



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**RESVERATROL AUMENTA A MOTILIDADE
ESPERMÁTICA, PREVINE A LIPOPEROXIDAÇÃO E
MELHORA AS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM
TESTÍCULOS DE RATOS HIPERTIREÓIDEOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Giovana de Moraes Ourique

Santa Maria, RS, Brasil, 2012

**RESVERATROL AUMENTA A MOTILIDADE
ESPERMÁTICA, PREVINE A LIPOPEROXIDAÇÃO E
MELHORA AS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM
TESTÍCULOS DE RATOS HIPERTIREÓIDEOS**

por

Giovana de Moraes Ourique

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Kátia Padilha Barreto

Santa Maria, RS, Brasil
2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**RESVERATROL AUMENTA A MOTILIDADE ESPERMÁTICA,
PREVINE A LIPOPEROXIDAÇÃO E MELHORA AS DEFESAS
ANTIOXIDANTES EM TESTÍCULOS DE RATOS HIPERTIREÓIDEOS**

elaborada por
Giovana de Moraes Ourique

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

Comissão Examinadora

Kátia Padilha Barreto, Dr^a
(Presidente/Orientadora)

Rogério Ferreira, Dr.
(UDESC)

Ana Flávia Furian, Dr^a
(UFSM)

Roselei Fachinetto, Dr^a
(UFSM)

Santa Maria, 20 de julho de 2012.

*Aos meus pais,
que sempre serviram de exemplo
e nunca mediram esforços para me
proporcionar o melhor*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar e iluminar meus passos.

Aos meus pais, Heloisa e Francisco, meus maiores exemplos, pelo carinho, amor, atenção, por compreenderem a minha ausência e pelo incentivo constante.

Às minhas irmãs, Marcela e Camila, pelo carinho, apoio e companheirismo.

A minha orientadora prof^ª. Kátia Padilha Barreto, pela confiança, atenção, paciência, apoio, amizade, e conhecimentos transmitidos.

À prof^ª. Maria Amália Pavanato pelo apoio, atenção, incentivo, conhecimentos compartilhados e principalmente por sua amizade e confiança.

A prof^ª. Roselei Fachineto pelas sugestões, conhecimentos transmitidos e pelo apoio.

Aos profs. Bernardo Baldisserotto e Paulo Bayard Dias Gonçalves pelo auxílio, apoio e pelos conhecimentos dispensados.

Aos colegas e amigos Isabela Finamor, Etiane Saccol, Ana Paula Riffel, Tanise Pês, Diogo Gabriel e demais colegas do laboratório pelo auxílio nos experimentos, pela partilha de conhecimentos, disponibilidade, incentivo, e principalmente, pelos momentos de alegria, companheirismo e amizade incondicional.

Aos colegas dos demais laboratórios envolvidos, Karina Gutierrez, Luís Ricardo Peroza e Alcindo Busanello, pelo apoio, disponibilidade e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao funcionário Florindo Duarte, pela ajuda, competência, disponibilidade e apoio.

À prof^ª. Marta Duarte pelo auxílio, disponibilidade e pelos conhecimentos dispensados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para a minha formação.

Aos meus amigos, pela paciência, compreensão, apoio, companheirismo e pelos momentos de alegria.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de realização deste curso.

A todos que contribuíram nesta caminhada, muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

RESVERATROL AUMENTA A MOTILIDADE ESPERMÁTICA, PREVINE A LIPOPEROXIDAÇÃO E MELHORA AS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM TESTÍCULOS DE RATOS HIPERTIREÓIDEOS

AUTORA: GIOVANA DE MORAES OURIQUE
ORIENTADORA: DR^a KÁTIA PADILHA BARRETO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de julho de 2012.

O hipertireoidismo pode levar ao aumento do estresse oxidativo (EO) nos testículos, podendo causar desordens na função reprodutiva masculina, entre elas, a perda na qualidade espermática. Este estudo avaliou o efeito do resveratrol (RSV) na qualidade espermática e em parâmetros de EO no testículo de ratos eutireóides e hipertireóides. O hipertireoidismo foi induzido pela injeção intraperitoneal (i.p) diária de triiodotironina (T3) (100 µg/kg) durante seis semanas. Após duas semanas do início do experimento, concomitante ao tratamento com T3, os animais começaram a receber injeções diárias de RSV nas doses de 1 mg/kg ou 10 mg/kg (i.p.) por quatro semanas, totalizando as seis semanas de tratamento. No final do período experimental, os animais foram eutanasiados para retirada dos órgãos. Os espermatozoides da cauda do epidídimo foram coletados para análise de motilidade e morfologia. Os testículos foram homogeneizados para determinação da lipoperoxidação através dos níveis de hidroperóxidos lipídicos e de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona-S-transferase (GST); e dos níveis do antioxidante não-enzimático glutaciona (GSH). Os ratos hipertireóides apresentaram menor motilidade espermática, maiores níveis de hidroperóxidos lipídicos e de TBARS, menor atividade da CAT e da GPx e maior atividade da GST do que os animais dos grupos controle. O tratamento com RSV, nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg, foi capaz de prevenir a perda de motilidade espermática induzida no hipertireoidismo. Em adição, o RSV também diminuiu níveis de hidroperóxidos lipídicos e de TBARS; reverteu a diminuição na atividade da CAT e da GPx; além de prevenir o aumento na atividade da GST causado pelo modelo de hipertireoidismo em testículos de ratos adultos. Em conjunto estes dados mostram o efeito protetor do RSV no testículo, preservando a motilidade espermática e protegendo contra danos oxidativos causados pelo hipertireoidismo, o que sugere o RSV como um possível alvo de estudos na busca de estratégias terapêuticas com o objetivo de preservar a função testicular.

Palavras-chave: Hipertireoidismo; polifenóis; dano oxidativo; enzimas antioxidantes; motilidade espermática; disfunção testicular.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduating Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

RESVERATROL IMPROVES SPERM MOTILITY, PREVENTS LIPID PEROXIDATION AND ENHANCES ANTIOXIDANT DEFENSES IN TESTIS OF HYPERTHYROID RATS

AUTHOR: GIOVANA DE MORAES OURIQUE
ADVISER: DR^a KÁTIA PADILHA BARRETO

Date and Place of Defense: July 20th, 2012, Santa Maria.

Hyperthyroidism may lead to an increase in oxidative stress (OS) in testis, may cause male reproductive disorders, among them, the loss in the sperm quality. The effect of resveratrol (RSV) on sperm motility and on OS parameters in testis of euthyroid and hyperthyroid rats was investigated. Hyperthyroidism was induced by daily intraperitoneal injection (i.p.) of triiodothyronine (T₃) (100 µg/kg, i.p.) for six weeks. After two weeks, concomitantly to T₃ treatment, animals received daily injections of RSV at dose of 1 mg/kg e 10 mg/kg (i.p.) during four weeks, totaling six experimental weeks. At the end of experimental period animals were euthanized for removal of organs. Sperm of cauda epididymal was collected for sperm motility and morphology analysis Testis were homogenized for determination of lipoperoxidation by lipid hydroperoxides and thiobarbituric reactive substances (TBARS) levels; activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST); and non-enzimatic antioxidant glutathione (GSH). Hyperthyroid rats presented lower sperm motility, higher lipid hydroperoxides and TBARS levels, lower CAT and GPx activities and higher GST activity in testis than animals of control groups. RSV treatment at doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg was able to prevent the loss on sperm motility induced by hyperthyroidism. In addition, RSV decreased lipid hydroperoxides and TBARS levels; reversed the decrease in CAT and GPx activities; and also prevented the increase in GST activity caused by hyperthyroidism in adult rat testis. Together these data show the protective effect of RSV in the testis, preserving sperm motility, and protecting testis against oxidative damage caused by hyperthyroidism, which suggests the RSV as a possible target of studies in the search for therapeutic strategies in order to preserve testicular function.

Keywords: hyperthyroidism, polyphenols, oxidative damage, antioxidant enzymes, sperm motility, testicular dysfunction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação esquemática da arquitetura do testículo	15
Figura 2 Formação das EROs a partir da redução parcial do oxigênio	20
Figura 3 Estrutura química do trans- e cis-resveratrol (3,4',5-triidroxiestilbeno).....	24

LISTA DE TABELAS

Table 1 Assessment of thyroid state of rats	42
Table 2 Effects of induced hyperthyroidism and resveratrol on reproductive organs weights	43
Table 3 Effects of resveratrol and hyperthyroidism on epididymal sperm motility and abnormalities	44
Table 4 Effects of resveratrol on oxidative damage in testis of control and hyperthyroid rats	45
Table 5 Effects of resveratrol on antioxidant enzyme activities and nonenzymatic antioxidant concentrations in testis of control and hyperthyroid rats.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FSH	Hormônio folículo estimulante
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HT	Hormônios da tireóide
I.P.	Intraperitoneal
LH	Hormônio luteinizante
LPO	Peroxidação lipídica
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
RSV	Resveratrol (3,4',5-triiodoestilbeno)
SE	Erro padrão entre as médias
SOD	Superóxido dismutase
T3	Triiodotironina (3,5,3'-L-triiodotironina)
T4	Tiroxina (3,5,3',5'-L-tetraiodotironina)
RTs	Receptores para os hormônios da tireóide
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio estimulador da tireóide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Função testicular	15
3.2 Hormônios da Tireóide	16
3.3 Hipertireoidismo	18
3.4 Estresse Oxidativo	19
3.5 Hipertireoidismo, estresse oxidativo e função testicular	21
3.6 Resveratrol	23
4 MANUSCRITO	27
5 CONCLUSÕES	47
6 REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoideanos (HT) são conhecidos por desempenhar um papel fundamental na regulação do metabolismo energético do organismo (BUZZARD et al., 2000). Receptores para os HT estão presentes em quase todos os tecidos e regulam importantes funções em tecidos específicos (YEN, 2001). Estes receptores estão presentes em espermatozóides, células germinativas em desenvolvimento, células de Sertoli, células de Leydig e células peritubulares em ratos na fase neonatal, pré-púberes e adultos (BUZZARD et al., 2000). Apesar de não serem os principais reguladores da função testicular, os HT influenciam precoce e fortemente a proliferação e maturação das células germinativas, e promovem o crescimento testicular (SAHOO et al., 2007; ZAMONER et al., 2007).

