testículos, afetar poucas ou muitas porções dos túbulos seminíferos, definindo a gravidade do dano na produção e qualidade espermática (Nascimento *et al*, 2010). Casos leves de degeneração tesicular já são capazes de influenciar na espermatogênese, alterando concentração, motilidade, vigor e morfologia (Horn *et al*, 1999; Nascimento *et al* 2010).

O reestabelecimento da função reprodutiva pode ocorrer quando a degeneração não agride de forma severa o epitélio germinativo, pois as espermatogônias, as células de Sertoli e Leyding possuem resistência relativa permitindo a recuperação em aproximadamente 60 dias após a remoção da causa primária (Nascimento & Santos, 2003). Um estudo que submeteu ovinos a 7 dias de insulação escrotal obteve a recuperação completa das funções testiculares 153 dias após o insulto (Oliveira *et al*, 2014).

2.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico para a degeneração testicular pode ser feito através do exame andrológico, buscando alterações de consistência testicular e circunferência escrotal, além de alterações ultrassonográficas. No exame clínico é possível determinar a consistência testicular através da palpação, esta pode estar flácida em testículos degenerados, ou firme e com tamanho reduzido em casos mais graves, devido ao aumento do tecido conjuntivo intersticial (Nascimento *et al*, 2010). A fim de confirmar a ocorrência da patologia, a colheita e avaliação do ejaculado deve ser feita (Bicudo 2007; Perez & Crespo *et al*, 2008; Hansen, 2009). O sêmen de animais com degeneração testicular pode apresentar diminuição da concentração e motilidade espermática e aumento das alterações morfológicas, de acordo com a gravidade da lesão. As alterações como as de cabeça, cauda, cabeças isoladas e gotas citoplasmáticas proximais são os defeitos normalmente encontrados no sêmen de animais com degeneração escrotal (Hansen, 2009).

Para a correta avaliação espermática em casos de degeneração escrotal, é importante conhecer os tempos referentes a espermatogênese e transito epididimário. Em carneiros, a espermatogênese leva em média 47 dias para ocorrer e em média 14 dias para a passagem e maturação do sêmen no epidídimo (Sanger, 2003). Por isso, alterações morfológicas relacionadas ao epidídimo, logo a maturação espermática, são as primeiras a aparecer na avaliação do sêmen, aproximadamente 15 dias após o insulto. O tempo de recuperação também deve estar de acordo com o tempo de espermatogênese de cada espécie (Sanger, 2003).

A ultrassonografia é utilizada para a avaliação testicular. Um estudo de Teixeira (2011) relata que é possível fazer uma avaliação precisa e prática do estroma testicular a partir de sua ecogenicidade, contribuindo assim para o diagnóstico precoce de alterações reprodutivas. Processos de calcificação, microlitíase testicular são observados pelo exame de ultrassom como pontos hiperecoicos demostrando um parênquima heterogênio. A visualização de alterações testiculares pela ultrassonografia é de suma importância, pois muitas vezes o resultado do exame clínico aliado a análise de sêmen geralmente não são suficientes para a obtenção de um diagnóstico preciso (Cardilli *et al*, 2010).

O diagnóstico histopatológico, quando feito a partir de biopsia testicular, acaba por gerar lesões no local da punção (Sartori, 2002), mas apesar disso, Bezerra *et al* (2008) diagnosticaram a degeneração testicular em ovinos através do exame histopatológico. As

alterações observadas foram a redução das células germinativas, túbulos seminíferos com células gigantes multinucleares, diminuição da altura do epitélio seminífero e vacuolização das espermatogônias remanescentes com citoplasma rugoso e núcleo em picnose.

2.2.3 Tratamento

O tratamento para a degeneração testicular consiste na retirada do agente causador com a administração de terapia de suporte com antioxidantes (Alvarenga & Papa 2009). Xavier (2007) ao estudar o efeito da suplementação com vitamina E e selênio em caprinos com degeneração testicular induzida por insulação escrotal notou que o tratamento retardou os efeitos deletérios aos testículos após 18 dias de insulação.

O que interfere no sucesso do tratamento é o diagnóstico tardio, em períodos onde só essa intervenção não é mais suficiente para a recuperação. Apesar dos agentes antioxidantes possuírem papel importante frente à casos de degeneração, os resultados variam muito, pois ainda não há o estabelecimento das doses corretas, período de tratamento adequado, uso curativo ou uso preventivo na suplementação de reprodutores sadios (Alvarenga & Papa, 2009)

Há trabalhos testando e tendo bons resultados com o uso da laserterapia de baixa intensidade para auxiliar na proliferação celular e recuperação do epitélio testicular (Taha & Valojeroi, 2004), porém a intensidade utilizada ainda não está bem estabelecida, tendo resultados positivos, com a indução da proliferação do epitélio testicular, mas com toxicidade sobre as células espermáticas (Alves *et al*, 2016).

O uso da pentoxifilina também é empregada em alterações testiculares, com estudos em homens (Moein *et al*, 2005; Oliva *et al*, 2009) e em ratos (Queirol *et al*, 2013; Yao *et al*, 2016) com bons resultados na melhoria dos parâmetros espermáticos e testiculares.

2.3 Estresse Oxidativo

Os radicais livres são moléculas que possuem pelo menos um elétron não pareado em sua última camada eletrônica, o que os tornam extremamente instáveis e altamente reativos (Sharma & Agorwal, 1996). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas durante o metabolismo celular e estão presentes nos testículos, pois participam de funções importantes para os espermatozoides como a capacitação, reação acrossômica, hiperativação e fusão esperma-oócito (Agarwal *et al*, 2012; Shirashi *et al*, 2012). Dentre as principais ERO

destacam-se o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (-OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre, por não possuir elétron livre (Hicks, 2001), porém é uma molécula bastante reativa e é a principal envolvida em danos nos espermatozoides equinos (Baumber *et al*, 2000).

O estresse oxidativo se estabelece quando ocorre um desequilíbrio entre as ERO e os agentes do complexo antioxidante, formado por sistemas enzimáticos e moléculas orgânicas endógenas e exógenas (Frei, 1999). Esse aumento exacerbado de ERO agride as células, podendo causar a apoptose (Agarwal *et al*, 2012; Paul *et al*, 2009). Dois mecanismos são descritos para o envolvimento do estresse oxidativo na apoptose. O primeiro seria através da oxidação dos componentes celulares como lipídios de membrana e DNA e o segundo como fator desencadeante da ativação da apoptose, de forma indireta (Ishi *et al*, 2005; Shiraishi *et al*, 2010). A produção de ERO e os danos ao DNA são maiores em espermatozoides imaturos, causando retenção de citoplasma e anormalidades morfológicas de cabeça (Ollero *et al*, 2001). A peroxidação lipídica causada pelas ERO provoca redução da motilidade, da integridade do acrossoma e do potencial de membrana mitocondrial, prejudicando a viabilidade espermática (Baumber *et al*, 2000).

Trabalhos realizados por Ahatupa e Huhtaniemi (1992) e Ikeda *et al* (1999), mostraram o aumento do peróxido de hidrogênio em testículos de ratos expostos ao estresse térmico acompanhado por uma diminuição da atividade enzimática antioxidante, tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase. Peltola *et al* (1995) ao conduzir um experimento em ratos, sugeriu que o dano oxidativo ocorre principalmente devido ao rápido aumento de ERO, isto porque observou danos ao DNA sem a proporcional diminuição a nível de defesas antioxidantes.

2.4 γ- oryzanol

O γ-oryzanol foi descoberto em 1954 por Kaneko e Tsuchiya no Japão como sendo um elemento único no óleo de arroz. Em estudos seguintes foi revelado que não se trata de uma substância simples e sim um conjunto de estéres ferulatos chamados α, γ e β oryzanol (Scavariello & Arellano, 1998). Devido a seus diversos benefícios, o y-oryzanol tem sido o mais estudado. Suas propriedades benéficas a saúde envolvem a redução do colesterol plasmático, inibição da agregação plaquetária e aumento da excreção de ácidos biliares, redução da absorção do colesterol e arteriosclerose precoce (Lichentein *et al*, 1994, Seetharomaiah *et al* 1990, Rong *et al*, 1997). Além disso, o composto tem sido utilizado na

indústria farmacêutica e cosmética, assim como aditivo de alimentos, devido a suas propriedades antioxidativas (Juliano *et al*, 2005). A composição do γ-oryzanol definida por Xu e Godber (1999) está demosntrada na Figura 1.

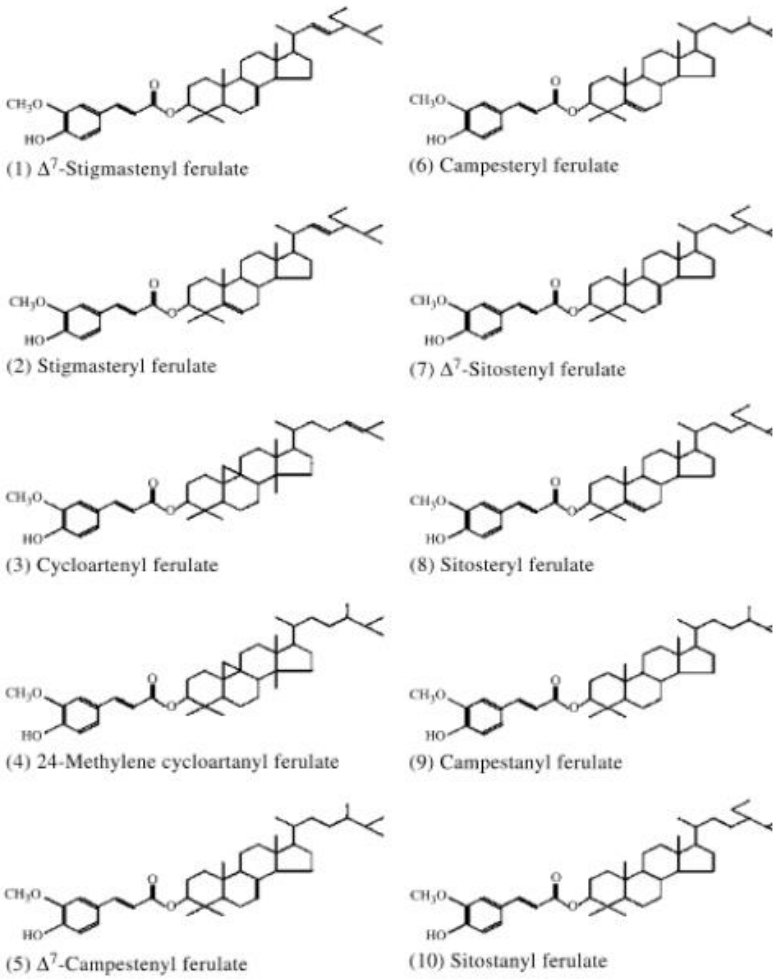

Figura 1: Componentes do γ-oryzanol FONTE: Xu & Godber, 1999

O óleo do farelo de arroz possui aproximadamente 3000mg/kg de y-oryzanol (XU *et al*., 2001) o que o torna o principal componente bioativo do óleo com inúmeros efeitos benéficos a saúde já demonstrados como o auxílio na redução do colesterol (Scavariello & Arellano, 1998). Os principais constituintes do y-oryzanol são considerados potentes antioxidantes, sendo estes 10 vezes mais eficientes quando comparados ao tocoferol e tocotrienol, que são componentes da vitamine E (Xu *et al*, 2001; Xu & Godber, 2001).

