

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES

**EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM DIMETILSULFÓXIDO, ÁCIDO LIPÓICO
OU TERNATINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS JOVENS
SUBMETIDOS À TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO**

FORTALEZA
2005

SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES

**EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM DIMETILSULFÓXIDO, ÁCIDO LIPÓICO OU
TERNATINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS
À TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

**FORTALEZA
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

G98e Guimarães, Sérgio Botelho
Efeitos do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico ou
ternatina sobre o estresse oxidativo em ratos jovens submetidos à
torção do cordão espermático / Sérgio Botelho Guimarães. -
Fortaleza, 2005.
125 f.: il.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Cirurgia.
1. Antioxidantes. 2. Testículo. 3. Ratos. 4. Estresse oxidativo. 5.
Lipídios da membrana celular – peroxidação. 6. Malonaldeído. 7.
Glutathione. I. Vasconcelos, Paulo Roberto Leitão de (Orient) II.
Título

CDD: 612.01575

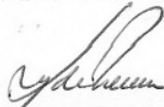
SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES

EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM DIMETILSULFÓXIDO, ÁCIDO LIPÓICO OU
TERNATINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS
À TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO

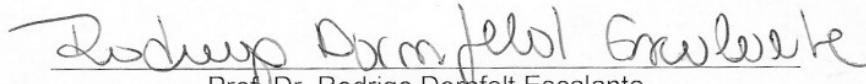
Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em 12/12/2005

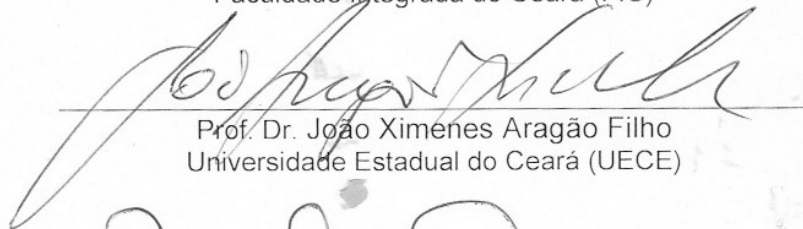
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr.^a Lydia Masako Ferreira
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)



Prof. Dr. Rodrigo Domínguez Escalante
Faculdade Integrada do Ceará (FIC)



Prof. Dr. João Ximenes Aragão Filho
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Prof. Dr. Manoel Odório de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

**Ao nosso Senhor Jesus Cristo, o autor de
minha fé, sempre presente em minha vida,
pela sua imensa misericórdia e disposição
em nos presentear com a vida eterna.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, por sua disponibilidade e paciência no esclarecimento das muitas dúvidas que me afligiram, tanto no desenvolvimento do delineamento do estudo e na análise dos resultados como na resolução das dificuldades enfrentadas ao longo deste trabalho.

Aos Professores Doutores Lídia Masako Ferreira da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rodrigo Dornfeld Escalante, da Faculdade Integrada do Ceará (FIC), João Ximenes Aragão Filho da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e Manoel Odorico de Moraes Filho, Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, pela honrosa participação na Banca de Defesa desta Tese.

Aos Professores Doutores Francisco Sérgio Pinheiro Regadas e Lusmar Veras Rodrigues pela participação na Banca de Qualificação e pelas oportunas e generosas sugestões, contribuindo significativamente para o aprimoramento deste manuscrito.

Aos Professores Doutores Manasses Claudino Fonteles, Magnífico Reitor da Universidade Mackensie (São Paulo) e Otoni Cardoso do Vale, do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, pela doação do ácido α -lipóico utilizado no experimento e ao Doutor Wellington Forte Alves, Cirurgião Vascular, pela doação do "kit" (Oxford TA 01) para o ensaio colorimétrico dos antioxidantes plasmáticos.

Ao Professor Doutor Everardo R. Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pelo isolamento da ternatina utilizada no experimento.

Ao Professor Adjunto José Ulisses de Sousa Melo, do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, por sua importante cooperação na obtenção da ternatina utilizada no experimento.

Ao Doutor Domingos Barreto da Silva pela ajuda técnica na aferição do peso e distribuição do ácido lipóico (pó) em alíquotas, para posterior utilização no experimento.

À Doutora Regilane Matos da Silva, farmacêutica-bioquímica, pela prestimosa ajuda nos cálculos estatísticos e na técnica de diluição da ternatina utilizada nos experimentos.

Aos valorosos estudantes de Medicina Jefferson Menezes Viana Santos, Paulo Hudson Uchoa Barbosa, Alan Arruda Aragão e Osamu de Sanders Kimura pela dedicada participação na fase experimental deste trabalho.

Aos meus filhos Lucas Brito Bastos Guimarães, estudante de Fisioterapia, e Isaac Beviláqua de Albuquerque Guimarães, pré-universitário, pela participação nas diversas etapas experimentais deste trabalho, realizadas na calada da noite.

À Sra. Maria Luciene Vieira de Oliveira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia pela dedicação, competência e carinho dispensados aos alunos de pós-graduação.

Ao Sr. Francisco Evanir Gonçalves de Lima, técnico da Unidade de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pelos esclarecimentos técnicos e presteza na preparação e execução dos ensaios laboratoriais e ao Sr. Bento Francisco de Oliveira, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina (UFC), pelos cuidados prestados aos animais experimentais alojados no biotério.

À bióloga Febe Gemmille e ao médico veterinário Francisco de Castro Junior, estagiários do biotério de Farmacologia, pela ajuda na obtenção e identificação sexual dos ratos utilizados no experimento.

À Sra. Francisca Maria de Oliveira, bibliotecária da Faculdade de Medicina (UFC) pela correta identificação dos descritores e elaboração da ficha catalográfica.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para execução deste trabalho.

" Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima. "

Louis Pasteur

RESUMO

EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM DIMETILSULFÓXIDO, ÁCIDO LIPÓICO OU TERNATINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS À TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO. SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

O efeito protetor do dimetilsulfóxido (DMSO), do ácido lipóico (LA) e da ternatina (TN), conhecidos seqüestradores de radicais livres e protetores da membrana celular foram avaliados utilizando um modelo experimental de isquemia/reperfusão do testículo. Cento e vinte ratos Wistar jovens com peso médio de 174 g foram distribuídos ao acaso em cinco grupos (GS - Simulado, GC – Controle, GD – Dimetilsulfóxido. GA – Ácido lipóico e GT/D – Ternatina/DMSO) numericamente iguais e posteriormente redistribuídos em quatro subgrupos (T-0, T-1, T-3 e T-6), com seis animais cada. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob os efeitos da anestesia geral inalatória. Os animais receberam injeções intraperitoniais (i.p.) de solução aquosa de DMSO a 3% (10 ml/kg, GD), LA (10 mg/kg, GA) ou TN+DMSO (12 mg/kg, GT/D, em solução aquosa de DMSO a 3%) 24, 12 e 4 horas antes da destorção do cordão espermático. A última dose foi administrada uma hora antes da indução da isquemia ou da segunda operação simulada (Sham). Os ratos do grupo Simulado (GS) e do grupo Controle (GC) receberam de NaCl 0,9% (10 ml/Kg) i.p. Foram determinadas as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona reduzida (GSH) no tecido (testículo), e a capacidade antioxidante total (CAP) do plasma. Para determinação do padrão de distribuição das amostras utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando-se o teste t de Student. Para as comparações dos grupos tratados com antioxidantes ao grupo Controle (GC) utilizou-se a análise de variância (ANOVA – teste de Dunnett). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. A torção do cordão espermático induziu uma redução significativa das concentrações de TBARS, no tempo máximo de isquemia e na reperfusão, em ratos pré-tratados com DMSO (GD) e LA (GA) e durante a reperfusão naqueles pré-tratados com TN/DMSO (GT/D), comparados com seus respectivos controles. Os níveis de TBARS estavam significativamente elevados nos ratos do grupo GC comparados aos animais do grupo GS, no tempo máximo de isquemia e durante a reperfusão, bem como uma hora após a destorção (T-1) comparada ao T-0, demonstrando o dano adicional decorrente do afluxo de sangue oxigenado (reperfusão) ao tecido isquêmico. As concentrações de GSH diminuíram nos ratos pré-tratados com solução salina e aumentaram significativamente nos ratos pré-tratados com DMSO ou LA, no tempo máximo de isquemia e durante a reperfusão. O modelo isquêmico utilizado não foi capaz de gerar efeitos sistêmicos. A capacidade antioxidante total aumentou significativamente durante a reperfusão (T-1) nos ratos pré-tratados com LA (GA) e TN/DMSO (GT/D) comparados aos respectivos controles. Esses resultados fortalecem a hipótese de que a isquemia e reperfusão são processos geradores de radicais livres. Os diferentes antioxidantes estudados mostraram grande eficiência na proteção da membrana celular, reduzindo a peroxidação lipídica, em todos os experimentos. O aumento dos níveis de glutathiona reduzida, nos ratos pré-tratados com DMSO e LA, mostra que estes antioxidantes exercem uma proteção eficaz contra o estresse oxidativo induzido pela isquemia/reperfusão em ratos submetidos à torção do cordão espermático por três horas. Os efeitos protetores da ternatina se manifestam com maior intensidade no tecido isquêmico, no controle da peroxidação lipídica.

DESCRITORES: Antioxidantes. Testículo. Ratos. Estresse oxidativo. Lipídios da membrana celular – peroxidação. Malonaldeído. Glutathiona.

ABSTRACT

EFFECTS OF DIMETHYLSULFOXIDE, LIPOIC ACID OR TERNATIN PRETREATMENT UPON THE OXIDATIVE STRESS IN YOUNG RATS SUBJECTED TO TORSION OF THE SPERMATIC CORD. SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES. Thesis (Doctorate). Post-Graduation Program (*Stricto Sensu*) in Surgery. Federal University of Ceará. Professor: Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

The protective role of dimethylsulfoxide (DMSO), lipoic acid (LA) and ternatin (TN), known free radical scavengers and cell membrane protectants were evaluated in an experimental model of testis ischemia/reperfusion. One hundred and twenty young male Wistar rats, mean weight 172.5 ± 15 g, were randomized in five equal groups (GS - Sham, GC - Control, GD - Dimethylsulfoxide, GA - Lipoic acid and GT/D - Ternatin/DMSO). Rats of each group were distributed into four subgroups (T-0, T-1, T-3 and T-6), each comprising six animals. All surgical procedures were performed under inhalatory ether anesthesia. Experimental rats received intraperitoneal (i.p.) injections of 3% aqueous solution of DMSO (10 ml/kg, GD), LA (10 mg/kg, GA) or TN/DMSO (12 mg/kg, suspended in 3% aqueous solution of DMSO), GT/D) 24, 12 and 4 hours before cord detorsion. Last dose was given 1 hour before ischemia induction or second Sham operation. Sham (GS) and Control (GC) rats received NaCl 0.9% 10 ml/Kg i.p. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reduced glutathione (GSH) levels ($\mu\text{mol/g}$ wet tissue) were assayed in testis. Total Antioxidant Power (TAP) (μM) was measured in blood plasma. Data were first analyzed by Kolmogorov-Smirnov test to assess differences in the general shapes of distribution. Comparisons between groups were made using Student's t test. P values of <0.05 were considered to indicate statistical significance. Comparisons between antioxidant-treated and saline-treated rats (Control group, GC) were made using analysis of variance (ANOVA - Dunnett's test). Spermatic cord torsion induced significant decrease in testis TBARS levels during ischemia and reperfusion in DMSO (GD) and LA (GA) and in TN/DMSO (GT/D) treated rats during reperfusion, compared with respective controls. TBARS levels were significantly increased in GC compared with Sham (GS) rats at the end of the ischemia and during reperfusion as well as one hour after detorsion (T-1) in GC rats compared with T-0, in the same group, indicating additional damage imposed by the afflux of oxygenated blood (reperfusion) to the ischemic tissues. GSH levels decreased significantly in saline-treated (GC) compared with Sham-operated rats and increased significantly in DMSO and LA treated rats at the end of ischemia and during reperfusion. The model utilized in this study did not induce systemic effects. TAP was significantly increased during reperfusion (T-1) in LA (GA) and TN/DMSO (GT/D) pretreated rats, compared with respective controls. The results of the present study reinforce the hypothesis that ischemia and reperfusion are free radicals generating processes. The different antioxidants studied here have demonstrated great efficacy in cell membrane protection by decreasing lipid peroxidation in all experiments. Increased reduced glutathione levels in DMSO and LA treated rats support the view that these substances can exert a protective effect against testis oxidative stress injury caused by ischemia/reperfusion in rats subjected to torsion of the spermatic cord lasting three hours. TN protective effects in reducing lipoperoxidation were more pronounced in ischemic tissues.