Durante o hipertireoidismo, os HT estão aumentados no plasma e desencadeiam um aumento do metabolismo basal. Este estado hipermetabólico leva a um aumento na taxa de respiração celular, com a geração de excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MANO et al., 1995). Este aumento na taxa metabólica leva ao estresse oxidativo (EO), que tem sido envolvido na fisiopatologia do hipertireoidismo (VENDITTI et al., 1997). As concentrações de EROs são controladas por defesas antioxidantes, que incluem antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona-S-transferase (GST) e sistemas não-enzimáticos, como a glutaciona (GSH) (TREMELLEN, 2008). EO ocorre quando existe um aumento da geração de EROs, a diminuição das defesas antioxidantes, ou uma combinação de ambos. EROs são altamente reativos e podem levar a danos oxidativos em macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA (GUERRERO et al., 1999). Em ratos com hipertireoidismo, os espermatozóides e os testículos, por serem ricos em ácidos graxos poliinsaturados, mostram uma grande susceptibilidade ao dano oxidativo, o que pode resultar em infertilidade masculina (CHOUDHURY et al., 2003; ZAMONER et al., 2007; SAHOO et al., 2008). Esta disfunção pode ser causada por peroxidação lipídica (LPO) das membranas celulares, levando a danos na estrutura dos testículos ou dos espermatozóides e perda de motilidade (KRISHNAMOORTHY et al., 2007).

Neste sentido, o uso de compostos antioxidantes pode ser uma alternativa para reduzir o EO induzido pelo hipertireoidismo e, conseqüentemente, diminuir o dano oxidativo aos testículos, prevenindo disfunções reprodutivas presentes nesta condição experimental. O resveratrol (3,4',5-triiodroxiestilbeno, RSV) é um composto polifenólico natural com poderosas propriedades antioxidantes, apresentando um grande número de efeitos benéficos

em uma variedade de órgãos e sistemas humanos (FRÉMONT, 1999). O tratamento com RSV já se mostrou capaz de prevenir a LPO induzida por etanol em testículos (KASDALLAH-GRISSA et al., 2006) e a LPO induzida por tert-butil hidroperóxido em espermatozóides, além de aumentar a motilidade espermática (COLLODELA et al, 2011). No entanto, ainda não foram estudados os efeitos deste composto em espermatozóides e testículos de ratos com hipertireoidismo experimental.

Antioxidantes exógenos são uma alternativa para o tratamento clínico de dano subjacente a muitas patologias que alteram a fertilidade masculina. Mas apesar dos evidentes benefícios das terapias antioxidantes, ainda faltam estudos para testar preparações antioxidantes especificamente designadas a sustentar a saúde reprodutiva masculina ou para compreender os mecanismos subjacentes ao dano oxidativo no trato masculino. Assim sendo, este trabalho tem como objetivo investigar o efeito do RSV sobre a motilidade e a morfologia dos espermatozóides e sobre parâmetros de EO em testículos de ratos hipertireóides, a fim de verificar o potencial terapêutico deste composto na função reprodutiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do RSV na qualidade dos espermatozóides e em parâmetros de EO em testículos de ratos com hipertireoidismo experimental, a fim de verificar o potencial terapêutico deste composto na função reprodutiva.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar os efeitos do hormônio T3 e do RSV sobre o ganho de peso corporal e sobre o peso do coração, testículos, epidídimo e próstata de ratos;

Avaliar o efeito do RSV na motilidade espermática e na porcentagem de espermatozóides anormais em animais eutireóides e hipertireóides;

Verificar o efeito do T3 e/ou do RSV sobre o dano oxidativo em testículos de ratos adultos.

Analisar o efeito do T3 e/ou do RSV sobre a atividade antioxidante em testículos de ratos adultos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Função testicular

O testículo é caracterizado como um órgão altamente complexo, formado por dois compartimentos: os túbulos seminíferos, formados pelas células germinativas e pelas células de Sertoli; e o espaço intersticial, onde estão as células de Leydig (Figura 1). Os testículos apresentam duas funções principais, a produção de gametas e a síntese de andrógenos. Os espermatozoides são produzidos dentro do túbulo seminífero pela divisão e transformação das células germinativas, em um processo chamado espermatogênese. As células de Sertoli proporcionam suporte nutricional e mecânico às células germinativas, mediante produção de hormônios, fatores reguladores e nutrientes, enquanto as células de Leydig são responsáveis pela produção dos hormônios testosterona e estradiol (JOHNSTON, 1965).

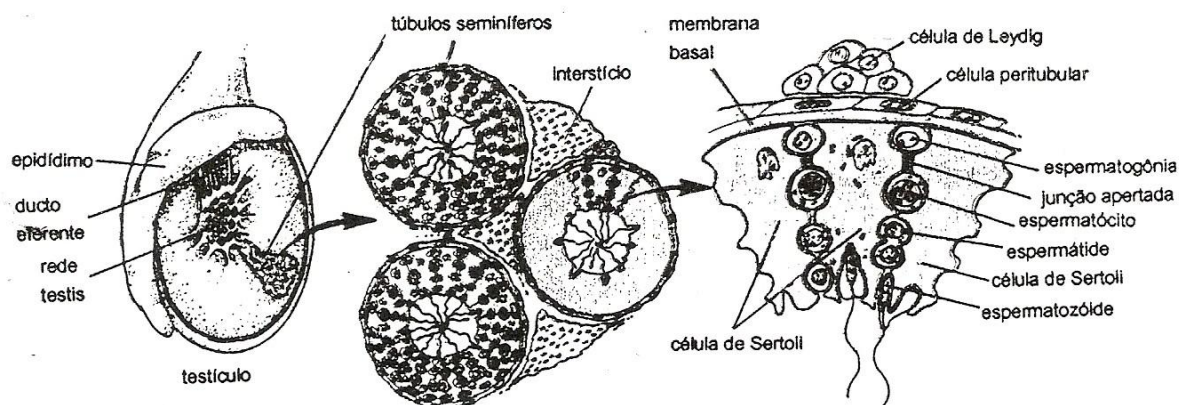


Figura 1 Representação esquemática da arquitetura do testículo

Fonte: SKINNER, 1991

O espermatozóide dos mamíferos tem dois compartimentos principais: a cabeça e a cauda, ou flagelo, unidas pelo colo. Esta característica estrutural está voltada para a sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde os pronúcleos masculino e feminino se unem para dar origem ao zigoto (O'DONNELL et al., 2001). Dessa forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação do material genético para o oócito, enquanto o flagelo promove motilidade à célula para garantir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e

penetração através da zona pelúcida do oócito (EDDY e O'BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997).

A função testicular é influenciada pela adenohipófise através da secreção de gonadotropinas, o hormônio folículo estimulante (FSH), que age diretamente nas células de Sertoli, e o hormônio luteinizante (LH), que atua nas células de Leydig. A testosterona, principal andrógeno produzido pelas células de Leydig em resposta ao LH, difunde-se pelos túbulos seminíferos, onde é essencial para a espermatogênese. Tanto a testosterona quanto o FSH são necessários para iniciação e manutenção da espermatogênese (WAJNER, et al. 2009).

As gônadas masculinas foram, por décadas, consideradas insensíveis aos hormônios da tireóide. No entanto estudos mais recentes demonstraram que transportadores e receptores tireoidianos estão presentes no testículo durante o período de desenvolvimento (JANNINI et al., 1995; JANNINI et al., 2000) e na idade adulta (BUZZARD et al., 2000). Além disso, tem sido demonstrado que estes hormônios desenvolvem um importante papel no desenvolvimento e na função testicular, uma vez que a disfunção da tireóide está associada com anormalidades da morfologia e função testicular, e com a diminuição da fertilidade e alterações da atividade sexual em homens (KRASSAS e PERROS, 2003; CARANI et al., 2005), o que reforça o papel destes hormônios na função testicular.

3.2 Hormônios da Tireóide

A tireóide é uma glândula em forma de borboleta localizada no pescoço, em frente à traquéia e imediatamente abaixo da laringe. É responsável pela secreção de dois hormônios significativos, a tiroxina (3,5,3',5'-L-tetraiodotironina, T4) e a triiodotironina (3,5,3'-L-triiodotironina, T3), que exercem grande efeito sobre a atividade metabólica do organismo e sobre o crescimento (GUYTON e HALL, 2002). T4 é o principal produto de secreção da tireóide e sua desiodinação em tecidos periféricos produz T3, o hormônio da tireóide biologicamente ativo (BOELAERT e FRANKLYN, 2005).

A síntese e secreção dos HT são primorosamente reguladas por um sistema de feedback negativo que envolve o hipotálamo, a hipófise e a tireóide (eixo hipotálamo-hipófise-tireóide) (YEN, 2001). A secreção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) pelo hipotálamo e do hormônio estimulador da tireóide (TSH) pela hipófise é regulada pelos níveis circulantes de HT no plasma (WAJNER et al., 2009). A tireoglobulina proporciona uma

matriz para síntese de T3 e T4 e um veículo para posterior armazenamento destes hormônios na tireóide (BOELAERT e FRANKLYN, 2005).

Mais de 99% dos HT circulam no plasma associados a proteínas de ligação, principalmente a globulina de ligação de tiroxina e, em menores quantidades, a transtirretina e a albumina. Os HT podem ser liberados rapidamente a partir destas proteínas, o que facilita sua entrada nas células-alvo (BOELAERT e FRANKLYN, 2005).

Os HT modulam o consumo de oxigênio, regulam o metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, e ainda alteram a razão de síntese e degradação de uma grande variedade de fatores de crescimento e hormônios. Os efeitos dos HT envolvem duas categorias de resposta biológica: efeitos na diferenciação celular e desenvolvimento; e efeitos nas vias metabólicas. Essas duas ações são interconectadas, sendo que as mudanças no crescimento e desenvolvimento são consequência da modulação hormonal do organismo (BOELAERT e FRANKLYN, 2005).

Embora os HT exerçam seus efeitos em diversos locais intracelulares, suas ações nos tecidos-alvo são predominantemente mediadas por receptores para os hormônios da tireóide (RTs) específicos no núcleo, capazes de se ligar a regiões reguladoras de genes-alvo, modificando sua expressão (WAJNER et al., 2009). RTs são expressos em quase todos os tecidos, embora as isoformas destes RTs possam variar de um tecido para outro. Assim, em adição ao seu papel no metabolismo energético e no consumo de oxigênio, HT também regulam importantes funções em tecidos específicos (YEN, 2001).

Os hormônios da tireóide, ainda que não sejam os principais reguladores da função testicular, influenciam precoce e fortemente a proliferação e a maturação morfofuncional das células de Sertoli bem como o crescimento dos testículos (SAHOO et al., 2007; ZAMONER et al., 2007). O T3 regula a maturação e o crescimento dos testículos inibindo a proliferação de células de Sertoli imaturas e estimulando sua diferenciação funcional. Por outro lado, HT também têm um papel no início da diferenciação das células de Leydig e estimulam a estereoidogênese (WAGNER et al., 2009).