Os fitoesteróis presentes na composição do y-oryzanol como o β-sistoterol, campesterol e estigmasterol são substâncias que desempenham nas plantas as mesmas funções do colesterol nos seres vivos, importantes na síntese de biomoléculas essenciais como os hormônios sexuais e algumas vitaminas (Kritchevsky, 1997). Suas semelhanças estruturais

com o colesterol levaram a muitas teorias sobre seus efeitos biológicos (Wheeler & Garleb, 1991), inclusível que a ingestão de y-oryzanol possa beneficiar a produção de hormônios esteroidais em indivíduos com déficit de fertilidade. As diferenças entre as moléculas ocorrem principalmente na cadeia lateral, porém o β-sistosterol, um dos componentes do γ-oryzanol, possui estrutura química que poderia ser convertida em andrógeno, de forma anabólica (Figura 2).

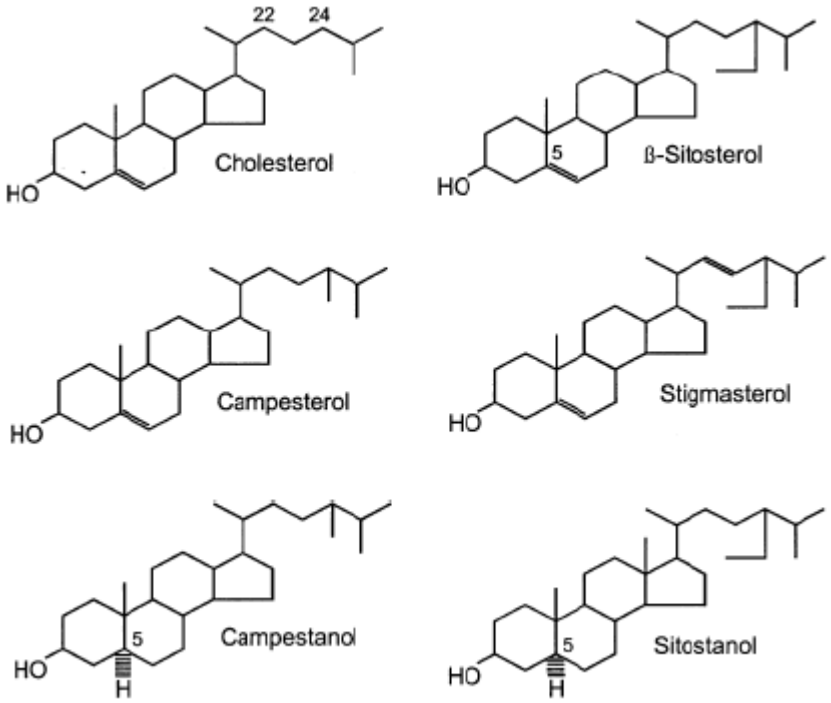

Figura 2: Semelhanças estruturais entre o colesterol e componentes do γ-oryzanol. FONTE: Wheeler e Garleb, 1991.

Os esteróis de ácido ferúlico, como o γ-oryzanol são absorvidos através de difusão passiva através da mucosa intestinal devido a seu alto coeficiente de partição óleo-água (Zhao & Maghadasion, 2008). Isso foi provado por Fujiwara *et al* (1983) que conseguiu recuperar maior parte do γ-oryzanol absorvido (marcado com carbono 14) intacto na veia mesentérica. Esses trabalhos mostram que os efeitos bioativos da susbstância podem ser conseguidos a partir da administração oral da mesma.

O efeito antioxidante do γ-oryzanol sobre dano induzido por cádmio no sistema reprodutor masculino de camundongos foi demostrado por Spiazzi e colaboradores (2013), tendo resultados positivos na prevenção da peroxidação lipídica e recuperação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutationa-S-transferase (GST). Outro trabalho investigando os efeitos da suplementação alimentar com óleo do farelo de arroz comercial

(Gama-Horse, HT Nutri®, Brasil) sobre os parâmetros espermáticos de garanhões foi realizado por Arlas e colaboradores (2008), onde os autores sugeriram um aumento do potencial antioxidante total do sêmen associado à melhora na integridade de membrana e aumento na motilidade espermática. Gonzaga *et al* (2012), também suplementou a dieta de garanhões durante 60 dias com óleo de arroz semi-refinado com alto teor de γ-oryzanol, porém não encontrou diferença significativa entre os grupos para as variáveis volume, concentração, motilidade e morfologia espermática, somente obteve o aumento do colesterol total e LDL-C plasmático nos animais suplementados.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar os efeitos da suplementação com y-oryzanol diante da degeneração testicular induzida através de insulação escrotal em carneiros.

Específicos

Investigar se a suplementação com y-oryzanol é capaz de promover efeitos benéficos sobre:

1. As alterações na qualidade espermática, bem como aspectos histológicos no sistema reprodutor de carneiros submetidos a insulação escrotal.
2. O desequilíbrio de biomarcadores de estresse oxidativo promovidos pela insulação escrotal em sêmen e sistema reprodutor de carneiros.
3. Os níveis de testosterona plasmática, bem como a atividade de uma enzima-chave na esteroidogênese, a 17β-hidroxiesteróide desidrogenase em sêmen e testículos de carneiros submetidos à insulação escrotal.

ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of γ-oryzanol on testicular degeneration induced by scrotal insulation in rams

Eduarda Escobar, Juliana Bernera Ramalho, Fábio Gallas Leivas, Daniela dos Santos Brum, Francielli Weber Santos Cibin

Abstract

The present study assessed the effects of supplementation with 33mg / PM / day of γ-oryzanol in the face of testicular degeneration induced by scrotal insulation in sheep. Eight rams were used, which were divided into 2 groups: Control (submitted to scrotal insulation without treatment) and Gamma (submitted to scrotal insulation and γ-oryzanol treatment). The sheep were subjected to scrotal insulation induced by thermal bag placement for 72 hours. Gamma animals received 33 mg / MW oral y-oryzanol once daily, starting 7 days before insulation, during insulation and 20 days after insulation, totaling 30 days of treatment. Samples of semen and blood were collected during the experiment for biochemical evaluations related to oxidative stress and kinetic and seminal morphology, as well as plasma testosterone dosage. Ultrasound examinations of the testicular parenchyma and clinical evaluations of consistency and scrotal perimeter were performed with weekly interval. Testicular tissue collections for biochemical analysis of oxidative stress were performed at the end of the experiment by orchiectomy. The results indicated the occurrence of testicular degeneration induced by scrotal insulation, as demonstrated by the reduction of the scrotal perimeter and increase in testicular flaccidity immediately after insult, as well as the late increase of hyperechoic points in the parenchyma by ultrasonography and reduction of motility in the 10th week. Treatment with γ-oryzanol reduced ROS levels in the testis, increased FRAP by the 10th week, increased TBARS levels, maintained a higher number of intact spermatozoa at 3 week, but increased total defects from week 5 onwards. Although γ-oryzanol showed protection in part in the oxidative parameters evaluated in the semen and testis, this therapy did not improve other

parameters studied. In addition, supplementation with γ-oryzanol caused a higher number of total morphological abnormalities in semen. The present study shares unpublished information on the use of γ-oryzanol oral in rams with testicular degeneration, in the intention of therapies for this pathology so important in the system of production and that still does not have established treatment.

Key words: γ-oryzanol; testicular degeneration; scrotal insulation; oxidative stress; rams

1. Introduction

Testicular degeneration is considered to be one of the most common causes of reduced fertility in males of the domestic species (JAINUDEEN & HAFEZ, 1983), with more compromised animals living in unfavorable climatic conditions (GABALDI & WOLF 2002). The pathogenesis of testicular degeneration caused by elevated temperature involves an increase in cellular metabolism, which, however, is not accompanied by the supply of blood flow, establishing tissue hypoxia. This framework is responsible for the imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses in testicular cells, causing DNA damage and apoptosis (SETCHELL, 1998). The result of these mechanisms are degenerative changes of the germinal epithelium of the seminiferous tubules (ARTHUR, 1979) that affect the quality and capacity of sperm production according to the severity of the insult.

Testicular temperature in mammals is maintained at 2 to 6 ° below body temperature (KASTELIC et al, 1997), which guarantees the production of viable spermatozoa. The testicular thermoregulation occurs through the action of a set of anatomical structures such as the pampiniform plexus, tunica dartos and the scrotal sac with innumerable sweat glands on its surface (HAFEZ & HAFEZ, 2004) and the failure of some mechanism of this system is capable of affecting the fertility of the individual involved.

The treatment for testicular degeneration has not yet been fully established, and it is recommended to identify and remove the causative agent associated with the administration of a supportive therapy with antioxidants, for example (ALVARENGA & PAPA, 2009). γ-oryzanol is a nutraceutical from rice bran oil, consisting of a variety of ferulate esters (SCAVARIELLO & ARELLANO, 1998). The rice bran oil has approximately 3000mg / kg of γ-oryzanol (XU et al., 2001), which makes it the main bioactive component of the oil with numerous beneficial health effects already demonstrated (SCAVARIELLO & ARELLANO, 1998). The main constituents of γ-oryzanol are considered to be potent antioxidants, which are 10 times more efficient when compared to tocopherol and tocotrienol, which are components of vitamin E (XU et al, 2001; XU E GODBER, 2001). Phytosterols present in the composition of γ-oryzanol, such as β-sistoterol, campesterol and stigmasterol, are substances that play the role of cholesterol in living organisms, important in the synthesis of essential biomolecules such as sex hormones and some vitamins (KRITCHEVSKY, 1997). Based on this information, it is speculated that the ingestion of γ-oryzanol may benefit the production of steroidal hormones in individuals with fertility deficits. The antioxidant effect of γ-oryzanol on cadmium-induced damage in the male reproductive system of mice was demonstrated by

SPIAZZI et al. (2013), with positive results in the prevention of lipid peroxidation and recovery of superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST). Another study investigating the effects of dietary supplementation with commercial rice bran oil (Gama-Horse, HT Nutri®, Brazil) on sperm parameters of stallions was performed by ARLAS et al. (2008), where the authors suggested an increase in semen total antioxidant potential associated with improvement in membrane integrity and increased sperm motility.