KEY WORDS: Antioxidants. Testis. Rats. Oxidative stress. Cell membrane lipids - peroxidation. Malonaldehyde. Glutathione.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição dos grupos e subgrupos.....	16
FIGURA 2 – Desenho do estudo.....	18
FIGURA 3– Modelo de torção do cordão espermático.....	19
FIGURA 4– Fixação do testículo - técnica atraumática	19
FIGURA 5– Cor da gônada ao término do procedimento cirúrgico (torção do cordão espermático).	23
FIGURA 6–Sutura do escroto – aspecto final.....	23
FIGURA 7– Cor do testículo após três de isquemia, antes da destorção do cordão espermático (T-0).....	23
FIGURA 8– Cor do testículo após três horas de isquemia e uma hora de reperfusão (T-1).....	23
FIGURA 9– Cor do testículo após três horas de isquemia e três horas de reperfusão (T-3).....	23
FIGURA 10– Cor do testículo após três horas de isquemia e seis horas de reperfusão (T-6)	23
FIGURA 11– Fluxograma do experimento	24
FIGURAs 12 e 13 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/reperfusão (GC)	33
FIGURA 14- Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os subgrupos Trauma vs. Pós-trauma, em ratos tratados com solução salina (grupo Simulado) e submetidos ao trauma	34
FIGURA 15- Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os subgrupos Isquemia vs. Reperfusão em ratos tratados com solução salina (grupo Controle) e submetidos à torção/destorção do cordão espermático.....	34
FIGURAS 16 e 17 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC) vs. Dimetilsulfóxido (GD) tratados, respectivamente, com solução salina e dimetilsulfóxido e submetidos à torção /destorção do cordão espermático	35
FIGURAS 18 e 19- Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC) vs. Grupo Ácido lipóico (GA),	

tratados, respectivamente, com solução salina e ácido lipóico e submetidos à torção/destorção do cordão espermático	36
FIGURAS 20 e 21- Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina /DMSO (GT/D), tratado com ternatina+DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático	37
FIGURAS 22 e 23- Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD – Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina+DMSO) ao grupo GC - Controle , pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0).....	38
FIGURAS 24 e 25- Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina+DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperfusão (T1+T3+T-6)	39
FIGURAS 26 e 27 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/ reperfusão (GC) ...	40
FIGURAS 28- Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /g}$) no testículo, comparando-se os subgrupos Trauma vs. Pós-trauma, em ratos tratados com solução salina e submetidos ao trauma (grupo Simulado)	41
FIGURAS 29- Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /g}$) no testículo, comparando-se os subgrupos Isquemia vs. Reperfusão em ratos tratados com solução salina (GC)	41
FIGURAS 30 e 31- Concentrações de GSH ($\mu\text{mol /g}$) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC) vs. Dimetilsulfóxido (GD) tratados, respectivamente, com solução salina e dimetilsulfóxido e submetidos à torção/destorção do cordão espermático	42
FIGURAS 32 e 33 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se grupos Controle (GC), tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), tratado com ácido lipóico, submetidos à torção/destorção do cordão espermático.....	43
FIGURAS 34 e 35 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina +DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático	44
FIGURAS 36 e 37 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle ,	

pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)	45
FIGURAS 38 e 39 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle , pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperfusão (T-1+T-3+T-6)	46
FIGURAS 40 e 41- Capacidade antioxidante total do plasma (μM), comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/reperfusão (GC)	47
FIGURAS 42- Capacidade antioxidante total no plasma (μM) de ratos pré-tratados com solução salina, comparando-se os subgrupos Trauma vs. Pós-trauma, em ratos tratados com solução salina (grupo Simulado) e submetidos ao trauma.....	48
FIGURAS 43 - Capacidade antioxidante total no plasma (μM), comparando-se os sub-grupos Isquemia vs. Reperfusão (grupo Controle), em ratos pré-tratados com solução salina e submetidos à torção/destorção do cordão espermático	48
FIGURAS 44 e 45 - Capacidade antioxidante total no plasma (μM), comparando-se os grupos Controle (GC), tratado com solução salina e DMSO (GD), tratado com dimetilsulfóxido, e submetidos à torção/destorção do cordão espermático.....	49
FIGURAS 46 e 47 - Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se grupos Controle, tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), submetidos à torção/destorção do cordão espermático	50
FIGURAS 48 e 49 - Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina+DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático	51
FIGURAS 50 e 51 - Capacidade Antioxidante Total no plasma, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle , pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)	52
FIGURAS 52 e 53 - Capacidade Antioxidante Total no plasma, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle , pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, durante a reperfusão (T-1 + T-3)	53

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), em ratos pré-tratados tratados com solução salina 42
- TABELA 2 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se Trauma vs. Pós-trauma (grupo Simulado), em ratos pré-tratados com solução salina 43
- TABELA 3 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se Isquemia vs. Reperusão (grupo Controle), em ratos pré-tratados com solução salina 43
- TABELA 4 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos os grupos Controle, tratado com solução salina e DMSO (GD), tratado com dimetilsulfóxido..... 44
- TABELA 5– Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se grupos Controle (GC), tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), tratado com ácido lipóico 45
- TABELA 6 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina + DMSO 46
- TABELA 7 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes [(DMSO (GD), Ácido lipóico (GA) ou Ternatina/DMSO (GT/D)], entre si e ao grupo pré-tratado com solução salina (GC), todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)..... 47
- TABELA 8 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes [(DMSO (GD), Ácido lipóico (GA) ou Ternatina/DMSO (GT/D)], entre si e ao grupo pré-tratado com solução salina (GC), todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperusão (T1+T3+T-6)..... 48
- TABELA 9 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), em ratos pré-tratados tratados com solução salina 49
- TABELA 10 –Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se Trauma vs. Pós-trauma (grupo Simulado), em ratos pré-tratados com solução salina 43
- TABELA 11 –Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se Isquemia vs. Reperusão (grupo Controle), em ratos pré-tratados com solução salina 43

TABELA 12–	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC), tratado com solução Salina e DMSO (GD), tratado com dimetilsulfóxido.....	51
TABELA 13–	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se grupos Controle (GC), tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), tratado com ácido lipóico	52
TABELA 14–	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina / DMSO (GT/D), tratado com ternatina + DMSO	53
TABELA 15–	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes [(DMSO (GD), Ácido lipóico (GA) ou Ternatina/DMSO (GT/D)], entre si e ao grupo pré-tratado com solução salina (GC), todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0).....	54
TABELA 16–	Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes [(DMSO (GD), Ácido lipóico (GA) ou Ternatina/DMSO (GT/D)], entre si e ao grupo pré-tratado com solução salina (GC), todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperfusão (T1+T3+T-6).....	55
TABELA 17 –	Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), em ratos pré-tratados tratados com solução salina	42
TABELA 18 –	Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se Trauma vs. Pós-trauma (grupo Simulado), em ratos pré-tratados com solução salina.....	43
TABELA 19 –	Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se Isquemia vs. Reperfusão (grupo Controle), em ratos pré-tratados com solução salina.....	43
TABELA 20–	Capacidade antioxidante total no plasma (μM), comparando-se os grupos Controle (GC), tratado com solução salina e DMSO (GD), tratado com dimetilsulfóxido	58
TABELA 21–	Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se os grupos Controle (GC), tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), tratado com ácido lipóico	59
TABELA 22–	Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina / DMSO (GT/D), tratado com ternatina + DMSO.....	60

TABELA 23 – Capacidade Antioxidante Total no plasma, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes [(DMSO (GD), Ácido lipóico (GA) ou Ternatina/DMSO (GT/D)], entre si e ao grupo pré-tratado com solução salina (GC), todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)61

TABELA 24– Capacidade Antioxidante Total no plasma, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes [(DMSO (GD), Ácido lipóico (GA) ou Ternatina/DMSO (GT/D)], entre si e ao grupo pré-tratado com solução salina (GC), todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperfusão (T-1 + T-3)62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (-CH₂-) – grupamento metileno
μM – microMol
ADP – adenosina difosfatada
ATP – adenosina trifosfatada
ATPase – ATP sintetase
ATP-Mg Cl₍₂₎ – adenosina trifosfato - cloreto de magnésio
DHLA – ácido di-hidrolipóico
DMSO – dimetilsulfóxido
ERO – espécies reativas de oxigênio
Fe⁺⁺⁺ – íon férrico
GS – Grupo Simulado (Sham)
GC – Grupo Controle
GD – Grupo Dimetilsulfóxido
GA – Grupo Ácido lipóico
GT/D – Grupo Ternatina/DMSO
GR - glutationa-redutase,
GSH – glutationa (forma reduzida)
GSSH – glutationa dissulfeto (forma oxidada)
GST - glutationa-S-transferase
H₂O• – hidroperoxila
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
I/R – isquemia/reperfusão
IRFI-016 – análogo hidrofílico da vitamina E
LA – ácido α-lipóico
MDA - malondialdeído
NAD – nicotinamida dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH – nicotinamida dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP – nicotinamida dinucleotídeo fosfatado (forma oxidada)
NADPH – nicotinamida dinucleotídeo fosfatado (forma reduzida)
nm – nanômetro
O₂-• – radical superóxido

OH• – radical hidroxila

p:v – peso:volume

R• – radical

RLO – radicais livres de oxigênio

ROO• – radical peroxila

ROOH – hidroxiperóxido

SeGPx - glutationa-peroxidase dependente de selênio

SOD – superóxido dismutase

SS – solução salina

T-0 – tempo de isquemia máxima

T-1 – tempo correspondente a uma hora de reperfusão

T-3 – tempo correspondente a três horas de reperfusão

T-6 – tempo correspondente a seis horas de reperfusão

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico .

TN – ternatina

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	14
3 MÉTODO	15
3.1 Desenho do estudo	18
3.2 Indução da isquemia e fixação do testículo	19
3.3 O estudo	20
3.3.1 Preparação das drogas utilizadas	25
3.3.2 Técnica laboratorial	27
3.3.2.1 Preparação dos espécimes (sangue e tecido testicular)	27
3.3.2.2 Avaliação da peroxidação lipídica	27
3.3.2.3 Determinação da Glutathiona (GSH) no tecido	28
3.3.2.4 Determinação da Capacidade Antioxidante Total no plasma	29
3.4 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	33
4.1 No tecido	33
4.2 No plasma	47
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	75
7 REFERENCIAS	76
APÊNDICES	93
ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência de qualquer órgão ou tecido depende, fundamentalmente, de três fatores: a disponibilidade de oxigênio, a existência de uma fonte sempre renovada de nutrientes básicos e a remoção dos produtos tóxicos oriundos do metabolismo celular. O funcionamento harmônico desses processos metabólicos é essencial para assegurar a manutenção da bioenergética celular e da homeostase iônica. A redução da oferta de substratos energéticos, de oxigênio e o acúmulo de resíduos tóxicos do metabolismo celular afetam esse delicado balanço homeostático, comprometendo a integridade celular. Os recentes avanços do conhecimento médico têm possibilitado a reversão do processo em seu estágio inicial, utilizando métodos cirúrgicos ou farmacológicos, em áreas críticas para a sobrevivência do indivíduo, tal como o coração, prevenindo o infarto e a necrose celular nos tecidos isquêmicos (MAXWELL; LIP, 1997).

Isquemia pode ser definida como uma deficiência no aporte sangüíneo a determinado órgão ou tecido originando importantes alterações metabólicas de grau variável, dependente da intensidade e a duração do distúrbio. O afluxo de sangue oxigenado aos tecidos hipóxicos é fundamental para o reinício do metabolismo aeróbico. Paradoxalmente, apesar dos efeitos benéficos, a restauração do fluxo sanguíneo desencadeia uma série complexa de alterações que se instalam nos tecidos pré-isquêmicos, rotuladas “lesão de reperfusão” (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

A torção do cordão espermático é a emergência urológica mais freqüente em indivíduos jovens (GAUSCHE, 1996), podendo afetar o homem ao longo de sua existência, desde as primeiras semanas de vida intra-uterina (GIANNAKOPOULOS et al., 1995) até a velhice (GOMEZ et al., 2003), com picos de incidência na fase inicial da infância e na puberdade (SAUVAT et al., 2002). Até o ano de 1964 os resultados do tratamento cirúrgico eram desencorajadores com perdas de até 90% dos testículos torcidos (BARKER; RAPER, 1964). Esses resultados foram atribuídos

à desinformação da população quanto à urgência e a gravidade da doença, aliada à demora na concretização do tratamento adequado. Estudos realizados na Inglaterra em 1986 ainda mostravam um elevado percentual de perdas. Testículos inviáveis ocorreram em 38% dos acessos cirúrgicos, na fase aguda; atrofia tardia do órgão foi constatada em 6% dos pacientes, totalizando perdas de 44%, justificando a necessidade da pronta intervenção terapêutica, para assegurar a viabilidade do testículo e a manutenção da capacidade reprodutora do órgão (ANDERSON.; WILLIAMSON, 1986). No Brasil, perdas ainda maiores (50%) foram verificadas por Souto et al. (1999), em 26 jovens atendidos no serviço de urgência de dois hospitais universitários, num intervalo de cinco anos (1992 a 1997). Estudos tardios em pacientes vítimas da torção do cordão espermático, com preservação do testículo aparentemente viável, mostraram que a enfermidade pode ser uma importante causa de esterilidade masculina. A produção de espermatozoides anormais foi confirmada até 12 anos após o evento isquêmico (BARTSCH et al., 1980; MASTROGIACOMO et al., 1982; THOMAS et al., 1984; FRASER, 1985; PURI; BARTON; O'DONELL, 1985; ANDERSON; WILLIAMSON, 1986).