Já foi demonstrado que pacientes hipertireóides podem apresentar oligozoospermia e perda de motilidade espermática (CLYDE et al., 1976). Kumar e colaboradores (1996) também demonstraram que o hipertireoidismo induzido com T4 causa mudanças nos níveis lipídicos do epidídimo, acompanhadas de uma menor produção e perda da motilidade dos espermatozóides de ratos. Estes dados estão de acordo com estudos clínicos indicando que o hipertireoidismo está associado com a pobre qualidade do sêmen e reduzida motilidade dos espermatozóides, que é normalizada quando a disfunção tireoidiana do paciente é corrigida e

o eutireoidismo é estabelecido (KRASSAS et al., 2002). Evidentemente a função testicular é altamente dependente da função do sistema tireóideo.

3.3 Hipertireoidismo

O termo “hipertireoidismo” é usado para a produção excessiva de HT pela glândula tireóide e um excesso destes hormônios no sangue (BAYDAS e MERAL, 2005). Os sinais e sintomas do hipertireoidismo geralmente aparecem quando os tecidos são expostos a quantidades excessivas de HT, e incluem intolerância ao calor, taquicardia, perda de peso, fraqueza, labilidade emocional e tremores (KLEIN e OJAMAA, 2001).

É bem estabelecido que o hipertireoidismo leva a uma aceleração na taxa metabólica basal (SCHWARTZ e OPPENHEIMER, 1978), o que está associado a um aumento da respiração celular nos tecidos-alvo (VENDITTI et al., 2003). Este estado hipermetabólico no hipertireoidismo pode levar a um aumento na geração de EROs e pode induzir alterações no sistema de defesa antioxidante, resultando em danos oxidativos a diversos tecidos (VENDITTI et al., 1997; SEYMEN et al., 1999; CHOUDHURY et al., 2003; VENDITTI et al., 2003; BAYDAS e MERAL, 2005; SAICIC et al., 2006; ZAMONER et al., 2007; SAHOO et al., 2008).

Quando os HT são administrados aos animais, as mitocôndrias de quase todas as células aumentam em número e tamanho. A superfície da membrana interna mitocondrial, a atividade das enzimas oxidativas e os elementos do sistema de transporte de elétrons também aumentam proporcionalmente ao aumento do metabolismo basal. Uma das enzimas que tem sua atividade aumentada é a Na^+K^+ -ATPase, que intensifica o transporte de íons através da membrana celular, consumindo energia e aumentando a geração de calor no organismo. Este processo poderia constituir um dos mecanismos pelos quais os HT estimulam o metabolismo basal (GUYTON e HALL, 2002).

O consumo de oxigênio e a produção de EROs ocorrem preferencialmente nas membranas lipídicas da mitocôndria. Desta forma, a sensibilidade ao dano oxidativo das membranas celulares depende da concentração de ácidos graxos insaturados, sendo os poliinsaturados os mais susceptíveis ao ataque das EROs (GREDILLA et al., 2001). O testículo, sendo um tecido rico em ácidos graxos poliinsaturados, é muito vulnerável a injúrias oxidativas (SAHOO et al., 2008).

3.4 Estresse Oxidativo

O desenvolvimento e a existência de um organismo em presença de oxigênio estão associados à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), sob condições fisiológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A geração das EROs ocorre em condições fisiológicas, principalmente durante os processos de oxidação biológica, como a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para formação de ATP na mitocôndria (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A formação dessas espécies ocorre em aproximadamente 5% de todo o processo de redução do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O). A princípio o O_2 é reduzido até H_2O recebendo quatro elétrons de uma só vez pela enzima citocromo oxidase. Entretanto, em razão de sua configuração eletrônica, o O_2 tem uma forte tendência em receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários altamente reativos. Dentre esses compostos intermediários destacam-se o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}), os quais podem ser espécies radicalares ou não-radicalares (Figura 2). Quando as EROs apresentam pelo menos um elétron desemparelhado são denominadas radicais livres, que são definidos como qualquer espécie capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons não-pareados no seu orbital mais externo, característica que lhe confere alta reatividade. Ainda deve-se relatar o oxigênio “singlet”, que representa o estado excitado do oxigênio e também pode causar danos à célula (DEL MAESTRO, 1980; SIES, 1991; YU, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O $O_2^{\bullet-}$ é a primeira EROs a ser formada através da redução monovalente do O_2 a H_2O , e a partir do mesmo serão geradas as demais EROs através de reações sequenciais (HALLIWELL, 1996). O H_2O_2 é o segundo intermediário gerado nesse processo. Ele é uma espécie reativa não-radicalar citotóxica, e pode facilmente se difundir entre as células, podendo gerar o OH^{\bullet} através da reação do H_2O_2 com íons de ferro ou cobre (reação de Fenton) ou através da reação do H_2O_2 com o $O_2^{\bullet-}$ (reação de Haber-Weiss) catalisada por íons metálicos (FRIDOVICH, 1974; YU, 1994). O OH^{\bullet} é um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos, podendo atravessar membranas e reagir com biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).



Figura 2 Formação das EROs a partir da redução parcial do oxigênio

Fonte: OHARA (2006)

A alta reatividade das EROs está relacionada com seus elétrons desemparelhados, que lhes confere uma grande instabilidade. Este potencial reativo pode ser bem ilustrado pelos processos que desencadeia, como a peroxidação lipídica (LPO), as reações oxidativas em proteínas da membrana e o ataque ao DNA, podendo resultar em alterações na estrutura, permeabilidade e função secretora da membrana, mutações, perda funcional e morte celular (SIES, 1991; HALLIWELL, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A produção contínua de EROs durante os processos metabólicos levou o organismo a desenvolver muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares dessas espécies e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Sendo assim, um antioxidante é definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada a do substrato oxidável, retarda ou impede significativamente a oxidação deste substrato (SIES, 1993; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os antioxidantes atuam removendo o oxigênio presente no meio, impedindo a formação das EROs, quelando metais que catalisam a formação de EROs, induzindo a produção de antioxidantes endógenos e reparando os danos em biomoléculas danificadas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O sistema de defesa antioxidante é composto por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A regulação do sistema antioxidante enzimático depende de vários fatores, como especificidade do órgão, idade, estágio de desenvolvimento, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores (HARRIS, 1992). Dentre as enzimas que compõem esse sistema, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx), a glutatona redutase (GR) e a glutatona-S-transferase (GST) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Por outro lado, o sistema antioxidante não-enzimático é constituído por antioxidantes

hidrossolúveis, como a glutationa (GSH), a vitamina C e o ácido úrico; e lipossolúveis, como os tocoferóis, os carotenóides e a bilirrubina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O sistema antioxidante enzimático é considerado a primeira linha de defesa antioxidante, por evitar o acúmulo do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 , atenuando assim a formação das demais EROs (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Existem também, as defesas secundárias, que impedem a propagação da LPO, e as terciárias, que são enzimas que reparam danos já instalados (YU, 1994). Quando uma substância age neutralizando as EROs no início da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é denominada “scavenger” (HALLIWELL, 1996).

O desequilíbrio entre os antioxidantes e EROs é denominado estresse oxidativo (EO) e ocorre devido ao aumento na velocidade de geração de EROs e/ou diminuição na atividade do sistema de defesa antioxidante, resultando em aumento sustentado das concentrações de EROs (SIES, 1991). Em humanos, o EO tem sido associado com várias doenças como diabetes mellitus, aterosclerose, hipertensão, doenças inflamatórias e doenças neurodegenerativas (VALKO et al., 2007). Além disso, nos últimos anos, muitos estudos têm relacionado o EO a distúrbios na tireóide (VENDITTI et al., 1997; SEYMEN et al., 1999; CHOUDHURY et al., 2003; VENDITTI et al., 2003; BAYDAS e MERAL, 2005; SAICIC et al., 2006; ZAMONER et al., 2007; SAHOO et al., 2008) e a desordens reprodutivas (CHOUDHURY et al., 2003; AGARWAL et al., 2006; ZAMONER et al., 2007; AITKEN e ROMAN, 2008; KAO et al., 2008; TREMELLEN, 2008; TURNER e LYSIAK, 2008).

3.5 Hipertireoidismo, estresse oxidativo e função testicular

Sabe-se que EO pode ser modulado de acordo com as concentrações séricas dos HT, e o hipertireoidismo pode aumentar a LPO e influenciar o sistema antioxidante (VENDITTI et al., 1997; SEYMEN et al., 1999; CHOUDHURY et al., 2003; VENDITTI et al., 2003; BAYDAS e MERAL, 2005; SAICIC et al., 2006; ZAMONER et al., 2007; SAHOO et al., 2008). Os espermatozóides humanos geram EROs em quantidades fisiológicas, que desempenham um papel importante nas funções dos espermatozóides durante a capacitação espermática, reação acrossômica e fusão de oócitos. No entanto, uma produção excessiva de EROS no sêmen, acompanhada de uma disfunção nas defesas antioxidantes, resulta em EO, que pode lesar a membrana e o DNA dos espermatozóides, levando a um prejuízo na qualidade seminal (AGARWAL et al., 2006).

A espermatogênese é um processo replicativo extremamente ativo, capaz de gerar aproximadamente 1000 espermatozóides por segundo. A alta velocidade de divisão celular inerente a este processo implica correspondentemente a uma alta velocidade de consumo de oxigênio mitocondrial pelo epitélio germinal (AITKEN e ROMAN, 2008). Entretanto, a pobre vascularização dos testículos determina que a tensão de oxigênio neste tecido seja baixa e a competição por este elemento vital nos testículos intensa. Uma vez que tanto a espermatogênese (PELTOLA et al., 1994) como a esteroidogênese (CHEN et al., 2005) são vulneráveis ao EO, a baixa tensão de oxigênio que caracteriza este tecido pode ser um importante mecanismo pelo qual os testículos protegem a si mesmos do dano mediado por radicais livres. Adicionalmente, os testículos contêm uma elaborada gama de enzimas antioxidantes e de “scavengers” de radicais livres para impedir que as funções espermatogênica e esteroidogênica deste órgão sejam impactadas pelo EO (ZANGAR et al., 2004).