Considering the oxidative process involved in tissue degeneration caused by the increase in testicular temperature and knowing the antioxidant effects of γ-oryzanol, as well as its possible influence on steroid synthesis, this study aimed to evaluate the effect of supplementation with this component of the rice in the scrotal insulation-induced injury in sheep, seeking an alternative treatment and / or prevention for testicular degeneration, a common problem in sheep breeding.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Eight male sheep, whole and mestizo, with an average age of 10 months and an average weight of 35 kg were used. The animals were kept in the sheep herd of the Federal University of Pampa – Uruguaiana, RS, Brazil, under controlled feeding in 5% of the PV, with supply of concentrate (14% PB) hay and water at will. This project is approved by the Committee of Ethics in the Use of Animals of the Federal University of Pampa under number of protocol 012/2016.

2.2 γ-Oryzanol

The γ-oryzanol used was purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) by import made by Tedia Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). For administration to the animals a suspension of γ-oryzanol in soybean oil, at a concentration of 10%, was used, providing 33 mg / MP. The dose was adapted from a commercial reference for horses (Gama-Horse®), using the metabolic weight calculation (0.75 horsepower elevated weight).

2.3 Scrotal Insulation

The scrotal insulation was induced by the placement of thermal pockets fixed to the scrotum of the animals, composed of a double plastic layer, intermediated by a layer of cotton, similar to (PEZZINI *et al*., 2006). The insulation period was 72 hours as already done by Alves et al, 2016. In order to perform the insulation the animals were kept in a closed heated enclosure, with a mean temperature of 26 ° C, since the experiment was carried out in winter with ambient temperature minimum average of the period of 10.8 ° C and maximum of 20.2 ° C (IRGA), which are below those evidenced in the reference models.

2.4 Treatment

The animals were divided in two groups, with the number of 4 sheep in each: Control Group, animals were submitted to scrotal insulation and received only soybean oil orally; Gamma Group, the animals were submitted to scrotal insulation and received 33mg / MP of γ-oryzanol in soybean oil orally once daily. The treatment had a 30-day duration, starting 7 days before insulation, during and extending 20 days after. The experiment took place in 11 weeks, with pre-insulation (1 week) and post-insulation (2 week) (Figure 1).

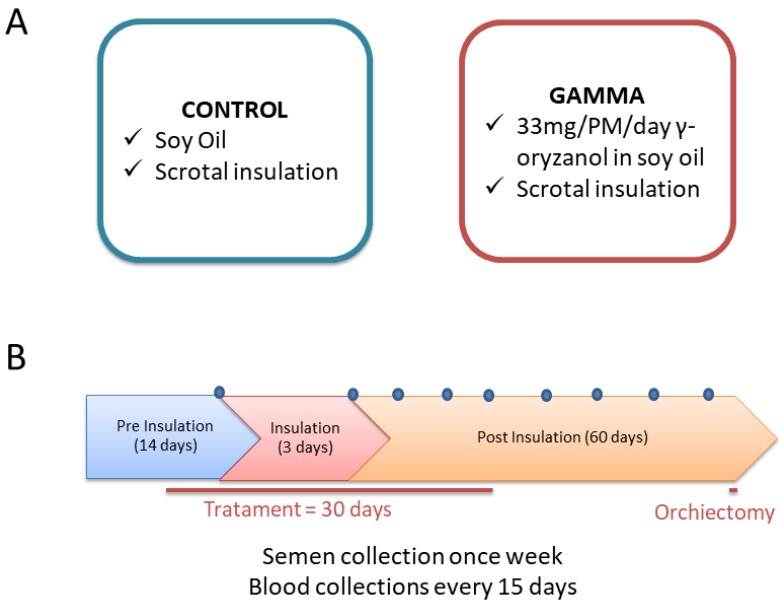

Figure 1: Experimental design: A- division of groups and specifications; B- Timeline

2.5 Collections and evaluations

2.5.1 Semen

The semen collections were performed by electroejaculator, with weekly intervals, during the 11 weeks. After collection, a sample for immediate evaluation was separated, diluted 1:20 and the rest frozen in natura for further analysis. At the time of the oxidative stress analyzes, the samples were thawed and had the concentration adjusted with addition of Tris HCl.

2.5.2 Blood

Blood samples were collected by venipuncture in the jugular vein at 14 day intervals between them. Serum was separated for further analysis.

2.5.3 Testicles

The scrotal perimeter measurement was checked weekly prior to collection, as well as the testicular consistency score (CBRA). The evaluation of the testicular parenchyma was performed by ultrasonography (MyLab Tm30 Gold, 7.5 MHz transducer) after collection of semen, also with weekly interval, as described by Gouletsou, (2016). The testicles were collected at the end of the experiment, using the surgical technique of bilateral orchiectomy according to HANDRICKSON (2010) using the anesthetic protocol according to MASSONE (2011). Three fragments of each testicle were collected, being one proximal, one medial and one distal, and homogenized in TrisHCl (50 mM, pH 7.4) to evaluate oxidative stress. Other three fragments were fixed in Boin solution to histological evaluation.

2.5.4 Temperatures

The rectal and scrotal temperatures were monitored during the insulation period every 12 hours by means of a digital thermometer with external sensor.

2.6 Evaluation of the reproductive system

2.6.1 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) as described by OHKAWA *et al*. (1979), in which malondialdehyde (MDA) reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a color complex, determined spectrophotometrically at 532nm.

2.6.2 Reactive Oxygen Species (ROS)

The levels of reactive species were determined by a spectrofluorimetric method, using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-D) (LOETCHUTINAT *et al*., 2005). The samples were incubated in the dark with 5 µl of DCF-C (1 mM). The oxidation of DCF-D to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was monitored by the reactive species. The emission of the fluorescence intensity was performed at 520 nm (with 488 nm excitation) 60 minutes after the addition of DCF-D in Shimadzu Spectrofluorimeter model RF-5301PC. The results were expressed in UF (fluorescence units).

2.6.3 Total Antioxidant Potential

The total antioxidant potential (FRAP) was determined by the semen and tissue antioxidant potential. In this assay, the antioxidants present in the sample are evaluated as reducers from Fe^{+3} to Fe^{+2}, which is chelated by 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) to form the Fe^{+2}-TPTZ with maximum absorption at 593 nm (BENZIE & STRAIN, 1996).

2.6.4 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD)

The determination of 17β-HSD steroidogenic enzyme activity was performed as described by JARABAK et al. (1962). 17β-HSD activity is measured after addition of 10 mM NAD + in a spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu, Japan) at 340 nm against a blank without NAD +. The enzymatic activity was expressed as nmol NADH / min / mg protein.

2.6.5 Hormone determination

Plasma testosterone levels were determined by the ELISA method using commercially available kits (Symbiosys).

2.6.6 Membrane Integrity

The integrity of the sperm membrane was evaluated by the protocol established by Celeghini *et al*. (2010). In addition to each 150 mL of semen diluted in TALP medium (25106 sperm / mL) were 2 mL of Hoescht 33342 (0.5 mg / mL, Vida Tecnologias), 3 mL of propidium iodide (0.5 mg / mL, Sigma-Aldrich), 50 mL of fluorescein isothiocyanate fluorescence-labeled sativum isothiocyanate (100 mg / mL, Sigma-Aldrich) and 2 mL of 5.50, 6.60 tetrachloro-1,10,3,30-tetraethylbenzimidazolylcarboza - nim iodide (JC-1, 153 mM, Life Technologies) incubated for 8 minutes at 37 ° C in the dark. Then, 200 cells were analyzed under epifluorescence microscopy (Nikon, model 80i).

2.6.7 Seminal Morphology

An aliquot of semen was fixed in formaldehyde 4%. The sperm morphology was analyzed at 1000 magnification in a stained blade with rose bengal a total of 200 cells.

2.6.8 Seminal Motility

The percentage of total motile spermatozoa evaluated by the Computer Aided Sperm Analysis (CASA) equipped with Sperm Class Analyzer (SCA) software (Version 5.1, Microptic, Barcelona, Spain).

2.7 Histological studies

The testis were dissected apart, and were immediately fixed in alcoholic Bouins solution for 24 hours, then dehydrated and finally embedded in paraffin and were sectioned serially in 5 mm thick sections. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and all sections were analyzed histopathologically (100, 200 and 400X). Microphotographs of the samples underwent computer-assisted image analysis using a computer coupled with an Olympus IX51 optical microscope equipped with a DP73 digital camera (Olympus, Japan). This apparatus enables image recording and digital analysis. The CellSens Entry software (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Germany) was used to carry out morphometric analysis.

2.8 Statistical analysis

Statistical analyzes were based on the search for significant differences between weeks 1 (pre-insulation week) and 2 (week immediately after insulation) with the other considered as well as differences between groups. The statistical analysis used was repeated measures ANOVA (IBM SPSS Statistics 20) followed by the Bonferroni multiple comparisons test for the parametric data. Non-parametric data were analyzed by the Kruskal-Wallis test to determine significant differences between groups each week and the Friedman test for significant differences between weeks. For the data with only one evaluation at the end of the experiment the analysis used was the Student's T test. The difference of significance was considered when P0.05. The data is shown as mean and standard error of the mean.

3. RESULTS

3.1 Effect of Heat Stress

3.1.1 Temperatures

The mean rectal temperature obtained in the scrotal insulation period was 38.9 ° C, while the mean scrotal temperature was 34.2 ° C, reaching the maximum temperature of 35.3 ° C in the 60 hours of thermal insulation (Figure 2).