A torção do cordão espermático não produz de imediato, no homem, uma obstrução total do fluxo sanguíneo. Há, no início, uma obstrução da drenagem venosa sem o correspondente bloqueio da irrigação arterial. O edema resultante aumenta de maneira gradativa, acentuando o efeito estrangulador da torção, por aumento da compressão vascular. A consequência é a obstrução total do fluxo sanguíneo arterial e a isquemia do testículo (SKOGLUND; McROBERTS; RADGE, 1970), com o aparecimento de uma cascata de distúrbios metabólicos e enzimáticos. O evento inicial é a substituição do metabolismo aeróbico para o anaeróbico, incapaz de suprir as demandas energéticas celulares, resultando no comprometimento dos processos biológicos que necessitam de energia (GRACE, 1994). A hipóxia resultante da diminuição do fluxo sanguíneo produz níveis elevados de ácido láctico, hipoxantina e peroxidases lipídicas nos tecidos isquêmicos, seguida da produção de grande quantidade de radicais livres de oxigênio (RLO), que reagem com os lipídios das células e das mitocôndrias, alterando a permeabilidade de suas membranas, culminando com a morte celular (SAUGSTAD, 1988; REILLY; SCHILLER; BULKLEY, 1991).

Dois fatores são fundamentais para o sucesso do tratamento da torção do cordão espermático: a duração do período de isquemia e o grau de torção

(WRIGHT, 1977). Como o tempo de duração da isquemia está diretamente relacionado à gravidade das lesões, o objetivo terapêutico principal tem como fulcro o restabelecimento precoce da perfusão. Todavia, a reintrodução do oxigênio em um meio isquêmico inicia uma corrente complexa de eventos produzindo lesões tissulares adicionais podendo comprometer, irremediavelmente, a viabilidade do testículo (PRILLAMAN; TURNER, 1997).

De modo semelhante ao que ocorre em outros órgãos ou tecidos submetidos aos efeitos da isquemia/reperfusão, a lesão tissular provocada pela torção do cordão espermático tem dois componentes: a lesão isquêmica e a lesão de reperfusão. As lesões celulares resultantes representam uma somatória das ações deletérias desses dois componentes (AKGÜR; KILINC; AKTUG, 1993). A lesão isquêmica decorre da obstrução do acesso de sangue oxigenado ao testículo (BLANK et al., 1993; AKGÜR; KILINC; AKTUG, 1993). A lesão de reperfusão se instala após a correção cirúrgica da torção (BLANK et al., 1993; AKGÜR; KILINC; AKTUG, 1993); em decorrência da oferta de sangue oxigenado à gônada isquêmica aparecem lesões adicionais decorrentes da ação das espécies reativas de oxigênio, com agravamento do estresse oxidativo (PRILLAMAN; TURNER, 1997). Nesta fase, a hipoxantina e a xantina oxidase reagem com o oxigênio produzindo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O radical superóxido também pode ser produzido por vazamento de elétrons originados de vários componentes da cadeia celular de transporte de elétrons. O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio pode produzir o radical hidroxila (OH^{\cdot}) através das reações de Fenton ou Haber-Weisser ou ainda ser convertido em água (H_2O) pela ação enzimática da catalase ou da glutathione peroxidase (LEIFERT; JAHANGIRI; MCMURCHIE, 1999). Mais de 95% do oxigênio consumido durante o metabolismo aeróbico é utilizado nas mitocôndrias para produção de energia; o restante (5%), não sendo completamente oxidado em água, origina as espécies reativas de oxigênio, também conhecidas como radicais livres (CLARK, 2002).

Radical livre é um termo aplicado a toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados; o elétron livre pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Duas substâncias abundantes na natureza podem gerar radicais livres: o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Este último

participa da formação de complexos nitrosílicos com heme-proteínas, compostos nitrosotiólicos (cisteína e glutatona) e de peroxinitrito. O peroxinitrito promove a oxidação de grupos tiólicos, em particular a glutatona, associado com o consumo de oxigênio e regulando sua ação radicalar nas células do organismo (QUIJANO et al., 1997; ARTEEL; BRIVIBA; SIES, 1999).

A molécula de oxigênio é um bi-radical (possui dois elétrons livres nos orbitais p antiligantes) e reage preferencialmente com moléculas de configuração eletrônica semelhante. Por outro lado, a maioria das biomoléculas não são bi-radicais, possuindo grande número de ligações covalentes, ficando o oxigênio impedido (por restrição de "spin") de reagir com as mesmas, evitando assim que alvos celulares importantes sejam lesados. Apesar dessa restrição, o oxigênio possibilita a origem de diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Na forma de oxigênio singlete a restrição de "spin" desaparece, resultando em um maior poder oxidante dessa substância (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Uma outra via de formação de espécies reativas de oxigênio consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila ($OH^{\cdot-}$), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). O peróxido de hidrogênio atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron origina o radical hidroxila. Este último é, entre as espécies radicalares conhecidas, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar. Estas espécies radicalares devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula para se estabilizarem, tornando esta última uma espécie também radicalar e a consequência disto é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, do DNA, e das proteínas (GREENWALD, 1990).

Os efeitos deletérios do oxigênio sobre os organismos vivos variam consideravelmente, na dependência do tipo de organismo e de seu estado fisiológico. Nos mamíferos, no tecido oxigenado, o oxigênio sofre redução tetravalente, com a aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) hidroperoxila (H_2O^{\cdot}) e hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A produção excessiva de radicais livres oxidantes e a capacidade do organismo de desativá-los representam o

equilíbrio decisivo entre a reversibilidade das lesões e a morte celular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

A concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio é, em condições normais, extremamente baixa, pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem ou impedem sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e pela catalase (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). Assim, em condições fisiológicas, o balanço entre os agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando esse equilíbrio é rompido, quer por produção excessiva de radicais livres quer por redução das defesas antioxidantes, estabelece-se o “estresse oxidativo” (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), restando ao organismo três alternativas: 1) adaptação, por aumento da atividade dos sistemas antioxidantes; 2) dano tecidual, por agressão aos lipídios, carboidratos ou proteínas; 3) morte celular, por necrose ou apoptose (DRÖGE, 2002). Na peleja pela sobrevivência, o sistema de proteção contra a ação lesiva dos radicais livres atua em duas linhas diferentes: linha detoxificadora, constituída pela glutathione reductase, vitamina E e as enzimas superóxido-dismutase, catalase, glutathione peroxidase; linha reparadora, constituída principalmente pelo ácido ascórbico e pelas enzimas glutathione-reductase e glutathione-peroxidase (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além dos antioxidantes endógenos, existem antioxidantes provenientes da natureza, principalmente os provenientes da dieta e aqueles elaborados sinteticamente. Os antioxidantes sintéticos mais conhecidos são: acetilcisteína, coenzima Q, flavonóides, alopurinol, probucol, vitamina C e E, betacaroteno, selênio e zinco, entre outros (BONORDEN; PARIZA, 1994).

As membranas celulares do testículo dos mamíferos apresentam altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, o que as tornam muito vulneráveis ao ataque dos radicais livres de oxigênio (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989). Em contrapartida, o testículo é dotado de um sofisticado mecanismo de defesa que assegura a sua integridade funcional diante do ataque persistente dos agentes oxidantes. Cada célula testicular dispõe de diferentes enzimas e moléculas defensoras. Assim, as células de Sertoli apresentam concentrações relativamente altas de superóxido dismutase (SOD), glutathione-peroxidase dependente de selênio (SeGPx), enzimas não dependentes do selênio, denominadas glutathione S-peroxidases (GST) e glutathione reductase (GSH). Essa alta concentração enzimática é fundamental para

assegurar a sobrevivência do espermatozóide, facilmente lesado pelos radicais livres. (BAUCHE; FOUCHARD; JEGOU, 1994). Comparando-se o testículo ao fígado, observa-se que a expressão equivalente de SOD é semelhante nos dois órgãos, diferentemente da atividade da glutatona peroxidase (5%) e da catalase (2%), extremamente reduzidas na gônada masculina (PELTOLA; HUHTANIEMI; AHOTUPA, 1992). Por outro lado, as células germinativas albergam concentrações muito elevadas de SOD, em contraste com as outras enzimas (glutatona peroxidase, glutatona S-peroxidase e glutatona redutase) além de quantidades não detectáveis de catalase. Há, portanto, uma diferença fundamental entre os sistemas defensivos das células de Sertoli, capazes de converter o radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e finalmente em substâncias não reativas, mantendo o equilíbrio da reação GSH/GSSG (glutatona reduzida/glutatona oxidada), assegurando a proteção necessária contra os radicais livres de oxigênio. Enquanto isso, as células germinativas não conseguem levar o processo de detoxificação até a fase final, permitindo que o H_2O_2 produzido pela inativação do radical superóxido formado possa ser utilizado para a produção de radicais ainda mais tóxicos, via reação de Fenton (BAUCHE; FOUCHARD; JEGOU, 1994).

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989). A oxidação da glutatona a transforma em GSSG (glutatona oxidada), produto tóxico para o meio intracelular. Os sistemas de proteção são, mais uma vez ativados e a GSSG é reduzida, retornando ao seu estado inicial (GSH) por ação enzimática da glutatona redutase. A relação ideal GSH/GSSG (100:1) é mantida através desse mecanismo (MEISTER, 1989). Sob condições fisiológicas, a taxa de consumo de GSH é determinada pela intensidade de sua utilização nos processos de detoxificação. A exposição aos agentes oxidantes oriundos do meio exterior ou a presença de toxinas reativas aos tióis pode aumentar significativamente o consumo de GSH, resultando em queda temporária dos níveis de GSH intracelular; entretanto, como a capacidade de recuperação das reservas de GSH está presente na maioria das células, a concentração do tripeptídeo intracelular é rapidamente recuperada, pela maior síntese e pela redução do GSSG, pelo mecanismo já descrito acima.

Surpreendentemente, a maioria das células tolera, sem efeitos adversos, redução de até 90% dos níveis normais de GSH (HALL, 1999).

A lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (PL) pode ser definida como uma deterioração oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, detentores de ligações duplas carbono-carbono, presentes em grande quantidade nas membranas e nas organelas intracelulares (mitocôndrias e peroxissomas); é um processo constituído por reações encadeadas, seqüenciais e que pode ser dividida em três etapas: iniciação, propagação e término. A peroxidação lipídica tem início quando espécies reativas de oxigênio, dotadas de elétrons desemparelhados, promovem a remoção de um átomo de hidrogênio de um grupamento metileno (-CH₂-). Nesta etapa há produção de um novo radical (-CH•-) que é centrado no carbono e que normalmente se estabiliza através de um novo arranjo molecular. Sob condições aeróbicas esse radical centrado no carbono combina-se com o oxigênio (O₂) formando radicais peroxila (ROO•). Esses radicais peroxila podem extrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídio, estabelecendo assim a propagação da reação. O novo radical, ao reagir com o oxigênio, origina novo radical peroxila, permitindo que a reação da peroxidação lipídica se torne contínua, pela repetição dos ciclos oxidativos.

Quando o radical peroxila se combina com um átomo de hidrogênio, há geração de hidroxiperóxidos (ROOH). Uma alternativa é a formação de peróxidos cíclicos e epóxidos. Estas substâncias, altamente reativas, culminam por fragmentar os lipídios poliinsaturados, produzindo o malondialdeído (4-hidroxi-2-nonenal) e outros compostos contendo grupos carbonila. Um único evento de iniciação pode produzir várias moléculas de peróxido. À medida que as reações em cadeia se processam, proteínas de transporte ou enzimas de membrana podem ser inativadas ou pode ocorrer aumento da permeabilidade da bicamada lipídica da membrana, alterando a homeostase. Finalmente, na etapa de conclusão, ocorre a formação de um intermediário instável (tetróxido), a partir dos radicais peroxila (mecanismo de Russell), que sofre decomposição, originando oxigênio singleto (¹O₂) e grupos carbonila excitados, entre outros produtos (LLESUY, 2002).

Os testículos dos mamíferos e, especialmente as células germinativas, podem sofrer graves lesões, muitas vezes irreversíveis, quando expostos à ação dos agentes oxidantes produzidos no organismo, no curso dos processos vitais ou nas

situações de estresse (CHANCE; SIES; BOVERS, 1979). A manutenção do fluxo sanguíneo é particularmente crítica no testículo. Os túbulos seminíferos, em condições normais, exibem concentrações muito baixas de oxigênio, o que explica sua maior sensibilidade a hipóxia (AHMED et al., 2000). Acredita-se que esta particular sensibilidade do testículo possa estar relacionada ao seu suprimento sanguíneo do tipo terminal e a presença de uma carapaça inelástica constituída pela túnica albugínea que limitaria sua expansão compensatória, na vigência do edema traumático (REGADERA; NISTAL; PANIAGUA, 1985).