Estes sistemas de defesa são extremamente importantes, porque o dano peroxidativo é correntemente reportado como a causa mais importante de bloqueio da função testicular subjacente a consequências patológicas de uma ampla gama de condições que vão desde torsão testicular ao diabetes e exposição a xenobióticos. Tais condições podem causar mudanças no fluxo microvascular testicular, na sinalização endócrina e apoptose da célula germinativa (AITKEN e ROMAN, 2008).

As EROs podem causar danos tanto a nível de espermatozóide quanto a nível testicular. Os espermatozóides, por serem ricos em ácidos graxos poliinsaturados, são altamente susceptíveis ao ataque das EROs e à LPO, que podem levar a perturbações na membrana e dano ao DNA, resultando em diminuição da motilidade espermática, provavelmente por uma perda rápida de ATP intracelular, causando dano ao axonema; diminuição na viabilidade espermática; e aumento nos defeitos de peça intermediária, com efeitos deletérios na capacitação espermática e na reação acrossômica (AGARWAL et al., 2006). O dano ao DNA também pode levar a abortos espontâneos (TREMELLEN, 2008). Além disso, a produção de EROs e o EO no testículo podem lesar a membrana mitocondrial e contribuir para a inibição da capacidade esteroidogênica, resultando em diminuição na produção de testosterona pelas células de Leydig (AITKEN e ROMAN, 2008).

Além disso, Agarwal e colaboradores (2006) demonstraram que EROs poderiam servir como marcadores de infertilidade idiopática, uma vez que o EO apresentou-se diretamente ligado com uma pobre qualidade no sêmen de indivíduos com esta patologia. Kao e colaboradores (2008) confirmaram que o EO está diretamente relacionado com a perda de

motilidade dos espermatozóides, uma vez que o esperma de homens com infertilidade ou subfertilidade apresentou maior dano oxidativo e menor capacidade antioxidante.

Choudhury et al., (2003) demonstraram que ratos hipotireóides e hipertireóides apresentaram mudanças em parâmetros de EO, acompanhadas de alterações na contagem e presença de anormalidades nos espermatozóides. Zamoner e colaboradores (2007) também demonstraram que o hipertireoidismo, no desenvolvimento dos testículos de ratos imaturos, está relacionado com o EO. Portanto, o EO provavelmente está diretamente relacionado com as mudanças na fertilidade masculina no hipertireoidismo.

Compostos com reconhecida atividade antioxidante como melatonina, vitamina E e curcumina foram estudados e apresentaram-se capazes de diminuir o EO em testículo de ratos hipertireóides (BAYDAS e MERAL, 2005; MOGULKOC et al., 2005; SAHOO et al., 2008).

Diante disto, estratégias no tratamento da infertilidade idiopática devem incluir compostos antioxidantes que ajudam a reduzir o EO e, conseqüentemente, melhorar a qualidade do esperma e da fertilidade (AGARWAL et al., 2006). Um composto com reconhecida atividade antioxidante em diferentes tecidos é o RSV.

3.6 Resveratrol

Nas ultimas décadas aumentou muito o interesse nas propriedades de produtos naturais com o objetivo de identificar novos compostos que possam ser potencialmente utilizados na clínica médica, em especial, na busca de melhores terapias antioxidantes (SOLEAS et al., 2001; KOVACIC e SOMANATHAN, 2010).

Flavonóides e compostos semelhantes a flavonóides estão entre os mais interessantes devido ao fato de estarem presentes em constituintes de dietas e por apresentarem efeitos benéficos em diversos processos biológicos e condições patológicas. Uma ampla variedade de produtos naturais está sendo avaliada quanto ao seu potencial clínico, tanto no tratamento como na prevenção de doenças. Entre esses, está a família dos polifenóis (viniferinas) com forte propriedade antifúngica, o que inclui estes polifenóis em um grupo de antibióticos derivados de plantas denominado fitoalexinas (SOLEAS et al., 1997).

Um importante membro deste grupo é o 3,4',5 triidroxiestilbeno, ou resveratrol (RSV), o maior componente ativo das estilbeno fitoalexinas que foi sintetizado pela primeira vez a partir de raízes de uma planta medicinal oriental *Polygonum capsidatum*

(NOMORUMA et al., 1963). O RSV está presente em várias plantas comestíveis, mas a descoberta de sua presença no vinho tinto aumentou sua relevância por tornar seu acesso mais fácil para a população em geral (VANG et al., 2011).

O RSV é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol e cis-resveratrol (Figura 3). O isômero trans- tem reconhecidas atividades biológicas, e pode facilmente ser convertido para a forma cis- pela luz visível, pois este isômero é mais estável (SOLEAS et al., 1997). O trans-resveratrol foi primeiramente detectado em videiras (*Vitis vinifera*) em 1976 por Landcake e Price, que descobriram que este composto era sintetizado pelas folhas em resposta a uma infecção fúngica ou a exposição à luz ultravioleta (FRÉMONT, 1999).

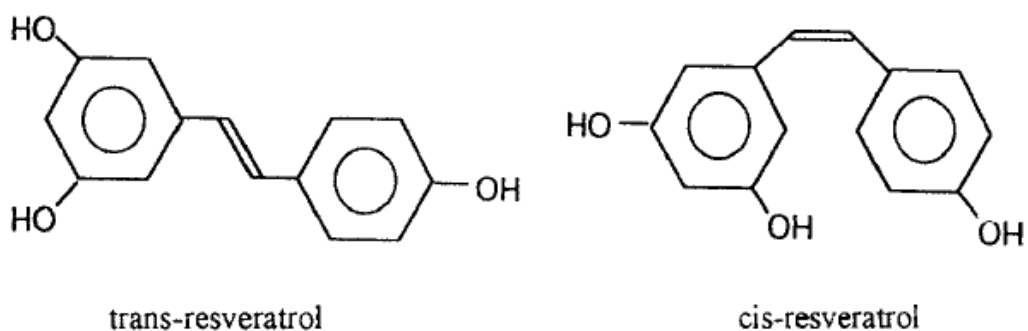


Figura 3 Estrutura química do trans- e cis-resveratrol (3,4',5-triidroxiestilbeno)

Fonte: FRÉMONT (2000)

O interesse neste composto presente nas videiras foi estimulado quando estudos epidemiológicos mostraram uma relação inversa entre o consumo de vinho tinto e a incidência de doenças cardiovasculares (FRÉMONT, 1999). O trans-resveratrol foi descrito por apresentar benefícios à saúde incluindo efeitos anticarcinogênicos (JANG et al., 1997; BENITEZ et al., 2007; WOO et al., 2007), antiinflamatórios (WU, 2003), proteção cardiovascular (NARDINI et al., 1997; HUDSON et al., 2000; BRADAMANTA et al., 2004) e atividade antioxidante (BELGUENDOZ et al., 1997; FERRETTI et al., 2004; BAUR, 2006; UNGVARI et al., 2007; DOLINSKY et al., 2009; SPANIER et al., 2009; TANNO et al., 2010; VENTURINI et al., 2010; SCHMATZ et al., 2011), por exemplo. Além disto, Juan et al. (2001) demonstraram que o consumo diário de 20 mg/kg de RSV durante 28 dias não provocou nenhum efeito adverso em ratos saudáveis.

Os efeitos protetores do RSV contra o dano oxidativo *in vivo* e *in vitro* são provavelmente devido à regulação de antioxidantes endógenos dos sistemas celulares, além de atuar como um antioxidante “scavenger” de EROs (SPANIER et al., 2009). O RSV também inibe a formação de radicais livres de oxigênio suprimindo genes pró-oxidantes (BAUR, 2006; DOLINSKY et al., 2009; SPANIER et al., 2009) e induzindo enzimas antioxidantes incluindo SOD, CAT, tioredoxina, e GPx (UNGVARI et al., 2007; SPANIER et al., 2009; TANNO et al., 2010). Estudos também relataram que o RSV quelata o metal de transição cobre, que é capaz de gerar radicais livres e causar LPO (BELGUENDOZ et al., 1997; FERRETTI et al., 2004).

Em um estudo comparando as propriedades do RSV e do vinho tinto em diferentes áreas do cérebro de ratos diabéticos, nos quais a glicemia aumenta o EO, verificou-se que o RSV (20mg por kg) durante 21 dias foi efetivo em aumentar as defesas antioxidantes no hipocampo e no núcleo estriado (VENTURINI et al., 2010). Adicionalmente, o RSV também apresentou efeito protetor contra dano hepático e renal induzido pelo EO causado pelo estado diabético, evidenciado pela capacidade deste polifenol de modular as defesas antioxidantes e diminuir a LPO nestes tecidos (SCHMATZ et al., 2011).

A suplementação oral com 5g/kg de RSV se mostrou capaz de proteger os testículos de ratos contra a LPO induzida por etanol (KASDALLAH-GRISSA et al., 2006), comprovando a atividade antioxidante deste composto nos testículos. As propriedades de scavenger do RSV foram demonstradas *in vitro* em esperma humano e em células germinativas de ratos. A motilidade espermática aumentou progressivamente com o tratamento com RSV nas concentrações de 30 μ M, 15 μ M e 6 μ M. Além disso, foi descrito que 15 μ M de RSV atuou contra a LPO induzida por tert-butil hidroperóxido, preservando a cromatina e a membrana plasmática do espermatozóide (COLLODELA et al, 2011).

Além da propriedade antioxidante do RSV, que pode ser uma ferramenta para diminuir o EO e conseqüentemente, a perda da fertilidade no hipertireoidismo, o RSV também já demonstrou uma grande variedade de efeitos benéficos sob parâmetros da reprodução. Revel e colaboradores (2001) demonstraram que a injeção semanal de 50mg/kg de RSV é capaz de proteger o DNA do esperma contra o dano e a apoptose causada por contaminantes ambientais. Em animais adultos saudáveis, foi demonstrado por Juan e colaboradores (2005) que o tratamento diário por gavagem com 20 mg/kg de RSV por 90 dias aumentou síntese de LH, FSH e testosterona, e a produção de espermatozóides, não alterando parâmetros qualitativos no espermograma. RSV (30 mg/kg) se mostrou capaz de reduzir a apoptose de células germinativas em testículos de ratos após torção testicular experimental

(UGURALP et al., 2005). O tratamento com 50 mg/kg de RSV por 28 dias melhorou a ereção peniana em coelhos e aumentou os níveis de testosterona em ratos, acompanhado de melhora na quantidade e motilidade dos espermatozóides (SHIN et al., 2008). RSV (20, 40 e 80 mg/kg por gavagem) também restabeleceu a espermatogênese após uma injúria testicular causada por toxinas ambientais e quimioterápicos em ratos adultos (JIANG et al., 2008).