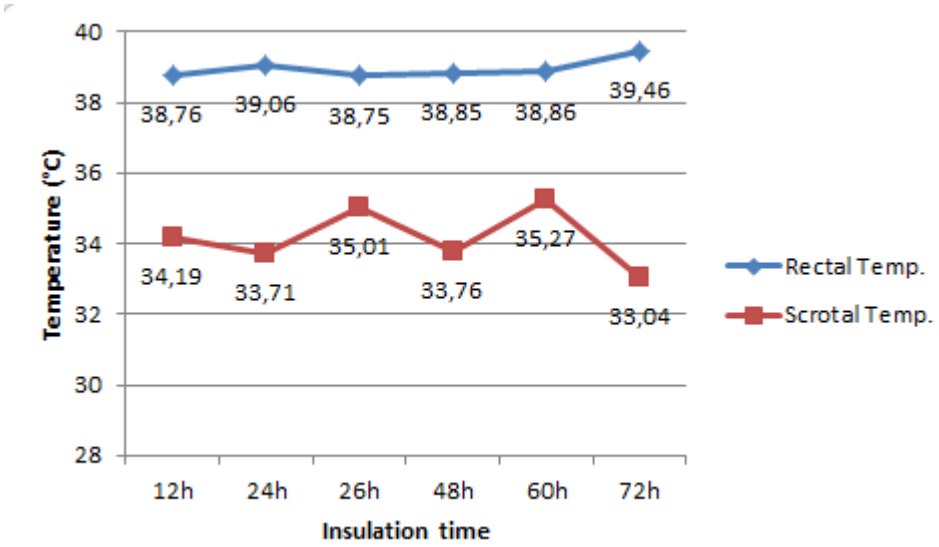

Figure 2: Rectal and scrotal temperatures during the insulation period

3.1.2 Scrotal perimeter

The exposure of rams to heat stress induced a significant reduction of the scrotal perimeter in both groups in the third and fourth week in relation to the first week (pre-insulation period) (Figure 3). In the fifth week there was no significant difference compared to the first week, indicating recovery in both groups. Differences between groups were not assessed due to heterogeneity of existing perimeters.

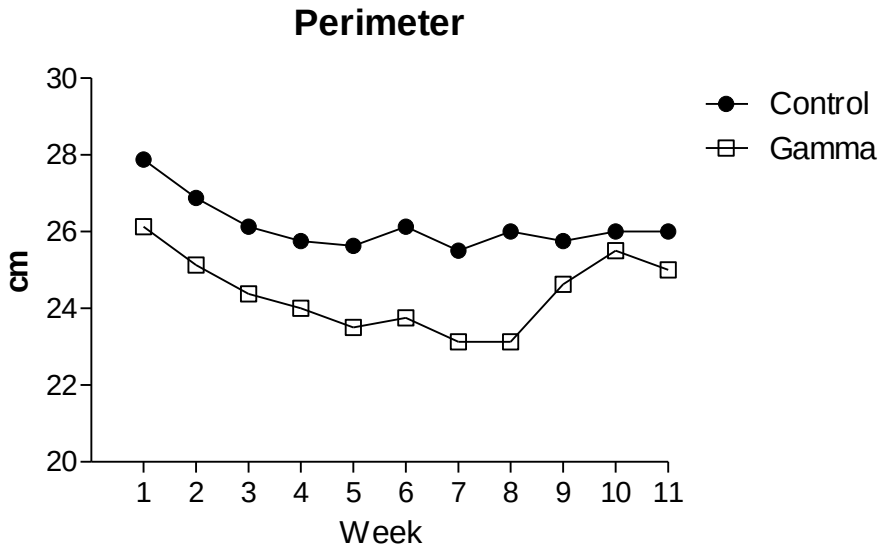

Figure 3: Scrotal perimeter (cm) following the experimental period of the Control and Gamma groups. Week 1 is representative of pre-insulation period and week 2 is post-insulation period.

3.1.2 Testicular consistency

The testicular consistency reduced significantly in the second week, which is immediately after the heat stress in both groups. Partial recovery occurred in the fifth week in the Control and Gamma groups (Table 1). There was no significant difference between groups.

3.1.3 Ultrasonography

The analysis of the ultrasound images showed a significant increase of hyperechoic points in the sixth, seventh and tenth weeks (Figure 4, B, C e D respectively) compared to the pre-insulation period (Figure 4, A). There was no significant difference between groups.

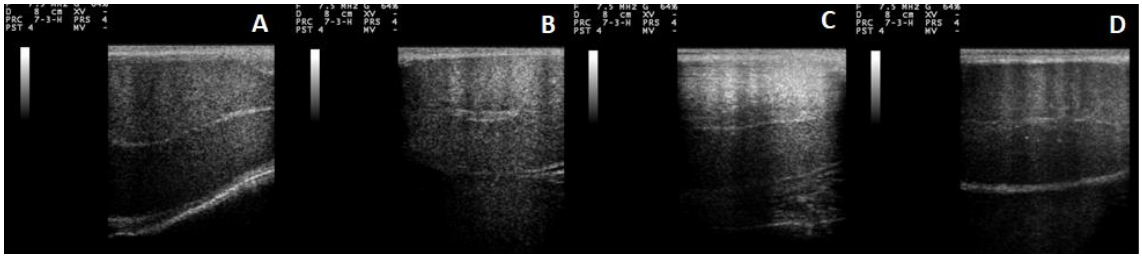

Figure 4: Middle sagittal ultrasonographic image of testis of ram. A. first week (pre-insulation). B. sixth week. C. seventh week. D. tenth week.

Table 1: Testicular consistency following experimental period evaluated weekly. To evaluation was used the score: 1-5 being 5 firm constipation (Normal) and 1 very flaccid.

Week	Control	Gamma
1	5.00 ± 0.00a	5.00 ± 0.00a
2	3.00 ± 0.82b	2.75 ± 0.96b
3	3.25 ± 0.50b	3.50 ± 0.58b
4	3.75 ± 0.50b	3.25 ± 0.96b
5	4.50 ± 0.58a	4.50 ± 1.00a
6	4.50 ± 0.58ab	4.00 ± 0.82ab
7	4.00 ± 0.82ab	3.75 ± 0.96ab
8	4.50 ± 0.58a	4.50 ± 0.58a
9	4.25 ± 0.50a	4.50 ± 0.58a
10	4.75 ± 0.50a	4.25 ± 0.50a
11	4.25 ± 0.50a	4.50 ± 0.58a

The results are expressed as media ± standard deviation. a, b, Values without common letters differ ($p<0.05$)

3.1.4 Histology

In the experimental groups, the spermatogenic cells in the germinal epithelium were separated from each other by numerous empty spaces and showed disorganization of spermatogenic epithelium. Mature spermatozoa were rarely present and a large number of germ cells were found in the lumen of seminiferous tubules (Fig. 5). There was no significant difference between groups.

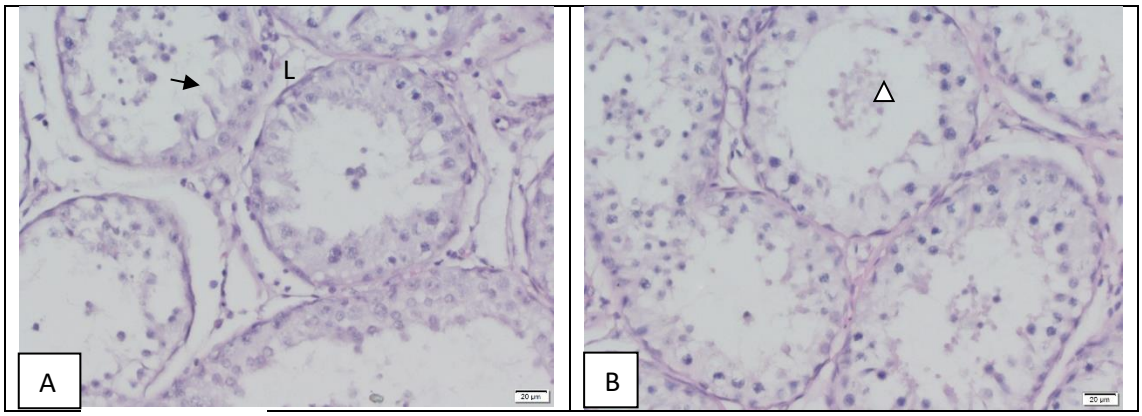

Figure 5: Photomicrograph of seminiferous tubules from exposed ram: [A] Disorganized seminiferous tubules, [B] Note intercellular spaces and ( ), Exfoliated germ cells . (400x) HE staining.

3.2 Oxidative parameters in testicle

At the final of experimental period, animals were orchiectomized and testis were used to oxidative stress analysis. The animals treated with γ-oryzanol showed a significant reduction (about 26 %) in the reactive oxygen species (ROS) levels on the testis compared to the control group (Figure 6). The total antioxidant capacity (FRAP assay) of the Gamma group decreased in relation to the control group. Regarding the lipid peroxidation level on the testis, there was no significant difference between the groups.

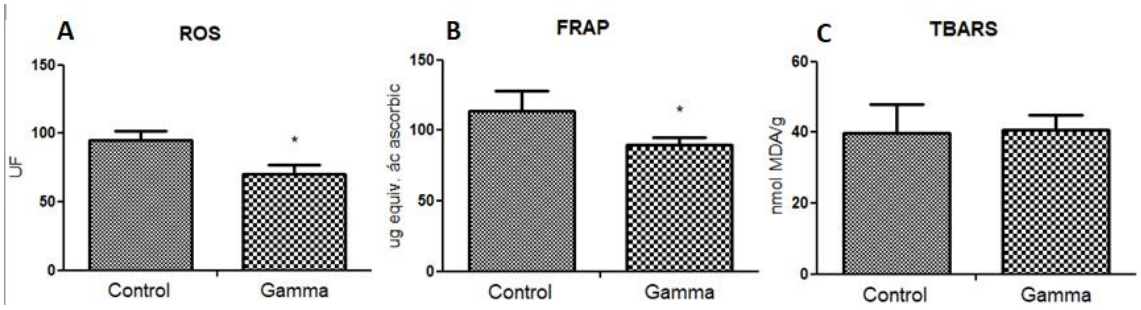

Figure 6: A- Reactive oxygen species (ROS), B- Ferric reducing potential (FRAP) and, C- Lipid peroxidation (TBARS). * indicate statistical difference (P<0,05) by Student`s t-test between Control (n=4) and Gamma (n=4) groups.

3.3 17 β-Hidroxisteroid dehydrogenase

The evaluation of 17 β-HSD activity on testis showed no difference between the control group and the group treated with γ-oryzanol (Figure 7).