Vários modelos de torção do cordão espermático foram concebidos na tentativa de reproduzir, experimentalmente, os distúrbios circulatórios encontrados na torção do cordão espermático do homem. Os métodos mais utilizados foram a ligadura da artéria espermática, o pinçamento do cordão espermático e a torção do cordão espermático.

Os dois primeiros métodos (ligadura ou o pinçamento do cordão espermático) determinam de imediato, o bloqueio do fluxo sanguíneo arterial e do retorno venoso, o que não corre no ser humano (MERIMSKY; ROCK; KATZ, 1982; ORTOLANO; NASRALLAH, 1986; PALMER; PLZAK; CROMIE, 1997). A torção do cordão espermático (duas voltas completas ou 720°), modelo atualmente utilizado pela maioria dos pesquisadores, produz efeitos semelhantes aos observados na torção que ocorre no homem (JANETSCHEK et al., 1988; RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988; BLANK et al., 1993; BECKER; TURNER, 1995; PALMER; PLZAK; CROMIE, 1997; DOKUCU et al., 2000; ANDIRAN et al., 2000; GUIMARAES; VASCONCELOS, 2002; SEUNG-JUNE et al., 2004).

A busca por substâncias com atividade biológica antioxidante eficaz na reversão ou diminuição dos efeitos do estresse oxidativo secundário à torção do cordão espermático tem sido exaustiva e sistemática. Inúmeras substâncias já foram utilizadas, com resultados nem sempre satisfatórios, apesar da comprovada ação dessas substâncias em outros órgãos.

Blank et al. (1993) mostraram resultados desanimadores, estudando os efeitos preventivos da deferoxamina e diltiazem, substâncias reconhecidamente eficazes na prevenção das lesões oxidativas no músculo cardíaco. O alopurinol foi eficaz na prevenção das lesões de reperfusão no testículo submetido à isquemia de três e cinco horas e reperfusão de duas horas de duração (AKGÜR et al., 1994b). O Quadro 1 (Anexo A) apresenta a relação das principais drogas e enzimas utilizadas

por diferentes pesquisadores, nos diferentes estudos experimentais sobre o tema em epígrafe, publicados a partir de 1988.

É importante enfatizar o significado de algumas palavras e expressões usadas no presente estudo. A capacidade antioxidante pode ser definida como a habilidade de determinada substância ou composto na redução de substâncias pró-oxidantes. Quando uma determinada substância química é reduzida há um ganho de elétrons; por outro lado, quando essa substância é oxidada, perde elétrons. O agente redutor é a substância que doa elétrons e assim faz com que a substância alvo seja reduzida. Por sua vez, o agente oxidante é capaz de aceitar elétrons de outra substância, o que faz com que a substância doadora de elétrons seja oxidada.

Três antioxidantes, com reconhecida atividade protetora em diferentes órgãos e tecidos (IKEDA; LONG, 1996; SOUZA; RAO; SILVEIRA, 1997; BRUCK et al., 2001; MITSUI et al., 1999; FREISLEBEN, 2000; CHIDLOW et al., 2002; PRAHALATHAN; SELVAKUMAR; VARALAKSHMI, 2004; SELVAKUMAR et al., 2004) foram selecionados para a avaliação de seus possíveis efeitos protetores em animais submetidos à isquemia/reperfusão do testículo: o dimetilsulfóxido, o ácido α -lipóico e a ternatina.

O dimetilsulfóxido [(CH₃)₂SO] é um líquido orgânico incolor derivado da lignina, substância responsável pela rigidez das células vegetais. Sua extração ocorre na preparação de polpa de madeira utilizada na fabricação do papel. Usado como solvente comercial desde 1933, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado pela primeira vez como fármaco em 1961 pelo Dr. Stanley Jacob, chefe da unidade de transplante da *Oregon Health Sciences University* ao investigar o potencial desse solvente na preservação de órgãos (SZMANT, 2004). O DMSO é altamente solúvel e distribui-se rapidamente, após injeção intraperitoneal, em todos os órgãos e tecidos (KOLB et al., 1967) e é capaz de melhorar a fosforilação oxidativa na própria mitocôndria. Essa ação se deve à diminuição da atividade da ATPase nas partículas submitocondriais, com redução da utilização de O₂ durante a isquemia celular (GHOSH et al., 1976). Outros trabalhos experimentais comprovaram a ação antioxidante do DMSO como seqüestrador de radicais livres (BRUCK et al., 2001; KOKSAL et al, 2003).

O DMSO, um poderoso seqüestrador de radicais livres de hidrogênio, é uma molécula anfipática com grande domínio polar; a presença de dois grupamentos apolares, lhes confere solubilidade tanto em meio aquoso como em líquidos

orgânicos (SANTOS et al., 2003). Sua capacidade ímpar em penetrar com facilidade na intimidade dos tecidos vivos sem produzir lesões detectáveis deve-se, possivelmente, a sua natureza polar, sua capacidade em aceitar ligações hidrogenadas, seu tamanho relativamente pequeno e sua compacta estrutura (SZMANT, 2004). Suas principais ações farmacológicas são: penetração nas membranas celulares, ação antiinflamatória, analgesia, inibição da agregação plaquetária, vasodilatação e relaxamento muscular, inibição da colinesterase e proteção contra a lesão isquêmica (JACOB; HERSCHLER, 1986)

O DMSO não é isento de efeitos colaterais. Pequenas doses da substância produzem efeitos tóxicos discretos no fígado do rato. Altas doses podem induzir o aparecimento de infiltração hepática gordurosa (MATHEW et al., 1980). Um estudo recente demonstrou que ratos tratados com repetidas aplicações intraperitoneais de DMSO, em doses convencionais, apresentavam uma acentuada redução dose-dependente da velocidade de condução nervosa (CAVALETTI et al., 2000). Diferentes resultados foram apresentados por Authier et al. (2002); esses pesquisadores estudaram detalhadamente o efeito de doses crescentes de DMSO (1,8–3,6–7,2%), aplicadas por via intraperitoneal, diariamente, durante 10 dias (10 ml/Kg), em ratos Sprague-Dawley. Não foram observados efeitos tóxicos do solvente, mesmo quando utilizado em altas doses (7,2%).

O ácido α -lipóico (1,2-ditiolane-3-ácido valérico, 1,2-ditiolane-3-ácido pentanóico, 6,8-ácido ditiooctânico, ácido tióctico) é um metabólito antioxidante sintetizado por células humanas e animais através da combinação do ácido aracdônico com a metionina ou ácido octanóico com a cisteína (DUPRE et al., 1980). Reed (1974) pensava tratar-se de uma nova vitamina originária da ingestão de determinados alimentos. Anos mais tarde confirmou-se a sua síntese por animais e humanos (CARREAU, 1979). Sua importância na terapêutica atual é ressaltada pelo crescente número de publicações que destacam o uso do produto como um ativo destruidor de radicais livres de oxigênio (MITSUI et al., 1999; FREISLEBEN, 2000; CHIDLOW et al., 2002), regenerador da glutatona e de outros antioxidantes ao seu estado reduzido (MOINI; PACKER; SARIS, 2002) e protetor das células testiculares contra o estresse oxidativo induzido por ciclofosfamida, substância com reconhecida atividade citotóxica (SELVAKUMAR et al., 2004).

A ação metabólica do ácido α -lipóico tem seu papel fundamental no ciclo de Krebs onde atua como co-fator de processos enzimáticos que catalisam a

descarboxilação oxidativa dos α -cetoácidos, tais como o piruvato e ácido α -cetoglutarato. No processo, o ácido α -lipóico (LA) é reduzido a ácido di-hidrolipóico (DHLA) e as duas substâncias atuam como redutores acoplados (PACKER; WITT; TRITSCHLER, 1995). O LA atravessa a barreira hemato-cerebral e é considerado um “antioxidante metabólico” por ser aceito como um substrato pelas células humanas, onde é reduzido a DHLA. Diferentemente do que ocorre com outros antioxidantes, como o ácido ascórbico, o DHLA não é destruído na sua ação seqüestradora de radicais livres, sendo reciclado a partir do ácido α -lipóico e é capaz de inativar os radicais superóxido, ação não exercida pelo ácido α -lipóico (SUZUKI; TSUCHYA; PACKER, 1991). Segundo Evans e Goldfine (2000), o ácido α -lipóico é um potente antioxidante multifuncional. Sua ação se estende ao meio intracelular onde promove aumento da glutathione e das defesas celulares (BUSSE et al., 1992). As propriedades antioxidantes do ácido α -lipóico podem ser divididas em quatro categorias: seqüestração de radicais livres, quelação de íons metálicos e reparação das lesões oxidativas em macromoléculas, regeneração e síntese *de novo* de antioxidantes endógenos (glutathione e vitamina E) e de outros antioxidantes, como o α -tocoferol; (PACKER; WITT; TRITSCHLER, 1995; BIEWENGA; HAENEN; BAST, 1997) e o ácido ascórbico (SCHOLICH; MURPHY; SIES, 1989). Vale salientar o importante papel desempenhado pelo ácido lipóico no metabolismo, regulando o estado redox e produzindo aumento de NADH/NAD⁺ na hiperglicemia. O aumento da síntese de glutathione está dependente da disponibilidade de cisteína (PACKER; WITT; TRITSCHLER, 1995). No homem o ácido α -lipóico encontra-se conjugado às proteínas (HERMANN et al., 1996). Como as ações terapêuticas antioxidantes estão relacionadas à forma livre, é fundamental a suplementação dessa substância para a obtenção dos efeitos protetores.

Os flavonóides, responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores, são compostos polifenólicos de baixo peso molecular, amplamente distribuídos no reino vegetal (HAVSTEEN, 1983) e dotados de múltiplas propriedades biológicas, farmacológicas e antioxidantes. (CHOLBI et al., 1991; GALVEZ et al., 1995). A grande maioria desses compostos apresenta baixa toxicidade (DL₅₀ 2-10 g por rato), e poucos efeitos colaterais, o que torna sua utilização segura. (HAVSTEEN, 1983). Os flavonóides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia

provocadas pelos radicais livres (HARTMAN; SHANKEL, 1990; ARORA; NAIR; STRASBURG, 1998a, 1998b). Em adição a sua propriedade antioxidante, alguns flavonóides têm a capacidade de quelar íons metálicos, reduzindo, assim, a peroxidação induzida por metais. No consenso de vários pesquisadores, a sua atividade antioxidante resulta da combinação de suas propriedades quelantes do ferro e seqüestradoras dos radicais livres (BOHM et al., 1998; BRAVO, 1998; RUSSO et al., 2000). Outros autores incluem ainda a inibição das oxidases (lipogenase, ciclooxidase, mieloperoxidase, xantina oxidase e NADPH oxidase) evitando a geração de espécies reativas de oxigênio, *in vivo*, bem como de hidroperóxidos orgânicos (FERRANDIZ; ALCARAZ, 1991; DE GROOT, RAUEN, 1998).

A constituição química volátil dos capítulos florais da macela, erva popularmente utilizada sob a forma de infusão no tratamento de distúrbios digestivos e intestinais (BRAGA, 1960), foi determinada por estudos químico-farmacológicos (CRAVEIRO et al., 1992 apud LIMA et al., 1996, p. 217). O flavonóide identificado foi denominado ternatina (4, 4', dihidroxi 3, 7, 8, 3' tetramoxi flavona) (SILVEIRA; LIMA; MACEDO, 1989). Posteriormente foram confirmadas as atividades antianafilática e antiinflamatória (SOUZA; RAO; SILVEIRA, 1992; SOUZA, 1993), hepatoprotetora (RAO et al., 1994; SOUZA et al., 1998), antitrombótica (SOUZA et al., 1994), antidiarréica e gastroprotetora (RAO et al., 1997) e antioxidante (SOUZA; RAO; SILVEIRA, 1997; SOUZA; RAO; SILVEIRA, 1998; SOUZA; TOME; RAO, 1999) da ternatina.

A aferição direta dos radicais livres nos sistemas biológicos é dificultada por suas concentrações extremamente baixas (da ordem de 10^{-11} M) e por suas altas velocidades de reação, podendo atingir um nível em que as taxas de produção são praticamente iguais às taxas de reação com biomoléculas. Técnicas de ressonância paramagnética de elétrons podem permitir a aferição de subprodutos dos radicais livres de oxigênio. O uso rotineiro destas técnicas enfrenta um grande empecilho, consubstanciado nos altos custos do processo e nas limitações técnicas inerentes ao método (FLOYD, 1990). Por outro lado, a aferição indireta dos radicais livres e como conseqüência, das lesões oxidativas, pode ser feita por espectrofotometria e cromatografia, determinando a atividade enzimática (superóxido dismutase, catalase, glutaciona peroxidase e glutaciona reduzida) e a concentração de

tripeptídios e aldeídos (malonaldeído) nos tecidos, sangue e outros fluidos orgânicos.