Apesar de já estar estabelecido o papel do RSV como um antioxidante e de já ter sido demonstrado que o RSV melhora alguns parâmetros reprodutivos, ainda não se têm relatos dos efeitos do RSV sobre a qualidade dos espermatozóides e sobre parâmetros de EO em testículos de ratos hipertireóideos.

4 MANUSCRITO

O manuscrito está disposto conforme as normas requisitadas pela revista *Reproductive Toxicology*, à qual foi submetido para publicação.

Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defenses in testis of hyperthyroid rats

Giovana M. Ourique^a, Isabela A. Finamor^a, Etiane M. H. Saccol^a, Ana P. K. Riffel^a, Tanise S. Pês^a, Karina Gutierrez^b, Paulo B. D. Gonçalves^b, Bernardo Baldisserotto^a, Maria A. Pavanato^a, Kátia P. Barreto^{a*}

^a*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.*

^b*Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.*

*Corresponding author. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Camobi 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +55 55 32209381; fax: +55 55 32208241. E-mail adress: barreto.kp@gmail.com

ABSTRACT

Hyperthyroidism may lead to a loss of sperm motility and to an increase in oxidative stress (OS) in testis, may cause male reproductive disorders. Thus, the use of compounds with antioxidant properties may be a strategy for prevent these disorders. The effect of resveratrol (RSV) on sperm motility and on OS parameters in testis of rats with triiodothyronine-induced hyperthyroidism (100 µg/kg) was investigated. Hyperthyroid rats presented lower sperm motility, higher lipid hydroperoxides and thiobarbituric reactive substances levels, lower catalase and glutathione peroxidase activities and higher glutathione-S-transferase activity in testis than control animals. RSV treatment at doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg was able to prevent all these events. In conclusion, RSV might be a strategy for therapeutic intervention to preserve sperm motility and to prevent OS in testis, may preserve testicular function in hyperthyroidism.

Keywords: hyperthyroidism, polyphenol, oxidative stress, antioxidant enzymes, sperm quality, testicular dysfunction.

1 Introduction

Thyroid hormones (TH) are known to play a fundamental role in the regulation of the energy metabolism of almost all mammalian tissues. TH receptors are present in sperm, developed germ cell, Sertoli, Leydig, and peritubular cells in neonatal, prepubertal and adult rats [1]. Although they are not the primary regulators of testicular function, TH influence early and strongly the proliferation and maturation of germ cells, and promote testis growth [2,3]. One of the most important effects of TH is the triggering of hyper-metabolic state with excess generation of reactive oxygen species (ROS) due to enhanced mitochondrial respiration [4]. This increase in metabolic rate leads to oxidative stress (OS), which has been involved in the pathophysiology of hyperthyroidism [5].

OS occurs when there is an increased generation of ROS, decrease in antioxidant defenses, or a combination of both. ROS concentrations are controlled by antioxidant defenses, which include several enzymatic, as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) and non-enzymatic systems, as glutathione (GSH) [6]. ROS are highly reactive and can lead to oxidative damage to macromolecules such as lipids, proteins and DNA [7]. In hyperthyroid rats, tissues like testis, which are rich in polyunsaturated fatty acids, show more susceptibility to oxidative damage, which may result in male infertility [3,8,9]. This dysfunction could also be caused by lipid peroxidation (LPO) of sperm cell membranes, injury to the midpiece and axonemal structure, malfunctioning of capacitation and acrosomal reaction and, finally, loss of motility [10].

The use of compounds with antioxidant properties, such as melatonin [11,12] and vitamin E [9], have been shown efficient in protecting testis from OS generating by experimental hyperthyroidism. However, no data that associates the effects of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene, RSV) as an auxiliary tool in the treatment of this experimental condition is found in the literature. RSV is a natural polyphenol found mainly in grapes and wines and plays an important role as antioxidant, acting as an effective scavenger of superoxide, hydroxyl and metal-induced radicals [13,14,15,16,17]. It also exhibits a protective effect against LPO in cell membranes and DNA damage caused by ROS [13]. Furthermore, RSV protects sperm from damage caused by environmental toxins [16,18] and by chemotherapeutics [16]; reduces apoptosis of rat testicular germ cells and protects testis against injury associated with reperfusion after experimental testicular torsion [19,20]; increases sperm motility in healthy mice [21]; enhanced spermatogenesis through the stimulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and did not cause adverse effects in

healthy rats [13]. Thus, since several researches have established the effectiveness of RSV against OS, this study investigated the effects of RSV on sperm quality and OS parameters in testis of rats with triiodothyronine (T3)-induced hyperthyroidism.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

RSV was purchased from Pharma Nostra (Chengdu Hawk Bio Enginnerin, China) and its purity and structure were previously confirmed by chromatography and nuclear magnetic resonance, respectively [22]. T3 (3,3',5-Triiodo-L-thyronine) and all other reagent-grade chemicals were obtained from Sigma (St Louis, Missouri, USA).

2.2 Animals

Adult male Wistar rats (70-90 days; 130-200 g) were obtained from the Central Animal Breeding Facility of the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil. The animals were kept in polypropylene cages under controlled temperature ($23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and light-dark cycle of 12 h with water ad libitum and approximately 30 g of food per animal daily. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committe from the Federal University of Santa Maria (process 111/2011).

2.3 Experimental protocol

Rats (n=48) were randomly divided into six groups with eight animals each: control group (C), control group treated with 1 mg/kg of RSV (CR1), control group treated with 10 mg/kg of RSV (CR10), hyperthyroid group (H), hyperthyroid group treated with 1 mg/kg of RSV (HR1), and hyperthyroid group treated with 10 mg/kg of RSV (HR10).

Hyperthyroidism was induced by daily intraperitoneal injection (i.p.) of T3 at the dose of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight [5] for six weeks. T3 was dissolved using 2.5 mM of sodium hydroxide and the final solution was prepared with 0.9% saline. The rats of control groups (C, C1 and C10) received only equal volume of vehicle.

After two weeks, concomitantly to T3 treatment, animals received daily injections i.p. of RSV at dose of 1 mg/kg e 10 mg/kg freshly prepared in 25% ethanol during four weeks, totaling six experimental weeks. Control animals (C and H) received only i.p. injections of the vehicle solution in the same conditions. At the end of experimental period (six weeks), 24 h after the

last injections, animals were weighed, anesthetized with xylazine and ketamine and euthanized for removal of heart, testis, epididymis and prostate, which were immediately weighed.

2.4 Hormonal analysis

Blood samples were collected from the tail vein, separated by centrifugation (500 g for 10 min) and the serum was stored at -20°C for further analysis. Serum levels of T3 were determined by commercially available radioimmunoassay kit (CIS Bio International, Bedford, MA, USA). Thyroid stimulating hormone (TSH) levels were measured by radioimmunoassay method, using commercially available kit specific for rats (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Arlington Heights, IL, USA).

2.5 Removal of epididymis and retrieval of spermatozoa

The epididymis were excised and freed from the adherent and fat tissues. Cauda epididymal was separated from the epididymis, transferred to a petri plate and immersed in sterile silicone oil, near to a drop of 200 µl of Fert's medium. All reagents were adequately preheated. Longitudinal incisions were made in the cauda epididymal with a fine needle and a scalpel blade to release the spermatozoa. Sperm motility was evaluated by placing a 4 µl drop of Fert's medium containing spermatozoa on a slide, and then examining it under a light microscope at 100 x. Motility estimations were performed from three different fields in each sample and mean used as the final motility.

To analyze the morphology, sperm were kept in formaldehyde-citrate solution and two hundred sperm were analyzed for each animal. The analysis was performed by microscopy using differential interference contrast. Sperm were classified as percentage of normal or abnormal, being the most frequent abnormalities of the head, midpiece and tail.

2.6 Tissue homogenate preparation

Testis were immediately excised and frozen at -20°C. This tissue was homogenized in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) using a glass-Teflon grinder. The homogenate was centrifuged at 100 g for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris and the supernatant fraction obtained was frozen at -80°C for further measurements [23]. Protein concentrations were determined in the supernatant by the method of Lowry et al [24] using bovine albumin as standard.

2.7 Oxidative damage measurements

LPO was measured by the determination of lipid hydroperoxides with a modified version of the method of xylene orange by Jiang et al [25]. Reading was performed in spectrophotometer at 560 nm and the results were reported as nmol/mg protein. LPO was also estimated by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according with Buege and Aust [26]. Absorbance was measured at 535 nm and results were expressed as nmol/mg protein.

2.8 Antioxidant enzyme activities

Total SOD activity, expressed as USOD/mg protein, was based on the inhibition rate of autocatalytic adenochrome generation at 480 nm, according with Fridovich [27]. CAT activity was determined by the decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration at 240 nm and was expressed as pmol/mg protein [28]. GPx was measured through the system GSH/NADPH/glutathione reductase, by the dismutation of tert-butylhydroperoxide at 340 nm as described by Flohé and Gunzler [29]. Results were expressed as pmol/min/mg protein. GST activity, expressed as pmol/min/mg protein, was evaluated according Habig et al [30] by the rate of formation of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm, using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as substrate.

2.9 Nonenzymatic antioxidant (tissue sulfhydryl groups)

Tissue sulfhydryl groups (GSH) were measured at 412 nm after reaction with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). Proteins were eliminated through the addition of 0.5 M perchloric acid [31]. The thiol content was expressed as nmol/mg protein.

2.10 Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard error (SE). Levene's test was performed to evaluate the homogeneity of variances. Two-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test was used for comparison of means. All analyses were executed using Statistica 7.0. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Determination of thyroid state

Thyroid state of the different experimental groups was characterized by the physiological data reported in Table 1. As can be observed, H, HR1 and HR10 groups presented higher T3 and lower TSH serum concentrations than C; and also in relation to their respective controls (CR1 and CR10) ($P<0.05$). Moreover, hyperthyroid animals H, HR1 and HR10 presented lower body weight gain than C; and also in relation to their respective controls (CR1 and CR10) ($P<0.05$). The ratio of heart weight to body weight (HW/BW) was calculated to estimate cardiac hypertrophy. This ratio was higher in H, HR1 and HR10 than in C ($P<0.05$); and also in relation to their respective controls (CR1 and CR10) ($P<0.05$). There are no significant difference among H, HR1 and HR10 (Table 1).