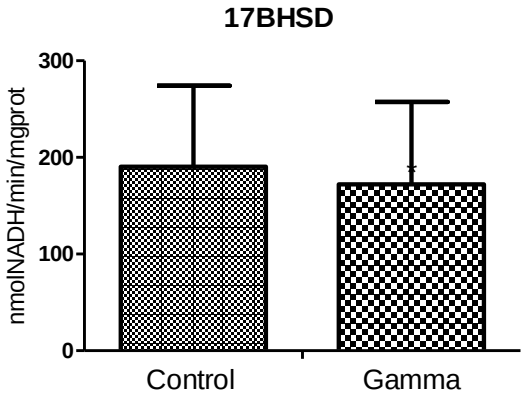

Figure 7: 17β Hydroxy-steroid dehydrogenase enzyme activity in testicular tissue. Statistical analysis used was student's t-test between Control (n = 4) and Gamma (n = 4) groups

3.4 Testosterone

Plasma levels of testosterone did not differ significantly between groups and did not show a significant influence of the insulation and time (Figure 8). There was a significant discrepancy between the values obtained, with variability between the animals and the same animal at different times, but without treatment influence.

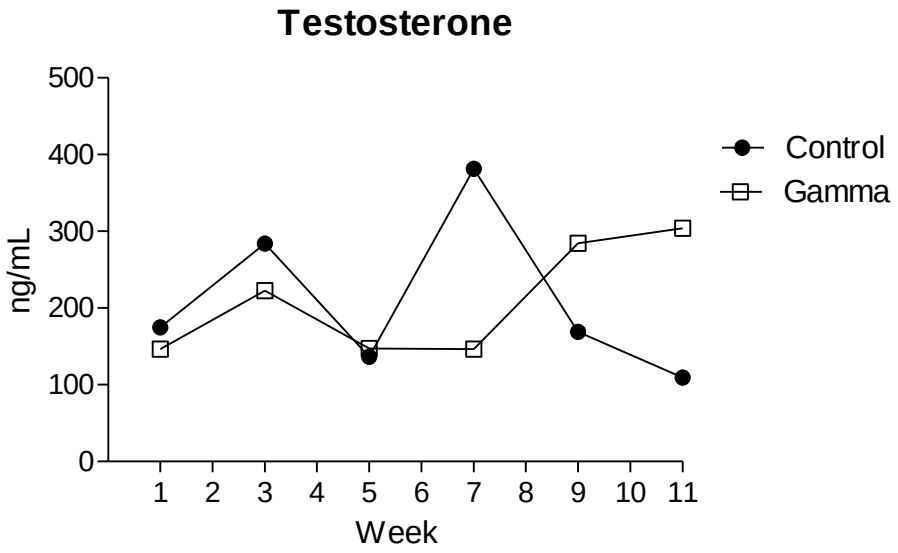

Figure 8: Plasma testosterone levels obtained every 14 days.

3.3 Semen evaluation

3.3.1- Sperm motility

At week 10, there was a trend (p=0.054) for a significant reduction in the total motility in relation to the first week (pre-insulation). Significant difference between Control and Gamma groups was observed in the week 1, which animals that received gamma-oryzanol presented these parameters more elevated (Figure 9).

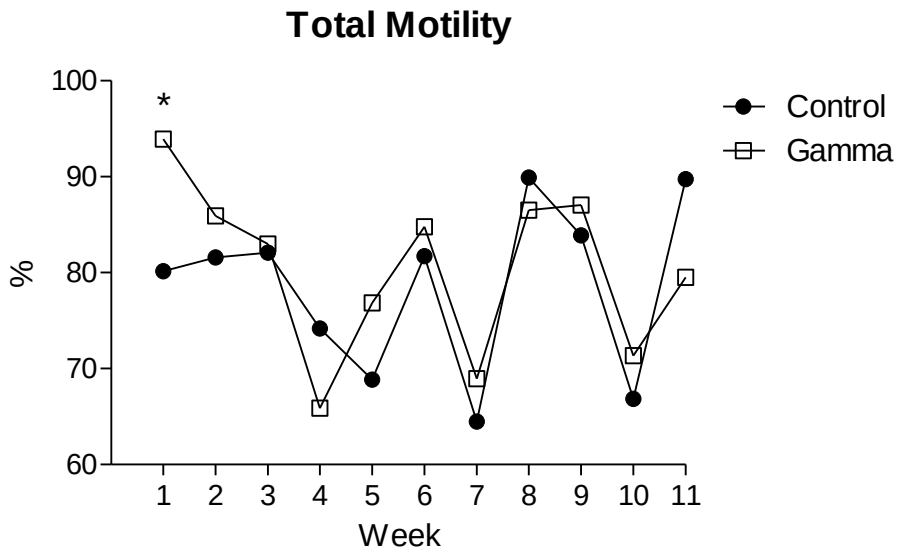

Figure 9: Mean of total motility expressed in% over weeks. Week 1 represents pre-isolation period and week 2 immediately after isolation (*) significant difference between groups. Level of significance p> 0.05

3.3.2- Sperm morphology

The percentage of total defects was significantly higher in the Gamma group than Control group from the fifth week until the end of eleventh week (Figure 10).

3.3.3- Sperm membrane integrity

The sperm membrane integrity analysis demonstrated that in the third week, animals that received gamma-oryzanol treatment had a number of intact spermatozoa significantly larger (p=0.027) than the control group. However, in the fourth week, animals form Gamma group had a reduction (p=0.040) on membrane integrity parameter in relation to the first week (Figure 11).

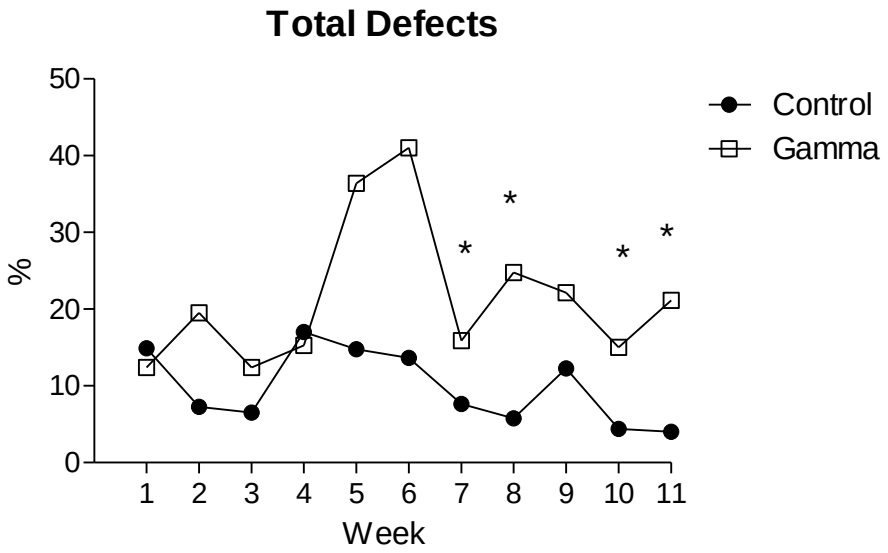

Figure 10: Mean of total defects expressed in% over weeks. Week 1 represents preinsulation period and week 2 period immediately after isolation (*) significant difference between groups. Level of significance p> 0.05

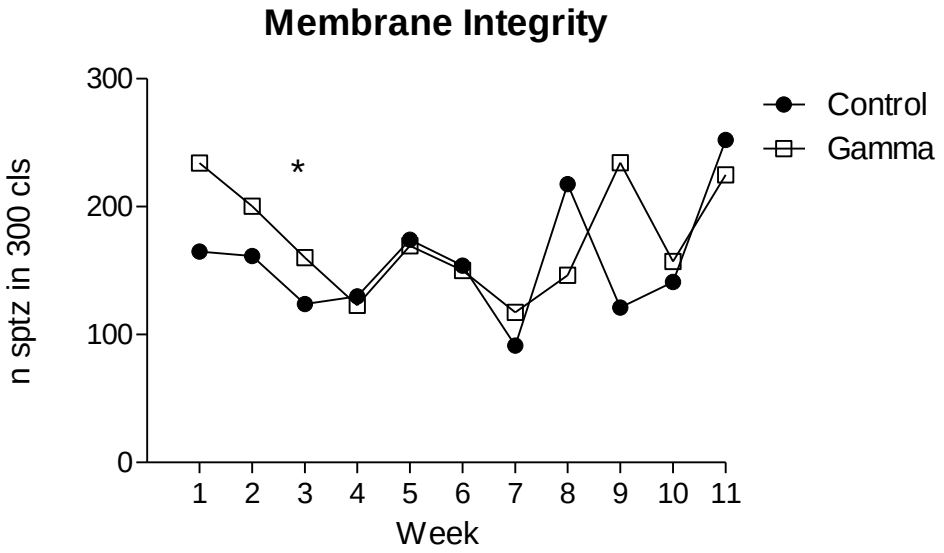

Figure 11: Membrane integrity means in number of spermatozoa in 300 cells, over the weeks. Week 1 represents pre-isolation period and week 2 period immediately after isolation (*) significant difference between groups. Level of significance p> 0.05

3.3.4- Sperm oxidative stress parameters

We evaluated the levels of ROS, total antioxidant capacity (FRAP) and lipid peroxidation (TBARS) in the semen of each weekly sample (Figure 12). We observed that ROS levels were significantly increased (p = 0.034) at the ninth week in the Gamma group,

while the TBARS levels increased in the second week (post-insulation period) in the Control group (p = 0.008), with the following reduction, already in the Gamma group, lipid peroxidation had no significant increase (p = 0.059) immediately after isolation, only reduction at 4 week (p = 0.011). At 11 week both groups had an increase in TBARS. The total antioxidant capacity was significantly (p = 0.012) reduced in the second week in the Control group whereas in the Gamma group this reduction was significant (p = 0.027) at week 3. In the tenth week, we observed a significant increase in this parameter in both groups, as well as a significant difference between groups, with the Gamma group having a higher total antioxidant capacity than the Control group (p = 0.013).

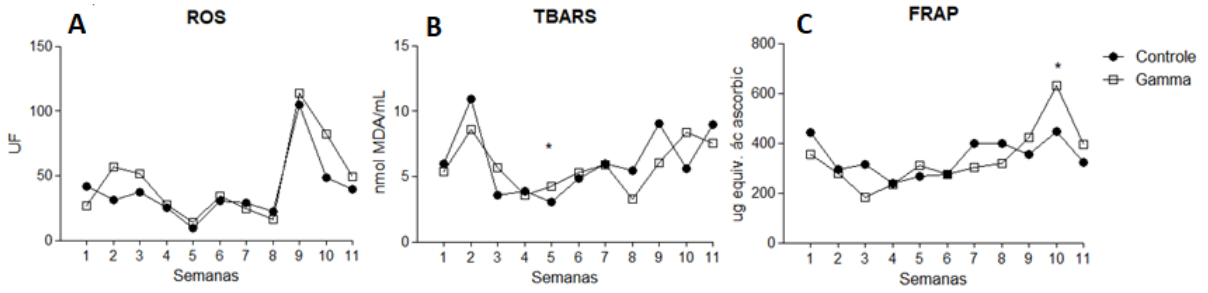

Figure 12: A. Reactive Oxygen Species, B. Lipid Peroxidation and C. Total Antioxidant Capacity. Averages over the weeks. Week 1 represents pre insulation period and week 2 period immediately after insulation. (*) significant difference between groups. Level of significance (P <0.05).