Vários métodos são utilizados para a avaliação do estresse oxidativo. A lipoperoxidação é um marcador para a lesão das membranas celulares e, no método de TBARS, é aferida através da formação de um composto intermediário da lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA). O teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA) foi introduzido por Kohn e Liversedge em 1944 e ainda é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica (CHIRICO, 1994). O estresse oxidativo pode ser avaliado por dosagens de glutathiona reduzida (GSH) e/ou pelo cálculo da razão glutathiona reduzida /glutathiona (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A aferição da capacidade antioxidante total ou poder antioxidante total no plasma e fluidos dos mamíferos permite avaliar o nível do estresse oxidativo. Trata-se de uma avaliação global, pois considera a ação cumulativa dos diversos antioxidantes presentes nos líquidos orgânicos. Os valores obtidos refletem essa ação integrada, sinérgica, de todos os antioxidantes e não representa apenas a somatória dos efeitos antioxidantes isolados de cada uma dessas substâncias. Obtém-se, desta maneira, *in vivo*, um cenário do delicado balanço entre as substâncias oxidantes e as antioxidantes (GHISELLI et al., 2000).

Face ao exposto, percebe-se que a torção do cordão espermático pode trazer seqüelas lesivas à integridade do testículo. Nos últimos 20 anos, um grande número de pesquisadores tem buscado alternativas terapêuticas, reconhecendo que o tratamento cirúrgico isolado é incapaz de assegurar proteção total ao testículo. O pré-tratamento com antioxidantes pode ser o complemento terapêutico tão arduamente perseguido, tornando os testículos incólumes ou menos vulneráveis aos efeitos das lesões oxidativas decorrentes da torção do cordão espermático.

Por outro lado, não foram encontrados, na literatura médica, registros avaliando os efeitos do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido α -lipóico ou ternatina, em ratos submetidos à torção seguida de destorção do cordão espermático, conferindo ineditismo e relevância a este estudo.

2 OBJETIVO

Verificar os efeitos de antioxidantes (ácido lipóico, dimetilsulfóxido e ternatina) sobre o estresse oxidativo induzido por torção/destorção do cordão espermático, em ratos jovens.

3 MÉTODO

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA, da Universidade Federal do Ceará, em 06 de Agosto de 2003, sob o número 14/02. Foram obedecidas as normas estabelecidas pelo *Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS)* e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

Foram utilizados 120 ratos jovens (idade: 60 ± 5 dias), púberes, machos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*), pesando de 150 a 200g, peso médio 174 g, (APÊNDICE A) da linhagem Wistar, saudáveis e bem nutridos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Observou-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Guabi Nutrilabor®, Mogiana Alimentos, São Paulo) foram ofertadas *ad libitum* até 12 horas antes do experimento. A higienização das gaiolas e o exame dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável e pelo pesquisador, respectivamente.

Os ratos foram previamente aclimatados por um período de 7 dias antes da realização dos experimentos. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará.

Os 120 ratos foram distribuídos ao acaso em cinco grupos numericamente iguais ($n = 24$):

Grupo Simulado (SHAM): constituído por 24 ratos, tratados com solução salina e submetidos aos procedimentos cirúrgicos estabelecidos para todos os animais, mas sem indução de isquemia.

Grupo Controle: constituído por 24 ratos tratados com solução salina e submetidos aos procedimentos cirúrgicos previamente estabelecidos para todos os animais, com isquemia testicular (3 horas), seguida de reperfusão, de 1 a 6 horas de duração.

Grupo DMSO: constituído por 24 ratos tratados com solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) e submetidos aos procedimentos cirúrgicos previamente estabelecidos para todos os animais, com isquemia testicular (3 horas), seguida de reperfusão, de 1 a 6 horas de duração.

Grupo Ácido lipóico: constituído por 24 ratos tratados com ácido α -lipóico (LA) e submetidos aos procedimentos cirúrgicos previamente estabelecidos para todos os animais, com isquemia testicular (3 horas), seguida de reperfusão, de 1 a 6 horas de duração.

Grupo Ternatina / DMSO: constituído por 24 ratos tratados com ternatina suspensa em solução aquosa de DMSO e submetidos aos procedimentos cirúrgicos previamente estabelecidos para todos os animais, com isquemia testicular (3 horas), seguida de reperfusão, de 1 a 6 horas de duração.

Os animais de cada grupo foram redistribuídos em quatro subgrupos com 6 ratos cada, nomeados de acordo com o tempo de coleta do material para estudo e morte do animal (T-0, T-1, T-3 e T-6) (Figura 1).

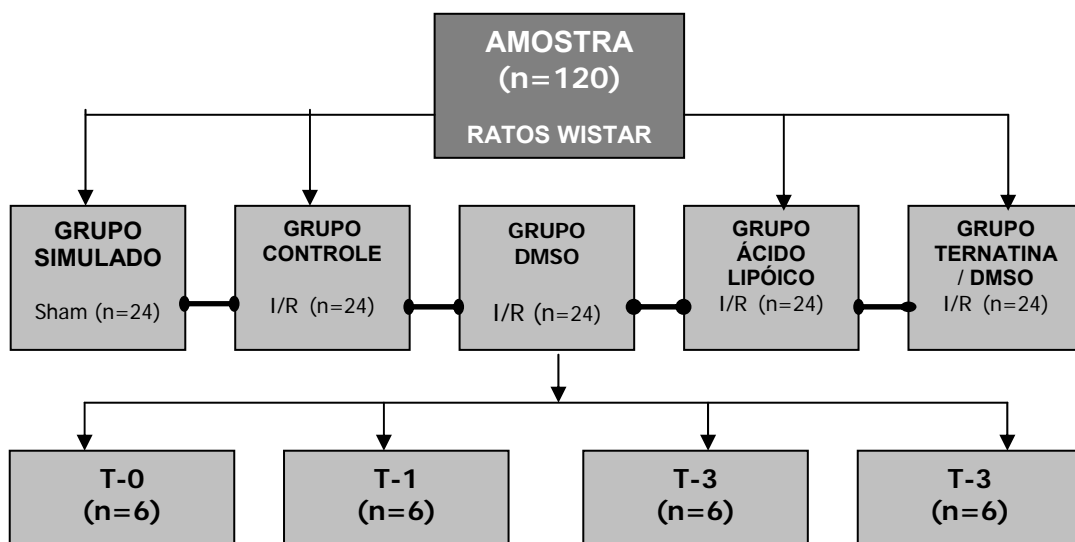


FIGURA 1– Distribuição dos grupos e subgrupos, denominados de acordo com o tipo de droga utilizada na pesquisa e o tempo de coleta das amostras e morte dos animais

O Quadro 2, abaixo, relaciona os diferentes tipos de drogas utilizadas no estudo, seus diluentes, e os parâmetros obedecidos para o cálculo dos volumes finais injetados por via intraperitoneal, em cada aplicação.

Grupos	N	Via	Concentração das soluções / suspensões
Grupo Simulado (SHAM)	24	i.p.	Solução salina 0,9% (SS) Total: 3 doses: 24, 12 e 4 horas antes da destorção do cordão espermático A última dose foi aplicada uma hora antes da torção. <i>Concentração/Volume:</i> 1,0 ml /100 g de peso do animal, cada dose, completando-se com solução salina para obtenção do volume total injetado de 2,0 ml, quando necessário.
Grupo Controle: (ISQUEMIA/ REPERFUSÃO)	24	i.p.	Solução salina 0,9% (SS) Total: 3 doses: 24, 12 e 4 horas antes da destorção do cordão espermático A última dose foi aplicada uma hora antes da torção. <i>Concentração/Volume:</i> 1,0 ml /100 g de peso do animal, cada dose, completando-se com solução salina para obtenção do volume total injetado de 2,0 ml, quando necessário.
Grupo DMSO: (ISQUEMIA/ REPERFUSÃO)	24	i.p.	Dimetilsulfóxido (DMSO) – Solução aquosa de DMSO (33 mg/ml) a 3% (v:v) diluído em solução salina 0,9%. Total: 3 doses: 24, 12 e 4 horas antes da destorção do cordão espermático. A última dose foi aplicada uma hora antes da torção do cordão espermático. A quantidade total de DMSO foi de 330 mg/Kg. <i>Concentração/Volume:</i> 1,0 ml /100 g de peso do animal, cada dose, completando-se com solução salina para obtenção do volume total injetado de 2,0 ml, quando necessário.
Grupo Ácido lipóico (ISQUEMIA/ REPERFUSÃO)	24	i.p.	Ácido α-lipóico (LA) – Solução aquosa (1,0 mg/ml) de ácido α -lipóico diluído em solução salina 0,9%. Total: 3 doses: 24, 12 e 4 horas antes da destorção do cordão espermático A última dose foi aplicada uma hora antes da torção. A quantidade total administrada foi de 30 mg/Kg. <i>Concentração/Volume:</i> 1,0 ml /100 g de peso do animal, cada dose, completando-se com solução salina 0,9% para obtenção do volume total injetado de 2,0 ml, quando necessário.
Grupo Ternatina / DMSO (ISQUEMIA/ REPERFUSÃO)	24	i.p.	Ternatina (TN): suspensão a 1,2% (1,2 mg/ml) em solução salina (0,9%) de DMSO a 3%. Total: 3 doses: 24, 12 e 4 horas antes da destorção do cordão espermático. A última dose foi aplicada uma hora antes da torção. A quantidade total administrada foi de 36,0 mg/Kg. <i>Concentração/Volume:</i> 1,0 ml /100 g de peso do animal, cada dose, completando-se com solução salina 0,9% para obtenção do volume total injetado de 2,0 ml, quando necessário.

SS: Solução salina 0,9% - Fabricante: Química Farmacêutica Gaspar Viana (Fortaleza, CE)
DMSO: Dimetilsulfóxido (pureza: 99%, 1 ml = 1,10 g, Peso Molecular: 78,13). Fabricante: Cromato Produtos Químicos Ltda (Diadema, SP).
TN: Ternatina (4, 4', dihidroxi 3, 7, 8, 3' tetramoxi flavona) extraída e purificada no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.
LA: Ácido α -lipóico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentaenóico), Peso molecular: 206,32. Fabricante: Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A

QUADRO 2 - Denominação dos grupos, número de animais (n), via de administração, concentração das soluções, suspensões e volume administrado

Como a ternatina é insolúvel n'água, realizou-se uma diluição prévia em dimetilsulfóxido e posterior suspensão em solução salina, resultando uma solução final contendo no máximo 3% do veículo (DMSO). O DMSO (3,00 ml) foi diluído em solução salina (97 ml). O ácido α -lipóico foi diluído em solução salina (1mg/ml) antes da aplicação intraperitoneal.

3.1 Desenho do estudo (Figura 2)

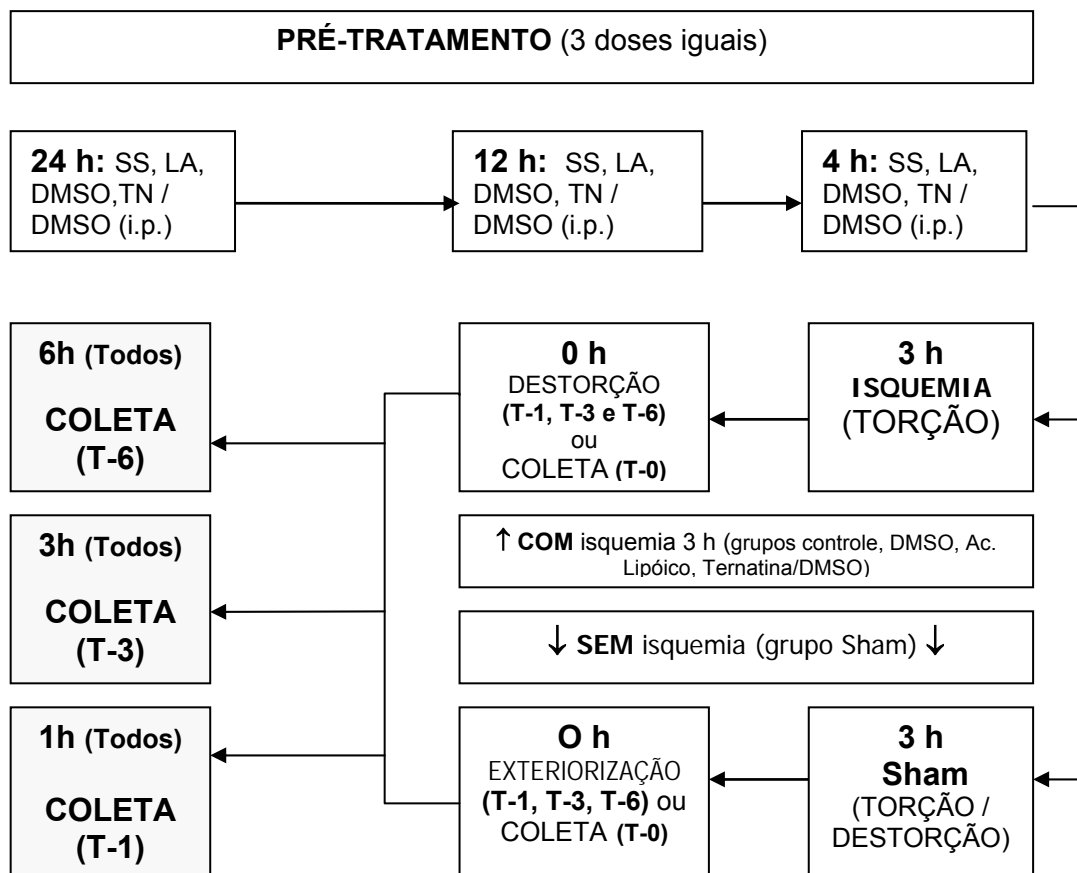


FIGURA 2 – Desenho do estudo – Pré-tratamento: aplicações intraperitoneais de Solução Salina (SS), Dimetilsulfóxido (DMSO), Ácido α -lipóico (LA) ou Ternatina/DMSO (T/D) 24 – 12 e 4 horas antes da destorção. A última aplicação foi realizada exatamente uma hora antes da torção (Grupos Controle, DMSO, Ácido lipóico e Ternatina/DMSO) ou torção/destorção do cordão espermático (Grupo Simulado). Coletas: 0h (tempo máximo de isquemia) e 1h (T-1), 3h (T-3) e 6 horas (T-6) após a destorção. Nos animais do Grupo Simulado a coleta foi realizada por ocasião da segunda cirurgia Sham (T-0) e 1h, 3h e 6 horas mais tarde.