3.2 Testis, epididymis and prostate weights

The ratio of testis, epididymis and prostate weights to body weight was also calculated in different groups to estimate the hypertrophy of these tissues. The results indicate hypertrophy in testis of the H and HR10 when compared to C ($P<0.05$), and also in relation to its respective control (CR10) ($P<0.05$); however, HR1 did not present increase on the ratio of testis weight to body weight when compared to C and CR1. Moreover, epididymal hypertrophy occurred in H, HR1 and HR10 when compared to C ($P<0.05$) and also in relation to their respective controls (CR1 and CR10) ($P<0.05$). In prostate, hypertrophy was observed only when H animals was compared to C ($P<0.05$); such difference did not occur in the other groups (Table 2).

3.3 Sperm motility and morphology

Sperm motility was 30% lower in H than in C. On the other hand, HR1 did not differ significantly from C. Besides HR10 not differ from C, it presented sperm motility 36% higher than H ($P<0.05$). The percentage of total morphological abnormalities in epididymal sperm did not show significant difference among the experimental groups (Table 3).

3.4 Oxidative damage

Hydroperoxide levels, determined by xylenol orange, were 85% higher in H animals than in C ($P<0.05$). The treatment with RSV prevented this increase, and hydroperoxides levels in HR1 and HR10 were 32% and 42% lower, respectively, than in H ($P<0.05$) (Table 4).

TBARS levels were 39% higher in H than in C ($P<0.05$). However, RSV treatment reduced TBARS levels in HR1 (35%) and HR10 (52%) groups when compared to H ($P<0.05$),

resuming to C levels. CR1 and CR10 did not present changes in lipid hydroperoxides and TBARS levels when compared to C, showing that RSV had no effect alone (Table 4).

3.5 Antioxidant enzyme activities

SOD activity did not differ across the different experimental groups. CAT and GPx activities were 31% and 32%, respectively, lower in H than in C ($P<0.05$). RSV treatment prevented the decrease in the activities of these enzymes, since HR1 and HR10 presented an increase of 46% in CAT and of 42% in GPx activities when compared to H ($P<0.05$).

In H, GST activity was 152% higher than in C ($P<0.05$). The treatment with RSV was able to reduce 58% of this increase in the GST activity in both HR1 and HR10 ($P<0.05$). There are no significant differences in the antioxidant enzyme activities in testis in CR1 and CR10 animals when compared to C (Table 5).

3.6 Nonenzymatic antioxidant (tissue sulfhydryl groups)

GSH values did not differ across the different experimental groups (Table 5).

4 Discussion

Results showed that experimental hyperthyroidism induced by T3 administration (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was successfully achieved as observed from the elevation in serum T3 levels associated to a reduction in serum TSH levels. This condition was further supported by the decrease in the body weight gain presented by hyperthyroid animals. Cardiac hypertrophy also confirmed the hyperthyroid state. These data are consistent with the increased catabolic activity described in hyperthyroidism and are similar to those described in the literature [3,32].

Zamoner et al [3] demonstrated that T3 treatment (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$) caused testicular hypertrophy in pup rats (8 day old) and attributed this finding to an accelerated testis maturation induced by TH. Data of the present study showed hypertrophy in testis, epididymis and prostate of adult hyperthyroid animals. It might be due to accelerated metabolic rate present in hyperthyroidism. Hyperthyroid animals treated with RSV at 1 mg/g did not present hypertrophy in testis. The same was observed in prostate of hyperthyroid rats treated with both RSV dose (1 and 10 mg/kg), showing a possible effect of RSV in preventing hypertrophy of these organs.

Kumar et al [33] reported that hyperthyroidism induced by L-thyroxine (T₄) (2.5 µg/kg) decreased sperm motility in rats. Accordingly, results of the present study also showed that hyperthyroidism decreased sperm motility. However, 1 and 10 mg/kg RSV treatment were able to prevent the loss of sperm mobility of hyperthyroid rats and did not exhibit any adverse effect on sperm quality, since it was not observed sperm morphological abnormalities in the different experimental groups. In agreement with findings, Shin et al [21] showed that oral RSV treatment (50 mg/kg) in healthy mice enhanced epididymal sperm motility and did not cause any adverse effect on sperm quality.

One of the most important causes of defective sperm function is OS [34]. At the level of the isolated spermatozoid, ROS can induce LPO and DNA fragmentation, disrupting the sperm motility; while at the level of the testis, OS is capable of disruption the steroidogenic capacity of Leydig cells and the capacity of the germinal epithelium to differentiate normal spermatozoa, affecting male fertility [35]. The data of the present study further indicate that the treatment with both RSV doses, 1 and 10 mg/kg, were able to prevent the OS in the testis by preventing LPO and modulate the activity of antioxidant enzymes, which were clearly modified by T₃ treatment. This TH is able to increase mitochondrial respiration by many complex changes in the number and activity of mitochondrial respiratory chain components. Thus, an accelerated mitochondrial electron transport, brought about by a TH-induced hyper metabolic state, increases ROS generation, which might readily start the process of LPO in many cell types [5,28] such as spermatozoa. These cells are susceptible to oxidative damage due to the high content of polyunsaturated fatty acids within their plasma membrane and such damage may underlie several aspects of male infertility [10].

Experimental hyperthyroidism induced by T₃ administration (80 µg/kg) is associated with an increase in LPO levels in testis [3]. LPO in its early stage could be detected by lipid hydroperoxides measurement, while the final products of LPO are seen through TBARS [36]. Our data showed that RSV treatment was able to decrease both, lipid hydroperoxides and TBARS levels in testis, minimizing the oxidative damage, which are observed in the hyperthyroid animals. Kasdallah-Grissa et al [14] described the protective effects of RSV (5 mg/kg) added to the diet on LPO induced by ethanol in testis of rats. However, until now there were no studies showing the effects of RSV on oxidative damage caused by hyperthyroidism in testis. Previous data reported only the action of other antioxidants, such as melatonin (0.3 mg/kg, i.p.) [12] and vitamin E (200 mg/kg, v.o.) [9], which are efficient in protecting testis of rats from the increase in TBARS levels generated by T₄.

Besides the increase in LPO levels, changes in antioxidant defenses were also described in testis of hyperthyroid rats [3,8,9]. Antioxidant enzymes that form the first line of defense against ROS on the organism include SOD, CAT and GPx. SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion into H₂O₂, which is then degraded to water by CAT or by GPx [17]. GPx employs GSH as electron donor. The oxidized form of glutathione is again reduced by the action of glutathione reductase and NADPH as electron donor [37].

The data of this study showed that SOD did not change across the different experimental groups. In contradiction, some authors reported a decrease in SOD activity in testis of hyperthyroid rats [3,8,9]. On the other hand, T4-treatment did not affect hepatic SOD activity [38,39]. Such differences might be attributed to the diverse experimental conditions.

Results showed that both doses of RSV reversed the decrease in CAT and GPx activities found in testis of hyperthyroid rats. However, no data in the literature reports the action of RSV on the CAT and GPx activities in testis. According to findings, vitamin E treatment was able to reverse the changes in CAT and GPx activities in this tissue of hyperthyroid rats, as demonstrated by Sahoo et al [9]. The capacity of RSV to scavenge ROS might be attributed to a hydrogen-electron donation from its hydroxyl groups [15]. RSV induces antioxidants and phase 2 enzymes, such as CAT and GST, respectively. Moreover, RSV increases the resistance to oxidative and electrophilic cell injury, as shown by Cao and Li [40].

GST is a phase 2 enzyme, that is critically involved in detoxification of xenobiotics as well as ROS through the conjugation of them to GSH, favoring, thus, the protection against LPO [37]. Results exhibited that RSV was able to restore the GST activity in testis of hyperthyroid rats to similar levels to control animals. Likewise, Sahoo et al [9] showed that vitamin E treatment also restored GST activity in this tissue in the same experimental conditions.

On the other hand, the present study demonstrated that GSH levels did not differ in testis of rats belonging to all experimental groups. Guerrero et al [7] demonstrated similar data in liver of rats treated with T4. There is no pattern of this non-enzymatic antioxidant in testis of hyperthyroid rats, since some authors reported a reduction [8,9] whereas other showed an increase in GSH content in this tissue in hyperthyroidism [3,12]. This contradicting finding may be attributed to duration of drug administration.

In conclusion, results of the present study demonstrated that RSV prevented the loss of sperm motility that may occur on hyperthyroidism. In addition, the present data showed, for the first time, that both 1 and 10 mg/g RSV doses decreased lipid hydroperoxides and TBARS levels; reversed the decrease in CAT and GPx activities; and restore the GST activity in testis of hyperthyroid rats, at least in this experimental condition, indicating the possible role of this

antioxidant compound in protecting this tissue against oxidative damage. Therefore, RSV might be a strategy for therapeutic intervention to preserve sperm motility and testicular function in hyperthyroidism. Furthermore, future researches might be carried out to determine molecular mechanisms underlying the protective effects of RSV on rat sperm and testis during hyperthyroidism.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES and CNPq for providing financial assistance during the tenure of research.

References

- [1] Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 2000;62:664-9.
- [2] Sahoo DK, Roy A, Chattopadhyay S, Chainy GBN. Effect of T3 treatment on glutathione redox pool and its metabolizing enzymes in mitochondrial and post-mitochondrial fractions of adult rat testis. *Indian J Exp Biology* 2007;45:338-46.
- [3] Zamoner A, Barreto KP, Filho DW, Sell F, Woehl VM, Guma FCR et al. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. *Mol Cell Endocrinol* 2007;267:116-26.

- [4] Mano T, Sinohara R, Sawai Y, Oda N, Nishida Y, Mokuno T et al. Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in the brain of hyper- and hypothyroid aged rats. *J Endocrinol* 1995;147:361-5.
- [5] Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol* 1997;155:151-7.
- [6] Tremellen K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum Reprod Updat* 2008;14:243-58.
- [7] Guerrero A, Pamplona R, Portero-Otín M, Barja G, López-Torres Mónica. Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver. *Free Radic Biol Med* 1999;26:73-80.
- [8] Choudhury S, Chainy GBN, Mishro MM. Experimentally induced hypo- and hyperthyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. *Andrologia* 2003;35:131-40.
- [9] Sahoo DK, Roy A, Chainy GBN. Protective effects of vitamin E and curcumin on L-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress. *Chem-Biol Interact* 2008;176:121-8.
- [10] Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunkumar A, Vignesh RC, Aruldas MM, Arunakaran J. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reprod Toxicol* 2007;23:239-45.
- [11] Baydas B, Meral I. Effects of melatonin on lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activity in rats with experimentally induced hyperthyroidism. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32:541-4.
- [12] Mogulkoc R, Baltaci AK, Oztekin E, Aydin L, Tuncer I. Hyperthyroidism causes lipid peroxidation in kidney and testis tissues of rats: Protective role of melatonin. *Neuroendocrinol Lett* 2005;26:806-10.