4. Discussion

In the present study, we verified that heat stress induces a significant damage on the rams testis. We verified the testicular characteristics following 11 weeks. Heat stress caused a significant change on the testis consistency immediately post-insulation (week 2) as well as an alteration on scrotal perimeter at the third week. These changes were not verified at the fifth week, demonstrating a possible recovery of the tissue. The studied therapy, γ-oryzanol, was not able to protect effectively against heat stress damage in relation that parameters.

The mean maximum temperature reached with scrotal isolation was 35.3°C, lower than the temperature reached by Ibrahim *et al* (2001) of 38°C and higher than the Alves *et al* (2016) measurement of 32.26°C immediately after withdrawal of scrotal isolation. The scrotal temperature of sheep, both normal and pathological, is still not well established and changes according to the method of measurement, varying from 31° to 36°C. Spermatogenesis should occur at a maximum temperature of 2°C below body temperature (Thonneau *et al*, 1998), ensuring quality in the production, differentiation and maturation of viable spermatozoa. The

smallest mean difference between the testicular temperature and the rectal temperature reached in this study was 3.5°C, but in some individuals this difference was between 2 and 3°C. Alves *et al* (2016) showed that a difference of 5.92°C was able to cause changes in the spermatozoa of sheep subjected to scrotal insulation.

Scrotal insulation is a non-invasive method that acts primarily to interfere with superficial scrotal functions, preventing heat loss. High temperatures increase the cellular metabolism so that the blood supply does not increase in the same proportion, thus establishing a framework of cellular hypoxia responsible for generating cellular damages (Setchell, 1998). The effect of heat stress induced by scrotal insulation was noted since it caused a decrease in the scrotal perimeter, changes in the testicular consistency and increase of hyperechoic points in the organ parenchyma in both groups. The reduction of the scrotal perimeter can be attributed to the loss of germ cells that in the process of heat stress end up suffering apoptosis. In fact, the degree of testicular consistency is affected by the reduction of germ cells, these cells are more vulnerable to thermal stress due to their high mitotic activity (Shiraishi *et al*, 2012).

The increase in temperature in addition to causing damage to germ cells still alters sperm maturation by denaturing the cytoplasmic bonds necessary to maintain the fluid composition of the tail of the epididymis in rats and humans (Lagare *et al*., 2004; Rockett *et al*., 2010). The degree of impact on seminal quality and cells of the seminiferous tubulus varies according to the time of exposure to heat stress, which is directly related to the recovery of testicular function (Hansen, 2009; Kastelic, 1999; Brito, 2004). In relation to the recovery of testicular morphometric parameters over time, in the present study, the recovery occurred in the fifth week after insulation, similarly to that found by Junior et al (2015). These authors compared the response of different sheep races to scrotal insulation and verified that the Dorper and Hampshire Down races had a later recovery. Although we observed a consistency recovery in the testis from the fifth week, histological alterations were detected 10 weeks after heat stress whereas there was not significant difference in the epithelium heigh and in the seminiferous tubule diameter.

Ultrasound examination of rams testicles proved to be a valuable, noninvasive technique for pathological evaluation and could provide substantial information on testicular functions and structures (Powe *et al* 1988). In the present study, ultrasonographic evaluation revealed the increase of hyperechoic points in the testicular parenchyma of the sheep in a clearer and significant way at 10 week, being a late observation of the tissue lesions caused by the increase in testicular temperature. In places where there is loss of cells in the seminiferous

tubules there is calcification as a form of tissue repair, making these points hyperechoic before the ultrasonographic image, this is proven by Ahmandi and Noakes (1995) who found in goat testicles hyperechoic areas in the ultrasound images and calcification of seminiferous tubules was noted when submitted to histopathology. Knowing that spermatogenesis in sheep can take from 42 to 53 days (Courot *et al*, 1970) and epididymal transit of 13 to 15 days (Swietra, 1968) testicular changes identified by ultrasonography should be associated with future sperm alterations (Arteaga *et al*, 2005). Morphometric characteristics such as perimeter and scrotal consistency, among others, present a constant reduction that may be associated with ultrasound changes (Souza, 2010). In the first week after insulation, in some animals it was difficult to identify the testicular mediastinum in the ultrasound image because it adopted a hypoechoic pattern, as observed by Souza, 2010, which attributes an influence of flaccid testicular consistency, making it difficult to acquire the image by ultrasound.

The testis has mechanisms of tolerance to heat stress involving enzymatic and non-enzymatic antioxidants that act to protect the germ cells. Reactive oxygen species are naturally produced during testicular cell metabolism and are involved in important fertility functions such as sperm capacitation, acrosome reaction, hyperactivation and sperm-oocyte fusion (Agarwal *et al*, Shiraishi *et al*, 2012). When the testicular temperature rises, there is an increase in the generation of reactive species responsible for causing damage to the testicular cells, influencing fertility. There are two possible explanations for the involvement of ROS in the response to heat stress, one of which would be the oxidation of cellular components such as DNA and lipids that result in cellular apoptosis, and the second would be indirect, triggering apoptosis (Ishii *et al*., 2005; Shiraishi *et al*., 2010). The results of evaluations for oxidative stress of the testis demonstrated the effect of the treatment with γ-oryzanol on this parameter in the tissue. It is possible that the substance acted by reducing the reactive species of the treated group and as a consequence there was a reduction in the total antioxidant capacity of this group, since its increase would not be necessary as an alternative to the balance, since the formation of ROS is always accompanied by a positive response of antioxidant enzymes in order to protect the tissue against damage caused by oxidative stress (Kanturek *et al*, 2017).

The thiobarbituric acid reactive species (TBARS) technique in spectrophotometry is widely used to request oxidative stress indirectly (Nichi *et al*, 2006). Some authors have determined the significant increase in the concentration of MDA in testicles under oxidative stress condition (Abarikwu *et al*. Jelodar *et al*., 2010). In the present study there was no significant difference in the concentration of MDA between the groups, not meaning that

there was no increase in lipid peroxidation with thermal insult, since both groups suffered insulation, Li *et al*. (2014) also observed an increase in MDA in testicles of rats exposed to warming, but 7 days after the insult the values were already at normal levels, as the testicular evaluation was performed 10 weeks after the insult it is likely that the values had already stabilized.

17β-HSD is an important enzyme that participates in steroidogenesis that modulates the biological potency of estrogens and androgens as well as the synthesis of estradiol and testosterone (Mindnich, 2004). In the present study there was no significant difference between the groups in the values found for 17β-HSD in testicular tissue 60 days after scrotal isolation, as well as there was no significance in the values obtained for serum testosterone dosage. According to Perez-Crespo *et al*. (2008), testicular degeneration usually does not affect male libido, that is, hormone production. A study performed in rats with a single increase in the scrotal temperature at 43 ° C for 30 min had no significant change in levels of plasminogenics hormone and testosterone 3, 7 and 14 days after treatment (Collins *et al*., 1978). The direct exposure of developing lambs to high temperatures during the off-season impaired testicular germinative cells, but did not significantly affect testicular endocrine functions (Rasoali Aria *et al*, 2010).

Regarding the results of semen oxidative stress as a consequence of the heat-induced oxidative damage, a significant increase of lipid peroxidation occurred in the Control group, which did not occur in the Gamma group, showing a protection of the compound on this parameter immediately after the scrotal insulation that still has more benefit since there was a significant reduction of TBARS at the 4 week. The total antioxidant capacity was reduced immediately after insulation and may be related to the consumption of antioxidants in order to prevent the damages seen in the lipid peroxidation levels. ROS levels increase at 9 week, TBARS levels at 11 week, and FRAP at 10 week, showing a late response to oxidative damage, which may be related to the time required for the spermatogenesis process, which takes 42 to 53 days in the sheep (COUROT *et al*., 1970), with the transit time in the epididymis of 13 to 15 days. Thus the spermatic production started after the scrotal insulation in the presence of cellular damage, is being eliminated from 9 week of the experiment.

In a study carried out by Mucciolo *et al* 1974, scrotal insulation for 4 and 8 days was able to induce disturbances in the spermatogenesis as an increase in the number of morphological abnormalities and drop in concentration and motility. In the motile research, there was no significant decrease in motility induced by scrotal insulation, only a possible

effect of γ-oryzanol improving motility in the preinsulation period. Arlas *et al*., 2008, obtained an increase in sperm concentration, total motility and TRAP with rice oil containing γ-oryzanol supplementation in equine, showing that the compound may have an effect enhancing motility but not protecting against damage caused by scrotal insulation.

Membrane integrity is an important parameter capable of predicting sperm fertilization capacity in advance (Chacón, 2001). In the present study, treatment with γ-oryzanol was able to maintain a greater number of spermatozoa with intact membrane than the control group at 3 week, but did not protect against the reduction of this parameter, as well as in the recovery. Rats with testicular degeneration induced by scrotal isolation showed great variability of 1 to 10 weeks between breeds in the time of recovery of membrane integrity (Sousa, 2010) proving the individual interference of response in this parameter.

Many studies have shown that seminal fertility decreases progressively as morphological abnormalities increase (Saacke et al, 2000). γ-oryzanol appeared somewhat toxic to this parameter, since the treated group had an increase in total defects from week 5, being significantly greater than the control from week 7, at approximately 40 days, time in which sperm produced after thermal insult are being released in the ejaculate, Barth and Bauan (1994) state that the cells present in the seminiferous tubules have different sensitivities at high temperatures, so that the spermatids and spermatocytes are particularly sensitive, while spermatogonia and spermatozoa that are in the epididymis are more resistant which explains the late appearance of these defects.

In conclusion, this study showed the heat stress effect on testis and semen of rams, demonstrating changes occurred following 11 weeks. Although γ-oryzanol had showed a protection, at least in part, in the oxidative parameters evaluated in semen and testis, this therapy was not able to ameliorating other parameters studied. Thus, more studies are needed in order to understand the mechanism of testicular damage induced by heat stress as well as the use of γ-oryzanol supplementation or other compounds that could had beneficial effects.