O estudo foi realizado no mesmo horário do dia, em cada grupo experimental, para evitar-se a variação circadiana das respostas.

3.2 Indução da isquemia e fixação do testículo

A isquemia foi obtida por torção do cordão espermático direito, duas voltas completas (720°), em torno de seu eixo, no sentido horário. Para evitar-se a destorção espontânea, o testículo direito foi fixado ao mesórquio, utilizando-se a técnica preconizada por Ryan et al. (1988), evitando-se assim a sutura transparenquimal (Figuras 3 e 4).

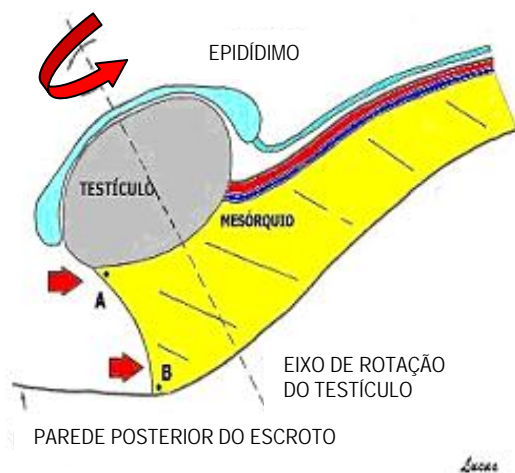


FIGURA 3 – Modelo de torção do cordão espermático (720°). Testículo, epidídimo, cordão espermático e parede posterior do escroto estão representados de maneira esquemática. A borda inferior ou margem livre do mesórquio é a estrutura entre os pontos A e B da ilustração. A fixação do testículo após a torção experimental é obtida pela aproximação dos pontos **A** e **B** (modificado de RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988).



FIGURA 4 - Fixação do testículo - técnica atraumática. Testículo direito exteriorizado, mostrando os pontos (A e B), utilizados para sua fixação (RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988). Os pontos são colocados no mesórquio; o ponto [A] se localiza próximo ao testículo e o ponto [B] se situa próximo à parede posterior do escroto. Observam-se vasos ingurgitados na superfície do testículo, em resposta à manipulação do órgão.

3.3 O estudo

Os ratos de cada grupo foram pesados individualmente, ao início do experimento, para permitir o cálculo dos volumes das diversas drogas administradas no curso do experimento. Uma vez realizado o cálculo, obteve-se o volume da solução a ser administrada por via i.p. para cada animal. Para assegurar-se a utilização de injeções isovolumétricas (sempre 2,0 ml) acrescentou-se solução salina ao volume calculado para aplicação em animais de peso menor que 200 g.

Os animais permaneceram em jejum com oferta de água a partir de 12 horas antecedentes ao primeiro procedimento cirúrgico. Manteve-se, a partir deste momento, a abstinência total de alimentos sólidos e líquidos durante todo o experimento, até a coleta do material para estudo e morte do animal.

A técnica escolhida foi a da anestesia por inalação de vapores de éter dietílico sem intubação traqueal e sem o emprego de suporte ventilatório. A indução anestésica foi levada a efeito alojando-se o animal em campânula de acrílico contendo em seu interior uma camada de algodão umedecido em éter dietílico. Atingido o nível adequado de narcose o animal era retirado da campânula e imobilizado sobre uma prancha de madeira revestida por uma lâmina de plástico fenólico, com extensão das quatro patas e em decúbito dorsal.

A anestesia foi mantida com máscara de éter dietílico e ar ambiente, em respiração espontânea. O nível anestésico foi avaliado por parâmetros clínicos tais como a frequência respiratória, a profundidade e o vigor dos movimentos respiratórios e a ocorrência de abalos musculares.

Durante o experimento foram realizadas três intervenções cirúrgicas: a primeira teve como objetivo a indução da isquemia (Grupos Controle, DMSO, Ácido lipóico e DMSO/Ternatina) ou procedimento “*Sham*” (Grupo Simulado); a segunda objetivou restabelecer o fluxo sanguíneo ao testículo, permitindo a reperfusão do órgão ou coleta de material (tempo de isquemia máxima, T-0) (Grupos Controle, DMSO, Ácido lipóico e DMSO/Ternatina), apenas a sua exteriorização (Grupo Simulado, T-1, T-3 e T-6) ou coleta (Grupo Simulado, T-0); a terceira intervenção teve como finalidade a coleta de material para análise laboratorial (todos os grupos, tempos T-1, T-3 e T-6).

Tendo em vista a uniformidade dos diversos procedimentos cirúrgicos, e permitir a sua futura utilização por outros pesquisadores, utilizou-se um protocolo

relacionando as várias etapas do experimento, conforme descrição detalhada que se segue:

- a) indução da anestesia e colocação do animal em decúbito dorsal, com as patas dianteiras e traseiras fixadas à prancha por tiras de esparadrapo;
- b) epilação do escroto por tricotomia e tração manual dos pêlos, quando necessário;
- c) antissepsia do escroto e região inguinal com solução de polivinilpirrolidona-iodo;
- d) exploração cirúrgica por acesso direto através de uma incisão longitudinal no escroto direito (2 a 3 cm de comprimento), liberação e divulsão delicada das fibras do músculo dartos com exposição do testículo e epidídimo;
- e) Exteriorização do testículo direito por leve expressão, evitando-se a tração por instrumental cirúrgico; algumas vezes o testículo encontrava-se no canal inguinal e era empurrado para baixo por compressão na região inguinal até sua completa exteriorização;
- f) isquemia do testículo direito por torção de 720° graus no sentido horário (duas voltas completas do cordão espermático, em torno do seu eixo transversal), seguida de fixação da gônada ao mesórquio, com fio de seda 4-0, para evitar-se a destorção espontânea (Figura 5); nos animais do Grupo Simulado, imediatamente após completar-se a torção do cordão espermático era realizada a destorção, seguida da colocação de um fio de sutura (seda 4-0) no mesórquio, de modo semelhante ao procedimento já descrito acima sem, contudo, realizar sua ligadura;
- g) fechamento do escroto em um só plano com suturas contínuas, utilizando fio de nylon monofilamentar 5-0 (Figura 6);
- h) interrupção da anestesia, e retorno do animal à gaiola;
- i) decorridas três horas, o animal era novamente submetido à anestesia inalatória com éter dietílico; após remoção das suturas do escroto e da sutura de fixação colocada no mesórquio, era efetuada a destorção do cordão espermático; a gônada era recolocada na cavidade escrotal, seguindo-se a sutura do escroto num só plano (suturas separadas), utilizando fio de nylon monofilamentar 5-0;
- j) nos animais do subgrupo T-0 (excetuando-se os ratos do Grupo Sham), sob anestesia com éter dietílico, após remoção das suturas do escroto, procedia-

- se à exteriorização da gônada, pinçamento do cordão espermático e a excisão do testículo direito, sem destorção do cordão espermático, evitando-se, dessa maneira, a reperfusão ainda que momentânea do testículo; a seguir era colhida uma amostra de sangue arterial (2,0 ml) por punção da aorta abdominal, abaixo da saída das artérias renais, sob visão direta, com agulha calibre 21 G, utilizando-se a laparotomia mediana como via de acesso;
- k) nos animais do grupo Simulado, sob narcose com éter dietílico, após a remoção das suturas do escroto, o testículo era exteriorizado por 30 segundos, o fio de sutura previamente colocado no mesórquio era retirado e a gônada recolocada na cavidade escrotal, seguindo-se a sutura da incisão num só plano, pontos separados, utilizando fio de náilon monofilamentar 5-0;
- l) nos ratos do subgrupo T-0, após remoção das suturas do escroto, procedia-se ao pinçamento do cordão espermático e a excisão do testículo direito; a seguir era colhida uma amostra de sangue arterial (2,0 ml) por punção da aorta abdominal, com agulha calibre 21G, abaixo da saída das artérias renais, sob visão direta, utilizando-se a laparotomia mediana como via de acesso;
- m) após a coleta do sangue os ratos foram mortos individualmente; para tanto, os animais eram alojados no interior da campânula acrílica, revestida na porção superior por espessa camada de algodão completamente embebido em éter dietílico, o que proporcionava uma alta concentração de vapores do anestésico, onde permaneciam até a parada completa dos sinais vitais.
- n) As Figuras 5 a 10, exibidas a seguir mostram, respectivamente, o aspecto macroscópico do escroto após a sutura e do testículo por ocasião das coletas, ao término do período de isquemia (T-0) e 1, 3 e 6 horas após o início da reperfusão (T-1, T-3 e T-6). Para melhor visualização do tamanho real das estruturas exibidas, todas fotografias apresentam, na sua porção inferior, uma escala milimétrica.



FIGURA 5 - Cor da gônada ao término do procedimento cirúrgico (torção do cordão espermático)



FIGURA 6 – Sutura do escroto – aspecto final



FIGURA 7 – Cor do testículo após três horas de isquemia, antes da destorção do cordão espermático (T-0)



FIGURA 8 – Cor do testículo após três horas de isquemia e uma hora de reperfusão (T-1)

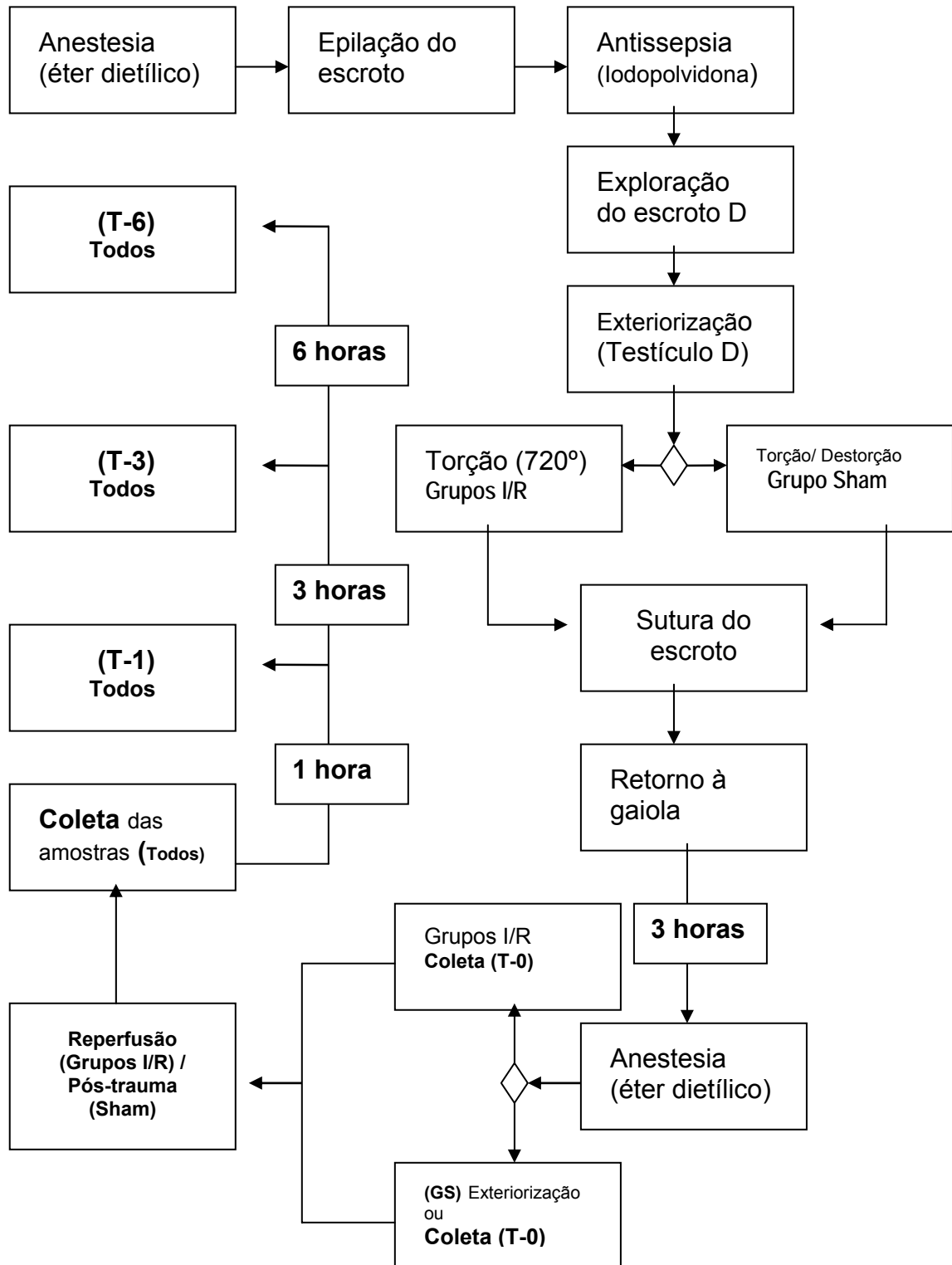


FIGURA 9 – Cor do testículo após três horas de isquemia e três horas de reperfusão (T-3)



FIGURA 10 - Cor do testículo após três horas de isquemia e seis horas de reperfusão (T-6). Observam-se áreas escuras e claras, demonstrando perfusão incompleta da gônada

O fluxograma apresentado abaixo, mostra, de maneira gráfica, todas as etapas cirúrgicas do experimento (FIGURA 11).