- [13] Juan ME, González-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodríguez-Gil JE, Planas JM. trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J Nutr* 2005;135:757-60.
- [14] Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A et al. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol* 2006;41:236-9.
- [15] Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, May ME, Gharbi N et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 2007;80:1033-9.
- [16] Jiang Y, Peng T, Luo Y, Li M, Lin Y. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione. *Chin Med J* 2008;121:1204-9.
- [17] Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierrez J et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie* 2011;30:1-10.
- [18] Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol* 2001;15:479-86.
- [19] Uguralp S, Usta U, Mizrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg* 2005;15:333-6.
- [20] Uguralp S, Mizrak B, Karabulut A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg* 2005;15:114-9.
- [21] Shin S, Jeon JH, Park D, Jang M, Choi JH, Choi B et al. trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum *ex vivo* and enhances testosterone levels and sperm quality *in vivo*. *Arch Pharm Res* 2008;31:83-7.

- [22] Busanello A, Barbosa NB, Peroza LR, Farias LE, Burger ME, Barreto, KP et al. Resveratrol protects against a model of vacuolar chewing movements induced by reserpine. *Behav Pharmacol* 2011;22:71-5.
- [23] Shrilatha B, Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *Int J Androl* 2007;30:508-18.
- [24] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- [25] Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991;26:853-6.
- [26] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-9.
- [27] Fridovich I. Superoxide and evolution. *Horizons Biochem Biophys* 1974;1:1-37.
- [28] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
- [29] Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. In: Packer L, editor. *Methods in Enzymology*, San Diego: Academic Press; 1984, p. 114-121.
- [30] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130-9.
- [31] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
- [32] Venditti P, De Rosa R, Di Meo S. Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. *Free Radical Biol Med* 2003;35:485-94.

- [33] Kumar PNS, Aruldas MM, Juneja SC. Influence of hyperthyroidism induced at prepuberty on the epididymal lipids, number and motility of spermatozoa in rats. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:373-8.
- [34] Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TIS, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril* 2008;89:1183-90.
- [35] Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008;1:15-24.
- [36] Finamor IA, Saccol EMH, Gabriel D, Ourique GM, Riffel APK, Konrad SP et al. Effects of parboiled rice diet on oxidative stress parameters in kidney of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Med Food* 2012;15:598-604.
- [37] Yang Y, Cheng JZ, Singhal SS, Saini M, Pandya U, Awasthi S. Role of glutathione S-transferase in protection against lipid peroxidation. *J Biol Chem* 2001;276:19220-30.
- [38] Seymen HO, Seven A, Civelek S, Yigit G, Hatemi H, Burçak G. Evaluation of antioxidant status in liver tissues: effect of iron supplementation in experimental hyperthyroidism. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1999;10:315-25.
- [39] Saicic ZS, Mijalkovic DN, Nikolic AL, Blagojevic DP, Spasic MB. Effect of thyroxine on antioxidant defence system in the liver of rats of different age. *Physiol Res* 2006;55:561-8.
- [40] Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol* 2004;489:39-48.

Table 1 Assessment of thyroid state of rats

Group	Parameter				
	T3 (ng/ml)	TSH (ng/ml)	Final body weight (g)	Weight gain (%)	HW/BW (mg/g)
C	0.206±0.023	1.759±0.034	332.3±12.4	54.1±5.0	3.09±0.12
CR1	0.214±0.015	1.804±0.028	336.2±12.0	55.9±3.2	3.05±0.05
CR10	0.194±0.014	1.696±0.023	319.5±12.8	55.5±3.7	3.13±0.008
H	0.940±0.105 ^a	0.369±0.020 ^a	282.2±10.9 ^a	20.4±3.8 ^a	4.18±0.27 ^a
HR1	0.856±0.046 ^{ab}	0.310±0.029 ^{ab}	272.6±9.1 ^{ab}	21.7±2.0 ^{ab}	3.91±0.17 ^{ab}
HR10	0.982±0.059 ^{ab}	0.338±0.020 ^{ab}	277.7±9.1 ^{ab}	31.4±3.0 ^{ab}	3.83±0.11 ^{ab}

Data represent the mean ± SE of eight experiments.

^a Denotes that data are significantly different from C at $P<0.05$.

^b Denotes that data are significantly different from respective CR1 or CR10 at $P<0.05$.

T3 = triiodothyronine; TSH = thyroid stimulating hormone; HW/BW = heart weight/body weight; C = control group; CR1 = control group treated with 1 mg/kg resveratrol; CR10 = control group treated with 10 mg/kg resveratrol; H = hyperthyroid group; HR1 = hyperthyroid group treated with 1 mg/kg resveratrol; HR10 = hyperthyroid group treated with 10 mg/kg resveratrol.

Table 2 Effects of induced hyperthyroidism and resveratrol on reproductive organs weights

Group	Parameter		
	TW/BW (mg/g)	EW/BW (mg/g)	PW/BW (mg/g)
C	5.29±0.14	1.49±0.08	1.19±0.12
CR1	5.31±0.18	1.53±0.05	1.31±0.11
CR10	5.59±0.19	1.59±0.07	1.38±0.22
H	6.27±0.27 ^a	1.75±0.05 ^a	1.76±0.25 ^a
HR1	5.85±0.25	1.73±0.06 ^{ab}	1.25±0.21
HR10	6.36±0.17 ^{ab}	1.82±0.03 ^{ab}	1.36±0.07

Data represent the mean ± SE of eight experiments.

^a Denotes that data are significantly different from C at $P<0.05$.

^b Denotes that data are significantly different from respective CR1 or CR10 at $P<0.05$.

TW/BW = testis weight/body weight; EW/BW = epididymis weight/body weight; PW/BW = prostate weight/body weight. C = control group; CR1 = control group treated with 1 mg/kg resveratrol; CR10 = control group treated with 10 mg/kg resveratrol; H = hyperthyroid group; HR1 = hyperthyroid group treated with 1 mg/kg resveratrol; HR10 = hyperthyroid group treated with 10 mg/kg resveratrol.

Table 3 Effects of resveratrol and hyperthyroidism on epididymal sperm motility and abnormalities

Group	Parameter	
	Sperm motility (%)	Total morphological abnormalities (%)
C	72.50±5.43	12.15±3.27
CR1	71.66±4.01	15.37±2.70
CR10	73.00±4.89	16.70±4.25
H	51.25±3.62 ^a	17.78±5.72
HR1	62.85±6.44	14.35±4.39
HR10	70.00±6.33 ^c	12.42±3.98

The data appear as the mean ± SE (n=8) .

^a Denotes that data are significantly different from C at $P<0.05$.

^c Denotes that data are significantly different from H at $P<0.05$.

C = control group; CR1 = control group treated with 1 mg/kg resveratrol; CR10 = control group treated with 10 mg/kg resveratrol; H = hyperthyroid group; HR1 = hyperthyroid group treated with 1 mg/kg resveratrol; HR10 = hyperthyroid group treated with 10 mg/kg resveratrol.

Table 4 Effects of resveratrol on oxidative damage in testis of control and hyperthyroid rats

Group	Parameter	
	Lipid hydroperoxides (nmol/mg protein)	TBARS (nmol/mg protein)
C	6.76±0.72	0.86±0.11
CR1	4.87±0.68	0.56±0.10
CR10	4.61±0.79	0.78±0.09
H	12.55±1.36 ^a	1.20±0.11 ^a
HR1	8.46±1.06 ^{bc}	0.77±0.10 ^c
HR10	7.21±0.84 ^c	0.57±0.07 ^c

The data appear as the mean ± SE (n=8) .

^a Denotes that data are significantly different from C at $P<0.05$.

^b Denotes that data are significantly different from respective CR1 or CR10 at $P<0.05$.

^c Denotes that data are significantly different from H at $P<0.05$.

TBARS = thiobarbituric acid reactive substances; C = control group; CR1 = control group treated with 1 mg/kg resveratrol; CR10 = control group treated with 10 mg/kg resveratrol; H = hyperthyroid group; HR1 = hyperthyroid group treated with 1 mg/kg resveratrol; HR10 = hyperthyroid group treated with 10 mg/kg resveratrol.

Table 5 Effects of resveratrol on antioxidant enzyme activities and nonenzymatic antioxidant concentrations in testis of control and hyperthyroid rats

Group	Parameters				
	SOD (USOD/ mg protein)	CAT (μ mol/mg protein)	GPx (μ mol/min/mg protein)	GST (μ mol/min/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)
C	2.47 \pm 0.10	0.57 \pm 0.04	9.58 \pm 0.71	2.25 \pm 0.51	1.59 \pm 0.01
CR1	2.41 \pm 0.17	0.55 \pm 0.04	9.01 \pm 0.81	1.74 \pm 0.26	1.64 \pm 0.02
CR10	2.56 \pm 0.25	0.55 \pm 0.03	8.28 \pm 0.47	1.63 \pm 0.16	1.63 \pm 0.01
H	2.23 \pm 0.12	0.39 \pm 0.05 ^a	6.42 \pm 0.41 ^a	5.67 \pm 1.29 ^a	1.62 \pm 0.02
HR1	2.46 \pm 0.17	0.57 \pm 0.02 ^c	9.14 \pm 0.49 ^c	2.39 \pm 0.28 ^c	1.61 \pm 0.02
HR10	2.43 \pm 0.11	0.57 \pm 0.04 ^c	9.17 \pm 0.96 ^c	2.34 \pm 0.27 ^c	1.59 \pm 0.02

The data appear as the mean \pm SE (n=8).

^a Denotes that data are significantly different from C at $P<0.05$.

^b Denotes that data are significantly different from respective CR1 or CR10 at $P<0.05$.

^c Denotes that data are significantly different from H at $P<0.05$.

SOD = superoxide dismutase; CAT = catalase; GPx = glutathione peroxidase; GST = glutathione-S-transferase; GSH = sulfhydryl groups; C = control group; CR1 = control group treated with 1 mg/kg resveratrol; CR10 = control group treated with 10 mg/kg resveratrol; H = hyperthyroid group; HR1 = hyperthyroid group treated with 1 mg/kg resveratrol; HR10 = hyperthyroid group treated with 10 mg/kg resveratrol.