Referências

ABARIKWU, S. O., ADESIYAN, A.C.. OYELOJA, T. O., OYEYEMI, M. O. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. **Arch Environ Contam. Toxicol.** 58: 874-882, 2010.

AGARWAL, A;. HAMADA, A.;ESTEVES, S. C. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. **Nat. Ver. Erol**. 9, 678-690, 2012.

AHMAD, N.; NOAKES, D. E.. A clinical and ultrasonographic study of inducedtesticular and epididymal lesions in goats and a ram. **Animal Reproduction Science**. 39, 35-48, 1995.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos ebservados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 204-209, 2009.

ALVES, M. P. R.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; et al. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood sérum concentration. **Theriogenology**, 86: 795-805, 2016.

ARLAS, T. R.; PEDERZOLLI, C. D.; TERRACIANO, P. B.; TREIN, C. R.; BUSTMANTE-FILHO, I. C.; CASTRO, F. S.; MATTOS, R. C. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. **Animal Reproduction Science**. V. 107, n. 3-4, p. 206, 2008.

ARTEAGA, A. A; BARTH, A. D; BRITO, L. F. C. Relationship between semen quality and pixel–intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls **Theriogenology** 64, 408–415, 2005

ARTHUR, G.H. Anomalias Reprodutivas dos Machos. In: **Reprodução e Obstetricia em Veterinária** 4a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap.32, p.500-40, 1979.

BARTH, A.D.; BOWMAN, P.A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v.35, p.93-102, 1994.

BENZIE, I. F., STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as mensure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem.** 239: 70-76, 1996.

BRITO, L. F. C., SILVA, A. E. D. F., BARBOSA R. T., UNANIAN, M. M., KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science** 79:1-15, 2003.

CBRA, 2013. Comissão de andrologia do colégio Brasileiro animal. In: Manual Para Exame Andrológico e Avaliac¸ ão De Sêmen Animal, 3nd ed. Belo Horizonte, MG, BR.

CELEGHINI, E. C., NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A. F.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrossomal and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorecent probes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec,** 62, 536-543, 2010.

CELEGHINI, E. C., NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A. F.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrossomal and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorecent probes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec,** 62, 536-543, 2010.

CHACÓN, J., 2001. Assessement of sperm morphology in zebu bulls under field conditions in the tropics. **Reprod. Domest. Anim**. 36, 91–99.

COLLINS, P. M., COLLINS, W. P., MCNEILLY, A. S., TSANG, W. N. Plasma FSH, LH and testosterone levels in the male rat during degeneration of the germinal epithelium caused by severe heat tratament or ligation of the vasa efferentia. **J. Reprod. Fert**. 54: 285-291, 1978.

COUROT, M., HOCHEREAU de-REVIERS, M.T., ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (Eds.) **The testis.** New York: Academic Press. p.339. 1970.

GABALDI, S. H; WOLF, A. Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências agrárias e da saúde**. v. 2, n. 2, Andradina-SP, p 66-70, 2002.

GOULESTSOU, P. G. Ultrassonographic examination of the scrotal contentes in rams. **Small Ruminat Reserch**, 2016.

HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª ed, São Paulo, Manole, cap 1, 2004.

HANSEN PJ (2009) Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 364: 3341-3350, 2009

HENDRICSON, D. A. Cirurgia Urogenital em Bovinos. In: HENDRICKSON, D. A. **Técnicas Corúrgicas em Grandes Animais**. Guanabara, 2010. cap. 14, p.239-241.

IBRAHIM, N. M.; ROMANO, J. E.; TROEDSSON, M. H.; CRABO, B. G. Effect os scrotal insulation on clusterin-positive cells in rams sêmen and their relatioship to sperm quality. **J. Androl, 22: 863-877, 2001.**

ISHII, T.; MATSUKI, S.; IUCHI, Y;. OKADA, F.; TOYOSAK, S.; TOMITA, Y.; IKEDA, Y.; FUGII, J. Accelered impairment of spermatogenic cells in SOD1- KnocKout mice under heat stress. **Free Radic. Res**. 39, 697-705, 2005.

JAINUDEEN, M.R. & HAFEZ, E.S.E. Distúrbios Reprodutivos nos Machos. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodurção Animal** 4a ed. São Paulo, Manole, cap.23, p.545-69, 1983.

JARABAK, J.; ADAMS, J. A.; WILLIAMS-ASHMAN, H. G.; TALALAY, P. Purification of a 17β hidroxysteroid dehydrogenase of human placenta and studies os its transhydrogenase function. **Journal. Biologic Chemical**., 237, p. 345-357, 1962.

JELODAR G., NAZIFI, S., AKBARI, A. The prophylactic effect of vitamin C on induced oxidative stress in rat testis fallowing exposure to 900 MHz radio frequency wave generated by a BTS antenna model. **Electromag. Biol. Med**. 32: 409-416, 2013.

JÚNIOR CCA, LUCCI CM, PERIPOLLI V, SILVA FA, MENEZES AM, MORAIS SRL, ARAÚJO MS, RIBEIRO LMCS, MATTOS RC, MCMANUS E. Effects of testicle insulation on seminal traits in rams: Preliminary study. **Small Rumin, Reserch**, 2015, 130: 157-165.

KANTUREK, S. J., KONTUREK, P. C., BRZOZOWSKI, T., BUBENIK, G. A. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. **J. Physiol. Pharmacol**. 58: 23-52, 2007

KASTELIC, J.P.; COOK R. B.; COULTER G.H.; SAACKER R.G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v.45, p.935-942, 1996.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-61, 1997.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-61, 1997.

KRITCHEVSKY, D. Phytosterols. In Bonfield Kristchevsky (Ed.). **Dietary fiber in health and disease** (Vol. 427, pp. 235–242). New York: Plenum Press, 1997.
LI, Y., WANG, F., WANG, F. LI, C., Scrotal heat induced the NrE2 driven antioxidant response during oxidative stress and apoptosis in the mouse testis. **Acta Hitochemical**. 116: 883-890, 2014.

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

MASSONE, F. Técnicas Anestésicas em Bovinos. **Anestesiologia Veterinária: farmacologia e técnica - textos e atlas**. Guanabara, 2011. cap. 16.

MINDNICH, R., MOLLER, G., and ADNANSKI, J. The role of 17 beta-hidroxysteroid dehydrohenases. **Mol. Cell**. Endocrinol. 218: 7-20, 2004.

MUCCIOLO, R.G.; BARBABÉ, R.C.; BARNABÉ, V.H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos à degeneração testicular experimental. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.11, p.155-177, 1974.

NICHI M, BOLS PE, ZÜGE RM, BARNABE VH, GOOVAERTS IG, et al. Seasonal variation in semen quality in Bos indicus and Bos taurus bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology** 66: 822-828, 2006.

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

PEREZ-CRESPO, M ; PINTADO, B ; GUTERREZ-ADÁN, A.Scrotal heat stress effects on psperm viability, sperm DNA integrity, and the effpring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v.75,p40-47,jan. 2008.

PEZZINI, T. G. et al. Seminal characteristics of Curraleiro and Holstein bulls submitted to scrotal insulation. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 863-868, May 2006. ISSN 0100-204X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240555700020 >.

POWE, T. A. CARTEE, R. E., CARSON, R. WOLFE, D. HUDSON, R. B-mode ultrasonography of testicular pathology in the bull. **Agri. Pratice**, 43-45, 1988.

RASSOLI, A., JALALI, MT,; NOURI, M.; MOHAMMADION, B.; BARITA, F. Effects of chronic heat stress on testicular structures, sérum, testosterone and cortisol concentrations in developing lambs. **Animal Reprod. Scie**, 2010, 177: 55-59.

ROCKETT, J. C., MAPP, F. L., GARGES, J. B. et al. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression and fertility in adult male mice. **Biol. Reprodu**. 65: 229-239, 2001.

SAACKE, R. G. DALTON, J. C. NADIR, S. NEBEL, R. L. BAME, J. H. Relatonship of seminal traits and insemination to fertilization rate and embryo quality. **Anim. Reprod. Sc**. 60: 663-677, 2000.

SCAVARIELLO, E. M.; ARELLANO, D. B. y-Oryzanol: un importante componente del aceite de salvado de arroz. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 48, p. 7-12, 1998.

SETCHELL B. P. The Parkes Lecture. Heat and the testicles. **Jornal Reproduction Fertility**;114:179–94, 1998.

SHIRAISHI, K., MATSUYAMA, H., TAKIHARA, H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. **Int. J. Urol**. 19, 538–550, 2012.

SHIRAISHI, K., TAKIHARA, H., MATSUYAMA, H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. **World J. Urol**. 28, 359–364, 2010.

SOUZA CE, ARAUJO AA, OLIVEIRA JT, LIMA SOUZA AC, NEIVA JN, MOURA AA. Reproductive development of Santa Ines rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reprod Domest Anim** 2010;45:644–53.

SPIAZZI, C. C.; et al. y-Oryzanol protects against acute cádmium-induced oxidative damage in mice testes. **Food and Chemical Toxicology**. v. 55, p. 526-532, 2013.

SWIERSTRA, E.E. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar. Duration of spermatozoan transit through the epididymis. Anat. Rec., 61:171-185.

THONNEAU, P., BUJAN, L., MULTIGNER, L., MIEUSSET, R., 1998. Occupational heat exposure and male fertility: a review. **Hum. Reprod**. 13, 2122–2125.

XU, Z., GODBER, J., 2001. Antioxidant activities of major components of c-oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. **Journal American Oil Chemists Society**. 78, 645–649.

XU, Z., HUA, N., GODBER, J., 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and c-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,20-Azobis(2 methylpropionamidine) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 2077–2081.

CONCLUSÃO

O estudo mostrou a eficácia do método de insulação escrotal através da fixação de bolsas térmicas durante 72h no escroto de carneiros, pois foi capaz de causar alterações na consistência testicular, perímetro escrotal e alterações em nível de parênquima testicular observadas por meio de ultrassonografia, além de alterações tardias, na 11ª semana nas avaliações seminais. O tratamento com γ-oryzanol na dose e condição utilizada apesar de proteger em parte alguns parâmetros, principalmente de estresse oxidativo, não foi eficaz em proteger ou acelerar a recuperação nas variáveis testadas, sendo necessário mais estudos, a fim de entender mecanismo de ação, período e dose de suplementação.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A;. HAMADA, A.;ESTEVES, S. C. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. **Nat. Ver. Erol**. 9, 678-690, 2012.