Grupo Simulado: (GS)

Grupos I/R: grupo controle, grupo DMSO, grupo ácido lipóico, grupo ternatina / DMSO

FIGURA 11 – Fluxograma do experimento

3.3.1 Preparação das drogas utilizadas

A solução salina (0,9%) utilizada no estudo foi produzida pela Química Farmacêutica Gaspar Viana (Fortaleza, CE). O dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado foi produzido por Cromato Produtos Químicos Ltda (Diadema, SP, Brasil). O grau de pureza da substância era de 99%; 1,0 ml do produto, na forma original, continha 1,10 g de DMSO. Para utilização nos animais do grupo dimetilsulfóxido preparou-se uma solução de DMSO a 3% em soro fisiológico. Cada 50 mg do soluto continham 1,5 ml de DMSO e 48,5 ml de solução salina. Cada ml da solução resultante continha 33 mg/ml de DMSO. A solução resultante, observados os critérios de diluição, permitiu padronizar as dosagens empregadas, utilizando, como parâmetro, 1,0 ml / 100 g de peso do rato. Cada rato recebeu, nas 24 horas que antecederam a destorção e o início da reperfusão, em cada uma das três aplicações sucessivas (24, 12 e 4 h), 330 mg Kg⁻¹ peso, considerando-se o tempo transcorrido entre a aplicação da primeira dose e o término do período de isquemia.

O ácido α -lipóico utilizado nas pesquisas foi proveniente da Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A. O ácido α -lipóico, sob a forma de pó, dissolveu-se facilmente em soro fisiológico. Para facilitar a dissolução, colocava-se o tubo de ensaio, contendo a porção previamente pesada em balança analítica de precisão e acrescida de 5,0 ml de solução salina a 0,9%, em banho-maria tépido e, após agitação vigorosa, obtinha-se uma solução clara e sem partículas em suspensão. Acrescentava-se, a seguir, 45,0 ml de solução salina a 0,9%, resultando num volume final de 50,0 ml, contendo 1,0 mg/ml de ácido α -lipóico. Foram preparadas soluções iguais em cada um dos tempos de utilização do ácido α -lipóico (24, 12 e 4 horas antes da destorção do cordão espermático). O parâmetro utilizado foi 1,0 ml /100 g de peso do animal, cada dose, completando-se com solução salina para obtenção do volume total injetado de 2,0 ml, quando necessário. Cada rato recebeu, num período de 24 horas, em três aplicações sucessivas, uma dose total de 30 mg Kg⁻¹ peso, considerando-se o tempo transcorrido entre a aplicação da primeira dose e o término do período de isquemia.

A ternatina utilizada nos experimentos foi fornecida pelo grupo de pesquisa de produtos naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. O protocolo de extração e purificação da ternatina

foi o mesmo utilizado por SOUSA et al (1997), seguindo as recomendações de LIMA et al. (1996).

Em linhas gerais, os capítulos florais de *E. viscosa* L., localmente adquiridos e adequadamente identificados, após secagem em ar ambiente, foram reduzidos a pó (4 Kg), desengordurados com hexano frio e extraídos com EtOH a frio. Após evaporação, obteve-se um resíduo viscoso de cor amarronzada (246 g), a seguir cromatografado em sílica gel (720) por eluição com hexano, CHCl_3 puro, ETOAc e MeOH, originando um precipitado amarelo na fração CHCl_3 . Após filtração e recristalização com MeOH obteve-se o flavonóide (718 mg, ponto de fusão 215-216° C) que foi identificado pela espectrometria de massa como ternatina (4', 5-dihidroxi-3,3',7,8-tetramoxiflavona).

Como a ternatina não apresenta hidrossolubilidade, utilizou-se um solvente (DMSO) para permitir seu uso no experimento. A preparação da ternatina para o uso intraperitoneal foi realizada da maneira descrita abaixo:

Utilizando-se uma balança analítica de precisão pesou-se a ternatina disponível, separando-se três porções, cada uma com 60,0 mg; após pesagem, o material depositado em um tubo plástico, armazenado em vasilhame opaco e mantido sob refrigeração convencional para posterior utilização.

Para preparação da droga colocou-se a primeira porção separada (60,0 mg) de ternatina em um grau de porcelana e exatamente 1,5 ml de DMSO puro foi cuidadosamente adicionado e macerado com o pistilo até obtenção de uma solução uniforme. Acrescentou-se, a seguir, lentamente, 48,5 ml de solução salina 0,9%; o volume final do soluto foi de 50,0 ml. Cada ml da solução continha 1,2 mg de ternatina diluída em solução de DMSO a 3%. Soluções frescas foram utilizadas em cada etapa do experimento.

As condições da preparação permitiram utilizar, como parâmetro, 1,0 ml da solução resultante para cada 100 g de peso do rato, otimizando assim o cálculo da dose necessária para cada animal, evitando perdas ou aplicação de doses incorretas.

Cada rato recebeu, num período de 24 horas, em três aplicações sucessivas, 12 mg Kg^{-1} peso (dose total: 36 mg Kg^{-1}), considerando-se o tempo transcorrido entre a aplicação da primeira dose e o término do período de isquemia.

3.3.2 Técnica laboratorial

3.3.2.1. *Preparação dos espécimes (sangue e tecido testicular)*

Os tubos de ensaio contendo sangue arterial heparinizado (2,0 ml) foram colocados em centrífuga refrigerada Jouan modelo MR23i (França) e centrifugados a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, mantendo-se a temperatura interna em 10° C. O plasma assim obtido foi dividido em alíquotas e imediatamente armazenado a - 70° C.

Após remoção do epidídimo, o testículo foi lavado com soro fisiológico gelado (4° C) para remoção dos resquícios de sangue e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido a cerca de 190 graus centígrados negativos. Após o congelamento, procedeu-se à fragmentação do material utilizando-se grau e pistilo de porcelana. Os fragmentos, em número variável (4 a 6), foram colocados em tubos de ensaio e armazenados a 70 graus centígrados negativos, até sua utilização.

3.3.2.2 *Avaliação da peroxidação lipídica*

A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA) formado na peroxidação lipídica. Procedeu-se, a seguir, a extração deste composto usando um solvente orgânico (n-butanol), determinando-se a concentração de MDA que será expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Utilizou-se no presente estudo, para a quantificação do teor de TBARS no tecido (testículo) o teste de Uchiyama e Mihara (1978), semelhante ao acima descrito, onde a concentração de TBARS é expressa em $\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no testículo:

O MDA é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico originando um composto de cor rosa.

Reagentes:

Cloreto de potássio: 1,15%

Ácido tiobarbitúrico: 0,6%

Ácido fosfórico: 1%
N-butanol

Procedimento:

O teor de TBARS ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) foi quantificado pelo método de Uchiyama e Mihara (1978), freqüentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica. A amostra do tecido (testículo) a ser analisado foi congelada em nitrogênio líquido e estocada a -70°C imediatamente após a coleta e lavagem com soro fisiológico gelado (4°C) para remover quaisquer vestígios de sangue. Após pesagem, a amostra de tecido foi homogeneizada em KCl gelado 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml de cada amostra e acrescentou-se 1,0 ml da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). A mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo seguido da adição de 4,0 ml de N-butanol. Após 2,0 minutos de agitação a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. A absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-640 (Fullerton, Califórnia) a 520 nm e 535 nm.

A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão, adrede preparada (APÊNDICE C). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco.

3.3.2.3 *Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)*

A determinação dos grupos SH é realizada pelo Método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrozênzóico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412nm em espectrofotômetro (Beckman DU-640, Fullerton, Califórnia).

Drogas e reagentes

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)
Ácido tricloacético (ATC,50%)

Tampão TRIS 0,4 M pH 8,9

5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico (DTNB) 0,5M)

Metanol

Glutathiona (GSH, 1 mg/ml).

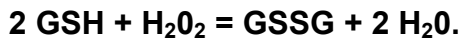
Preparação dos reagentes:

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

EDTA Na₂ 0,2M PM 372,2 (% 211g + H₂O *qsp* 70.0 ml)

EDTA Na₂ 0,02M (30 ml de EDTA Na₂ 0,2M + H₂O *qsp* 300 ml)

Reação



Procedimento:

A amostra de testículo (500 mg) é pesada e homogeneizada em 5 ml de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado em lã de vidro. Retiram-se 4,0 ml do homogenato e mistura-se com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético 50%. O tubo é agitado e centrifugado a 3000 g por 15 minutos. Retiram-se 2,0 ml do sobrenadante e acrescenta-se 4 ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M; agita-se a mistura para homogeneização. Em seguida, lêem-se as absorvâncias no espectrofotômetro à 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH é obtida comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada (APÊNDICE D).

3.3.2.4 Determinação da Capacidade Antioxidante Total do plasma

A capacidade antioxidante de uma amostra de plasma contendo heparina pode ser investigada pela aferição do Cu⁺ resultante da ação conjunta dos antioxidantes presentes na amostra sobre o Cu⁺⁺. Para a detecção do Cu⁺ utiliza-se o complexo formado pela reação entre o Cu⁺ e a batocuproína, um quelante de metais. O complexo produzido é estável e tem uma absorvância máxima entre 480-

490nm. Os valores de absorvância obtidos são comparados com uma curva padrão obtida usando-se o ácido úrico como agente redutor. Há estreita correlação entre a resistência dos lipídios plasmáticos e a Capacidade Antioxidante Total (CAP). Quanto maior for o valor da CAP mais protegidos estarão os lipídios do plasma contra a oxidação.

A avaliação da capacidade antioxidante total foi realizada utilizando-se o teste “*Total Antioxidant Power*” (Oxford, TA 01).

Composição do “kit”:

1. Solução tampão, contendo ácido dissulfônico batocupreínico (60,0 ml)
2. Solução de Cu^{++} (5,0 ml)
3. Solução contendo EDTA (5,0 ml)
4. Ácido úrico padronizado e liofilizado (2,0 ml)

Preparação dos padrões:

Como o ácido úrico foi fornecido na forma sólida, utilizou-se água destilada e deionizada para a diluição, acrescentada lentamente (1,5 ml), deixando-a escorrer pelos lados internos do frasco. Para obter-se uma mistura adequada, utilizou-se um misturador tipo vortex, durante 30-60 segundos. Obteve-se assim o Padrão 5 ($\text{P}_5 = 2,0 \mu\text{M}$), que mantém sua estabilidade durante um ano, quando corretamente armazenado ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$). Utilizando diluições sucessivas, foram preparados os demais padrões, como explicado a seguir:

Padrão 4 ($\text{P}_4 = 1,0 \text{ mM}$): diluição de 500 μl de P_5 em 500 μl de água destilada e deionizada.

Padrão 3 ($\text{P}_3 = 0,5 \text{ mM}$): diluição de 500 μl de P_4 em 500 μl de água destilada e deionizada.

Padrão 2 ($\text{P}_2 = 0,25 \text{ mM}$): diluição de 500 de P_3 em 500 μl de água destilada e deionizada.

Padrão 1 ($\text{P}_1 = 0,125 \text{ mM}$): diluição de 500 μL de P_2 em 500 μl de água destilada e deionizada.