5 CONCLUSÕES

O tratamento diário com RSV foi capaz de impedir a hipertrofia dos testículos e da próstata, além de prevenir a perda de motilidade dos espermatozóides causada pela administração de T3, melhorando a qualidade espermática nos animais hipertireóides. O RSV nas doses de 1 e 10 mg/kg também foi capaz de diminuir a LPO induzida pelo hipertireoidismo, uma vez que diminuiu a formação de hidroperóxidos lipídicos e os níveis de TBARS nos grupos tratados. Além disto, o RSV também se mostrou capaz de reverter a diminuição da atividade da CAT e da GPx nos animais hipertireóides, além de restaurar a atividade da GST nestes animais.

Estes resultados confirmam as propriedades antioxidantes do RSV e seu papel na proteção dos testículos contra o dano oxidativo induzido pelo estado hipertireóide. Portanto, o RSV pode ser uma estratégia para a intervenção terapêutica no hipertireoidismo com o objetivo de preservar a motilidade dos espermatozóides e a função testicular nesta condição. Além disso, estudos futuros devem ser realizados a fim de determinar os mecanismos moleculares responsáveis pelo efeito protetor do resveratrol sobre os espermatozóides e os testículos durante o hipertireoidismo.

6 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 86(4), p. 878-885, 2006.
- AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1(1), p. 15-24, 2008.
- BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5(6), p. 493–506, 2006.
- BAYDAS, B.; MERAL, I. Effects of melatonin on lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activity in rats with experimentally induced hyperthyroidism. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 32(7), p. 541-544, 2005.
- BELGUENDOZ, L.; FREMONT, L.; LINARD, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**, v. 53(9), p. 1347-1355, 1997.
- BENITEZ, D. et al. Mechanism involved in resveratrol–induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer–derived cell lines. **Journal of Andrology**, v. 28(2), p. 282-293, 2007.
- BOELAERT, K.; FRANKLYN, J.A. Thyroid hormone in health and disease. **Journal of Endocrinology**, v. 187 (1), p. 1-15, 2005.
- BRADAMANTE, S.; BARENGHI, L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effect of resveratrol. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 22(3), p. 169-188, 2004.
- BUZZARD, J.J. et al. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 62(3), p. 664-669, 2000.
- CARANI, C. et al. Multicenter study of the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90(12), p. 6472-6479, 2005.
- CHEN, H. et al. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. **Experimental Gerontology**, v. 40(8-9), p. 728-36, 2005.
- CHEN, Y. et al. Effects of genistein, resveratrol and quercetin on steroidogenesis and proliferation of MA-10 mouse Leydig tumor cells. **Journal of Endocrinology**, v. 192(3), p.527-537, 2007.
- CHOUDHURY, S.; CHAINY, G.B.N.; MISHRO, M.M. Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. **Andrologia**, v. 35(3), p. 131-140, 2003.

- CLYDE, H.R.; WALSH P.C.; ENGLISH R.W. Elevated plasma testosterone and gonadotropin levels in infertile males with hyperthyroidism. **Fertility and Sterility**, v. 27(6), p. 662-666, 1976.
- COLLODELA, G. et al. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. **Reproductive Toxicology**, v. 31(2), p. 239–246, 2011
- DEL MAESTRO, R.F. An approach of free radicals in medicine and biology. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 40(7), p. 153-168, 1980
- DOLINSKY, V.W. et al. Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. **Circulation**, v. 119(12), p. 1643-1652, 2009.
- EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p.29-77.
- FERRETTI, G. et al. Effect of genistein against copper-induced lipid peroxidation of human high density lipoproteins (HDL). **Atherosclerosis**, v. 172(1), p. 55-61, 2004.
- FRÉMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sciences**, v. 64(26), p. 2511–2521, 1999.
- FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66(8), p. 663-673, 2000.
- FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. **Horizons Biochem Biophys**, v. 1, p. 1-37, 1974.
- GREDILLA, R.; BARJA, G.; LÓPEZ-TORRES, M. Thyroid hormone-induced oxidative damage on lipids, glutathione and DNA in the mouse heart. **Free Radicals Research**, v. 35(4); p. 417-425, 2001.
- GUERRERO, A. et al. Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(1-2), p.73-80, 1999.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiología Médica** 10^a ed, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan SA, 2002.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. **Free Radical Research**, v. 25(1), p. 57-74, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4rd ed. New York: Oxford University Press, 2007.
- HARRIS, E.D. Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB Journal**, v. 6(9), p. 2675-2683, 1992.

- HUDSON, A. et al. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9(11), p. 1169-1176, 2000.
- JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, v. 275(5297), p. 218-220, 1997.
- JANNINI, E.A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. **Endocrine Reviews**, v. 16(4), p. 443-459, 1995.
- JANNINI, A. et al. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.85(9), p.3453-3457, 2000.
- JOHNSTON, J.H. The undescended testis. **Archives of Diseases in Childhood**, v. 40(210), p.113-122, 1965.
- JIANG, Y. et al. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione. **Chinese Medical Journal**, v. 121(13), p. 1204-1209, 2008.
- JUAN, M.E. et al. trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 757-760, 2005.
- KAO, S.H. et al. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. **Fertility Sterility**, v. 89(5), p. 1183-1190, 2008.
- KASDALLAH-GRISSA, A. et al. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. **Alcohol and Alcoholism**, v. 41(3), p. 236-239, 2006.
- KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid hormone and cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 344(1), p. 501-509, 2001.
- KOVACIC, P; SOMANATHAN, R. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity. Focus on antioxidant action, cell signaling and safety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3(2), p. 86-100, 2010.
- KRASSAS, G.E. et al. A prospective controlled study of the impact of hyperthyroidism on reproductive function in males. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87(8), p.3667-3671, 2002.
- KRASSAS, G.E.; PERROS, P. Thyroid disease and male reproductive function. **Journal of Endocrinological Investigations**, v. 26(4), p. 372-380, 2003.
- KRISHNAMOORTHY, G. et al. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 23(2), p. 239-245, 2007.
- KUMAR, P.N.S.; ARULDHAS, M.M.; JUNEJA, S.C. Influence of hyperthyroidism induced at prepuberty on the epididymal lipids, number and motility of spermatozoa in rats. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8(3), p. 373-378, 1996.

- MANO, T. et al. Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in the brain of hyper- and hypothyroid aged rats. **Journal of Endocrinology**, v. 147, p. 361-365, 1995.
- MOGULKOC, R. et al. Hyperthyroidism causes lipid peroxidation in kidney and testis tissues of rats: Protective role of melatonin. **Neuroendocrinology Letters**, v. 26(6), p. 806-810, 2005.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analyze of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3(5), p. 403-439, 1997.
- NARDINI, M. et al. Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an in vivo study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392 (1), p. 157-160, 1997.
- NOMOMURA, S.; KANAGAWA, H.; MAKIMOTO, A. Chemical constituents of polygonaceous plants I studies the components of ko-jo-kon (Polygomonum Capsidatum–SIEB et Zucc). **Yakugaku. Zasshi**, v. (83), p. 988-990, 1963.
- O'DONNELL, L. et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 22(3), p. 289-318, 2001.
- PELTOLA, V. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. **Journal of Andrology**, v.15, p.353-61, 1994.
- REVEL, A. et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. **Reproductive Toxicology**, v.15(5), p. 479-486, 2001.
- SAHOO, D.K. et al. Effect of T3 treatment on glutathione redox pool and its metabolizing enzymes in mitochondrial and post-mitochondrial fractions of adult rat teste. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45(2), p.338-46, 2007.
- SAHOO, D.K.; ROY, A.; CHAINY, G.B.N. Protective effects of vitamin E and curcumin on L-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 176(2-3), p. 121-128, 2008.
- SAICIC, Z.S. et al. Effect of thyroxine on antioxidant defence system in the liver of rats of different age. **Physiological Research**, v. 55(5), p. 561-568, 2006.
- SCHMATZ, R et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**, v. 30(2), p. 1-10, 2011.
- SCHWARTZ, H.L.; OPPENHEIMER, J.H. Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 3(3), p. 349-376, 1978.
- SEYMEN, H.O. et al. Evaluation of antioxidant status in liver tissues: effect of iron supplementation in experimental hyperthyroidism. **Journal of Basic & Clinical Physiology & Pharmacology**, v. 10(4), p. 315-325, 1999.

SHIN, S. et al. trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 83-87, 2008.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91(3), p. 31-37, 1991.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v. 215(2), p. 213-219, 1993.

SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrine Reviews**, v. 12(1), p.45-77, 1991.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose has gone? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30(2), p. 91-113, 1997.

SOLEAS, G.; YAN, J.; GOLDBERG, D. Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. **Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications**, v. 757(1), p. 161-172, 2001.

SPANIER, G.; Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60(4), p. 111-116, 2009.

TANNO, M. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. **The Journal of Biological Chemistry** v. 285(11), p. 8375-8382, 2010.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v. 14(3), p. 243-258, 2008.

UGURALP, S.; USTA, U.; MIZRAK, B. Resveratrol may reduces apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. **European Journal of Pediatric Surgery**, v. 15(5), p. 333-336, 2005.

UNGVARI, Z. et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 292(5), p. 2417-2424, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39(1), p. 44-84, 2007.

VANG, O. et al., What is new for an old molecule? Systematic reviews and recommendations on the use of resveratrol. **Plos One**, v. 6, p. 1-11, 2011.

VENDITTI, P. et al. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. **Journal of Endocrinology**, v. 155(1), p. 151-157, 1997.

VENDITTI, P.; DE ROSA, R.; DI MEO, S. Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35(5), p. 485-94, 2003.

VENTURINI, C.D. et al. Resveratrol and red wine function as antioxidants in the central nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3(6), p. 434-441, 2010.

YU, P.B. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74(1), p. 139-162, 1994;

YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, v. 81(3); p. 1097-1142, 2001.

WAGNER, M.S.; WAJNER, S.M.; MAIA, A.L. Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis? **Microscopy Research and Technique**, v. 72(11), p. 796-808, 2009.

WAJNER, S.M.; WAGNER, M.S.; MAIA, A.L. Clinical implications of altered thyroid status in male testicular function. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53(8), p. 976-982, 2009.

WOO, K. et al. Elevated gadd153/chop expression during resveratrol induced apoptosis in human colon cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 73(1), p. 68-76, 2007.

WU, K. Aspirin and other cyclooxygenase inhibitors: New therapeutic insights. **Seminars in Vascular Medicine**, v. 3(2), p. 107-112, 2003.

ZAMONER, A. et al. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 267(15), p. 116-126, 2007.

ZANGAR, R.C.; DAVYDOV, D.R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicology Applied to Pharmacology**, v.199(3), p. 316-331, 2004.