AHOTUPA, M., HUHTANIEMI, I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. **Biol. Reprod**. 46, 1114–1118, 1992.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 204-209, 2009.

ARLAS, T. R.; PEDERZOLLI, C. D.; TERRACIANO, P. B.; TREIN, C. R.; BUSTMANTE-FILHO, I. C.; CASTRO, F. S.; MATTOS, R. C. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. **Animal Reproduction Science**. V. 107, n. 3-4, p. 206, 2008.

ARTHUR, G.H. Anomalias Reprodutivas dos Machos. In: **Reprodução e Obstetricia em Veterinária** 4a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap.32, p.500-40, 1979.

BARBOSA, R. T.; MACHADO R.; BERGAMASCHI, M. M. C. M. A importância do exame andrológico em bovinos. Arcular técnica 41. São Carlos. **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2005.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial potential and membrane lipid peroxidation. **Journal Androl.**, v.21, p.895-902, 2000.

BEZERRA, F. S. B.; GARCIA H. A.; ALVES, H. M. et al. *Trypanosoma vivax* no tecido testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.21, 575-582. 2008

BLASQUEZ, N.B., MALLARD, G.F., WEDD, S.R. Sweat glands of the scrotum of the bull. J**ournal of Reproduction and Fertility**, 83:673-677. 1988.

BRITO, L. F. C., SILVA, A. E. D. F., BARBOSA R. T., UNANIAN, M. M., KASTELIC, J. P.. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science,** 79:1-15. 2003.

CARDILII, D. J.; TONIOLLO, G. H.; PASTORE, A. A. et al. Padrão ultrassonográfico do parênquima, mediastino e túnicas testiculares em bovinos jovens da raça Nelore. **Ciência Animal Brasileira**. v.11, n. 4, 899-905, 2010.

FREI, B. Molecular and biological mechanisms of antioxidante action. **Faseb. J**. v13, p. 963-964, 1999.

FUJIWARA, S.; SAKURAI, S.; SUGIMOTO, I.; AWATA, N. Absorption and metabolism of gamma-oryzanol in rats. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 645–652, 1983.

GABALDI, S. H; WOLF, A. Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências agrárias e da saúde**. v. 2, n. 2, Andradina-SP, p 66-70, 2002.

GONZAGA, I. V. F.; TAMAS, W. T.; ETCHICHURY, M.; GOBESSO, A. A. O. Qualidade espermática e perfil plasmático de lipídeos em garanhões suplementados com óleo de arroz semi-refinado com alto teor de gama-orizanol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v. 49, p. 215-220, 2012.

HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª ed, São Paulo, Manole, cap 1, 2004.

HICKS, J. J. Bioquimica México: MC Graw- Hill, 900p, 2001

HORN, M. M.; MORAES, J. C. F.; GALINA, C. S. Qualidade do sêmen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus-Ibagé em frente a degeneração testicular experimental induzida por dexametasona. **Ciência Rural,** v. 29, n.3, 523-526.1999.

IKEDA, M., KODAMA, H., FUKUDA, J., SHIMIZU, Y., MURATA, M., KUMAGAI, J., TANAKA, T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. **Biol. Reprod**. 61, 393–399, 1990.

ISHII, T.; MATSUKI, S.; IUCHI, Y;. OKADA, F.; TOYOSAK, S.; TOMITA, Y.; IKEDA, Y.; FUGII, J. Accelered impairment of spermatogenic cells in SOD1- KnocKout mice under heat stress. **Free Radic. Res**. 39, 697-705, 2005.

JAINUDEEN, M.R. & HAFEZ, E.S.E. Distúrbios Reprodutivos nos Machos. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodurção Animal** 4a ed. São Paulo, Manole, cap.23, p.545-69, 1983.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gammaoryzanol:
Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils.
International Journal of Pharmaceutics, v. 299, p. 146-154, 2005.

KASTELIC, J. P.Understanding and evalisating bovine testes. **Theriogenology**. V.81, n.1, 12-23, 2014.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-61, 1997.

KRITCHEVSKY, D. Phytosterols. In Bonfield Kristchevsky (Ed.). **Dietary fiber in health and disease** (Vol. 427, pp. 235–242). New York: Plenum Press, 1997.

LICHENSTEIN, A. H.; AUSMAN, L. M.; CARRASCO, W.; GUALTIERI, L. J.; JENNER, J. L.; ORDOVAS, J. M.; NICOLOSI, R. J.; GOLDIN, B. R.; SCHAEFER, E. J. Rice bran oil consumption and plasma lipid levels in moderately hypercholesterolemic humans. **Arteriosclerosis and Thrombosis,** v. 14, p. 549-556, 1994.

LIVERA, G ; POULLER-FABRE, V ; PAIRAULT, C ;LEVACHER, C ; HABERT, R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. **Reproduction**, v. 124, p173-180, ago 2002.

MOULE, G.R.; WAITES, G.M.H. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Grã-Bretanha, v.5, p.433-446, 1963.

NASCIMENTO, E. F. et al. Sistema Reprodutivo Masculino. In: Santos R. L.; Alessi, A. C. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, p.855-880, 2010.

NASCIMENTO E.F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. P. 137, 2003.

NUNES, A. S.Morfologia do funículo espermático e dos escrotos em caprinos nativos do Estado do Piauí em diferentes configurações escrotai. Teresina, p.57. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Centro de Ciências Agrárias Universidade Federal do Piauí, 2005.

OLLERO, M.; GIL-GUZMÁN, E.; LOPEZ, M. C.; et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at diferente stages of maturation: implications in the diagnosis and tretament of male infertility**. Hum. Repod.** V. 16, p. 1312-1320, 2001.

OLIVEIRA, R. N.; MARQUES JR., A. P.; XAVIER, P. R.; ALVES, G. E. S; PAES, P. R. O.; GOBESSO, A. A. O. Avaliação hematológica e bioquímica de equinos suplementados com óleo de arroz semi-refinado, rico em gama-orizanol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 62, n. 5, p. 1043-1047, 2010.

OLIVEIRA, M. F.F.; TEIXEIRA, P.P M.; SILVA, J. C. B.; ET AL. Effect of scrotal insulation associated to evironmental dicomfort on adrologic characteristics in Santa Inês rams. **Journal of Animal Science Advances**. V. 4, n. 10, 1051-1058, 2014.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUDERS, P. T. A sirgle, mild, transiente scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. **Biol. Reprod.** 80, 913-919, 2009.

PELTOLA, V., HUHTANIEMI, I., AHOTUPA, M. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation**. Biol. Reprod.** 53, 1146–1150, 1995.

PEREZ-CRESPO, M ; PINTADO, B ; GUTERREZ-ADÁN, A.Scrotal heat stress effects on psperm viability, sperm DNA integrity, and the effpring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v.75,p40-47,jan. 2008.

PEZZINI, T. G. et al. Seminal characteristics of Curraleiro and Holstein bulls submitted to scrotal insulation. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 863-868, May 2006. ISSN 0100-204X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240555700020 >.

RHOADES, R. A.; TANNER, G. A. **Fisiologia Médica**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p.254, 2005.

RONG, N.; AUSMAN, L. M.; NICOLOSI, R. J. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. **Lipids,** v. 32, n. 3, p. 303-308, 1997.

SANGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition 2ed. USA: Current Conceptions, p373, 2003.

SARTORI, R.; PRESTES, N. C.; CANAVESSI, A. M. O.; et al. Assesssment of ultrassonographic imagens and gross and microscopic lesions of the testicular biopsy in sheep. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.54, n.3, 1-12, 2002.

SCAVARIELLO, E. M.; ARELLANO, D. B. y-Oryzanol: un importante componente del aceite de salvado de arroz. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 48, p. 7-12, 1998.

SEETHARAMAIAH, G. S.; KRISHNAKANTHA, T. P.; CHANDRASEKHARA, N. Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology,** v. 36, p. 291-297, 1990.

SHARMA, R. K.; AGARWEAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertulity. **Urology**, 48, 835-850, 1996.

SHIRAISHI, K., TAKIHARA, H., MATSUYAMA, H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. **World J. Urol**. 28, 359–364, 2010.

SHIRAISHI, K., MATSUYAMA, H., TAKIHARA, H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. **Int. J. Urol**. 19, 538–550, 2012.

SPIAZZI, C. C.; et al. y-Oryzanol protects against acute cádmium-induced oxidative damage in mice testes. **Food and Chemical Toxicology**. v. 55, p. 526-532, 2013.

TAHA, M. F.; VALOJERDI, M. R. Quantitative and qualitative changes of the seminiferous epithelium induced by Ga Al. As (830nm)laser radiation. **Lasers in sugery and Medicine**, v.34, n4, p. 352-359, 2004.

TEIXEIRA, P. P. M.; OLIVEIRA, M. E. F.; MATHEO, T. F.; et al. Avaliação ultrassonográfica da ecogenicidade do parênquima testicular como exame complementar no andrológico de carneiros. **Nucleus Animalium**. V.3, n.1, 31-36, 2011.

WALTER C. W.; et al. Mudanças climáticas e seus efeitos no rendimento de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.49, n12, p.915-924, 2014.

XU, Z., GODBER, J., 2001. Antioxidant activities of major components of c-oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. **Journal American Oil Chemists Society**. 78, 645–649.

XU, Z., HUA, N., GODBER, J., 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and c-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,20-Azobis(2 methylpropionamidine) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 2077–2081.

VALE FILHO, V. R ; MEGALE, F ; GARCIA, O. S.;ABREU, J. J.; FONSECA, V. O,; RESENDE, J.Pevalencia das causas de baixa fertilidade e infertilidade em touros criados em diferentes regiões do Brasil, de um levantamento de 9 estados. In **Congresso Brasileiro de Med. Vet** 1974, São Paulo. SBMV, 1074, p.179.

XAVIER, G. C. Efeito da suplementação alimentar com selênio + vitamina “E” em caprinos submetidos a insulação escrotal. 23.f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária-Programa de Pós-graduação Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007.

XU, Z.; GODBER, J. S. Purification and identification of components of γ-oryzanol in rice bran oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 47, p. 2724-2728, 1999.

WHEELER, K. B.; GARLEB, K. A. Gamma-Oryzanol - Plant Sterol Supplementation: Metabolic, Endocrine, and Physiologic Effects. **International Journal of Sport Nutrition**, v. 1, p. 170-177, 1991.