Padrão 0 (P_0): 500 μl de água destilada e deionizada.

Técnica laboratorial:

1. As amostras e os componentes do *kit* foram deixados em repouso até atingirem a temperatura ambiente. Para preparação das amostras, procedeu-se a diluição (1:40), acrescentando-se 15 µl de plasma a 585 µl do tampão.
2. Colocou-se, a seguir, 200 µl da amostra diluída ou do padrão em cada poço da microplaca. Para preparação do Branco, usou-se o tampão em lugar da amostra diluída.
3. A placa foi agitada e a leitura das densidades ópticas (absorbâncias) foi realizada num espectrofotômetro Organon Teknika Reader 230S versão 1.23, em 590 nm.
4. Acrescentou-se 50 µM da solução de cobre (Cu⁺) em cada poço; a mistura foi incubada durante 3 minutos à temperatura ambiente.
5. Acrescentou-se 50 µM da solução de EDTA e efetuou-se a segunda leitura a 490 nm.
6. As diferenças entre as duas leituras de cada padrão gerou um resultado utilizado para a construção da curva padrão (APÊNDICE E).
7. As diferenças de densidades ópticas das duas leituras foram comparadas à curva padrão para obtenção da concentração final. Para obtenção do Poder Antioxidante Total da amostra, multiplicou-se o valor obtido pelo fator de conversão (2189 µM) vez que 1mM de ácido úrico tem um poder antioxidante de 2189 µM.
8. Os valores foram expressos em µM de Capacidade Antioxidante Total ou Poder Antioxidante Total do plasma.

3.4 Análise estatística

Para todas as variáveis, realizou-se uma análise descritiva dos dados (APÊNDICE F) onde foram determinadas as curvas de normalidade aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e calculados a média amostral e o erro padrão da média (E.P.M). Tem-se:

$$E.P.M. = \frac{s}{\sqrt{n}}, \text{ onde } s \text{ é o desvio padrão amostral e } n \text{ o tamanho da amostra.}$$

Comparações transversais foram realizadas entre os diversos subgrupos (T-0, T-1, T-3 e T-6) com os respectivos controles (diferentes animais, nos mesmos momentos), utilizando-se testes paramétricos (teste *t* de Student), após comprovação da normalidade da distribuição das variáveis pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (com cálculo do valor de *P* pelo método de Dalal-Wilkinson-Lilliefor).

ANOVA com comparações *post hoc* (teste de Tukey-Kramer) foi utilizada para comparações múltiplas entre os subgrupos (diferentes animais em momentos diferentes). Para as comparações entre o grupo controle (tratamento: solução salina) e os demais grupos isquêmicos, tratados com antioxidantes, utilizou-se o teste de Dunnett (ANOVA).

O teste de Kolmogorov-Smirnov também foi utilizado para determinação da normalidade ponderal dos animais utilizados no experimento (APÊNDICE B).

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se os programas de análise estatística *GraphPad InStat® versão 3.00* e *GraphPad Prism® versão 4.00* para *Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, U.S.A., www.graphpad.com*.

Os resultados foram apresentados sob forma de tabelas e gráficos. A significância estatística foi fixada em 0,05% ($p < 0,05$), assinalando-se com o símbolo [*] os valores significantes nas comparações inter-grupais e com os símbolos [+, ‡, #] nas comparações das variações temporais entre os diversos subgrupos (T-0, T-1, T-3 e T-6) do mesmo grupo.

4 RESULTADOS

4.1 No tecido (testículo)

4.1.1 Efeito do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos pré-tratados com solução salina (SS) (Tabela 1, Figuras 12 e 13)

Ocorreu aumento significativo na concentração de TBARS no testículo dos ratos do grupo Controle (GC) submetidos à isquemia/reperfusão, comparados ao grupo Simulado (GS) no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (T-1, T-3 e T-6). Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de MDA no grupo Controle (GC) após uma hora de reperfusão (T-1), comparada ao T-0.

TABELA 1 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/reperfusão (GC)

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após destorção ou segunda operação simulada (Sham)			
		0	1	3	6
Solução salina + Sham	Simulado (GS)	14,29 \pm 2,20	21,14 \pm 2,67	21,60 \pm 0,91	20,42 \pm 0,69
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	27,48 \pm 3,73 *	40,30 \pm 2,15 ***+	31,97 \pm 1,73 ***	32,78 \pm 3,68 **

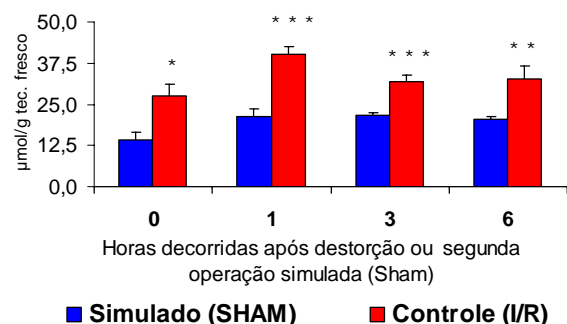
Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 24 ratos (Média \pm E.P.M)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle

+ $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

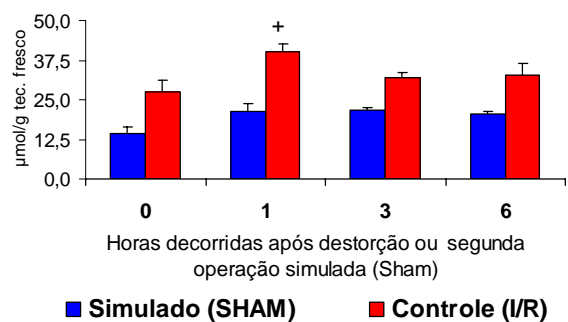


Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média \pm E.P.M) (variações temporais)

+ $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

FIGURAS 12 e 13 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/reperfusão (GC)

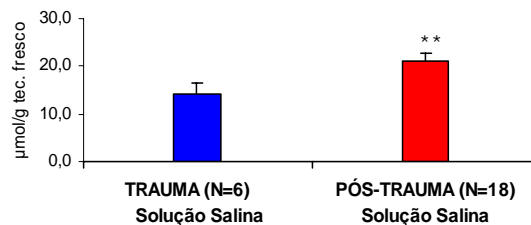
4.1.2 Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo de ratos pré-tratados com solução salina, comparando os grupos Simulado (Trauma vs. Pós-Trauma) e Controle (Isquemia vs. Reperusão) (Tabelas 2 e 3, Figuras 14 e 15)

Verificou-se aumento significativo nas concentrações teciduais de TBARS, no testículo dos ratos do grupo Simulado (GS), no período pós-trauma.

TABELA 2 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os sub-grupos Trauma vs. Pós-trauma (Simulado), em ratos pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma

TRATAMENTO	GRUPO	TRAUMA	PÓS-TRAUMA
Solução salina + Sham	Simulado (GS)	14,29 \pm 2,20	21,05 \pm 0,92 **

Teste *t* em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M) ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle



Teste *t* em 6 (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

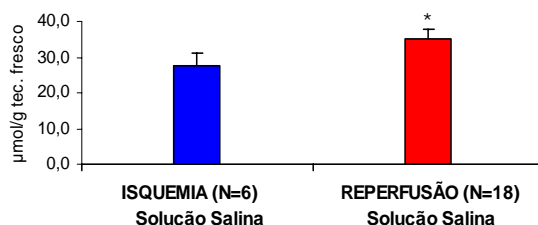
FIGURA 14 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os subgrupos Trauma vs. Pós-trauma, em ratos tratados com solução salina (grupo Simulado) e submetidos ao trauma

Houve aumento significativo nas concentrações teciduais de TBARS, no testículo dos ratos do grupo Controle (GC), durante a reperusão.

TABELA 3 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os sub-grupos Isquemia vs. Reperusão (grupo Controle), em ratos pré-tratados com solução salina e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	ISQUEMIA	REPERFUSÃO
Solução salina + Isquemia/Reperusão	Controle (GC)	27,48 \pm 3,73	35,01 \pm 1,70 *

Teste *t* em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M) ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle



Teste *t* em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle

FIGURA 15 - Concentrações de TBARS no testículo, comparando-se os subgrupos Isquemia vs. Reperusão em ratos tratados com solução salina (grupo Controle) e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

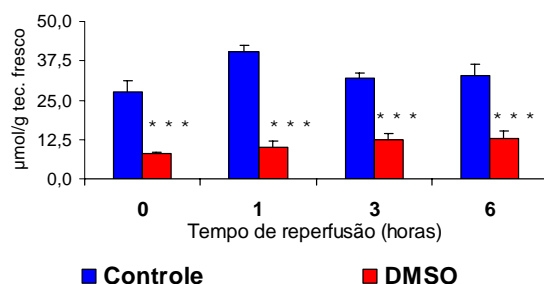
4.1.3 Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção / destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 4, Figuras 16 e 17)

Ocorreu redução significativa ($p < 0,001$) nas concentrações de TBARS, no testículo dos ratos tratados com DMSO, comparados aos ratos do grupo Controle, tratados com solução salina, ambos submetidos à I/R, no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (T-1, T-3 e T-6). Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de MDA após uma hora de reperfusão (T-1), comparado ao T-0, no grupo Controle.

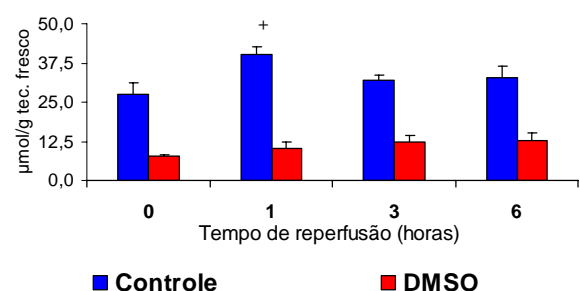
TABELA 4 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC), tratado com solução salina e DMSO (GD), tratado com dimetilsulfóxido e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)			
		0	1	3	6
Solução salina + Isquemia/Reperfusion	Controle (GC)	27,48 \pm 3,73	40,30 \pm 2,15 +	31,97 \pm 1,73	33,78 \pm 3,68
Dimetilsulfóxido + Isquemia/Reperfusion	DMSO (GD)	7,95 \pm 0,37 ***	10,17 \pm 1,93 ***	12,46 \pm 1,88 ***	12,76 \pm 2,25 ***

Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 24 ratos (Média \pm E.P.M)
 *** $p < 0,0001$ comparado ao respectivo controle + $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo



Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)
 *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média \pm E.P.M)
 + $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

FIGURAS 16 e 17 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC) vs. Dimetilsulfóxido (GD) tratados, respectivamente, com solução salina e dimetilsulfóxido e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

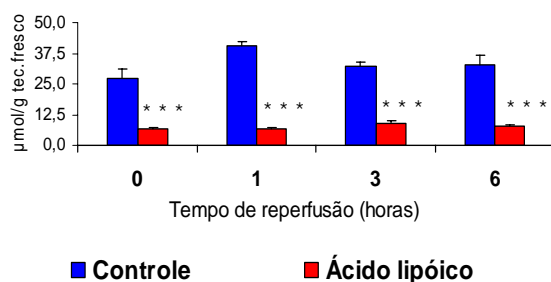
4.1.4 Efeito do ácido lipóico (LA) sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção / destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 5, Figuras 18 e 19)

Observou-se redução significativa ($p < 0,01$) nas concentrações de TBARS, no testículo dos ratos tratados com ácido lipóico (GA) e submetidos à I/R, comparados ao grupo Controle (GC), tratado com solução salina e também submetido à I/R, no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão. Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de MDA após uma hora de reperfusão (T-1), comparada a T-0, no grupo Controle (GC).

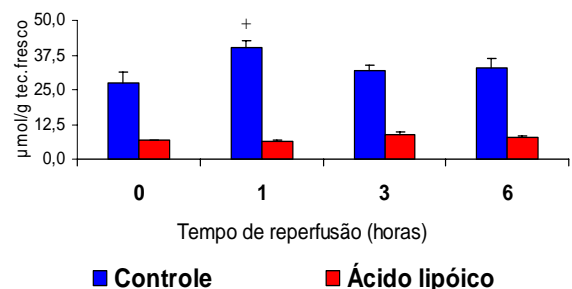
TABELA 5 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se grupos Controle (GC), tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), tratado com ácido lipóico e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)			
		0	1	3	6
Solução salina + Isquemia/Reperfusion	Controle (GC)	27,48 \pm 3,73	40,30 \pm 2,15 +	31,97 \pm 1,73	33,78 \pm 3,68
Ácido Lipóico + Isquemia/Reperfusion	Ac. Lipóico (GA)	6,65 \pm 0,34 ***	6,59 \pm 0,41 ***	8,70 \pm 1,23 ***	7,64 \pm 0,77 ***

Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 24 ratos (Média \pm E.P.M)
 *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle + $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo



Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)
 *** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média \pm E.P.M)
 + $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo (variações temporais)

FIGURAS 18 e 19 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC) vs. Grupo Ácido lipóico (GA), tratados, respectivamente, com solução salina e ácido lipóico e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

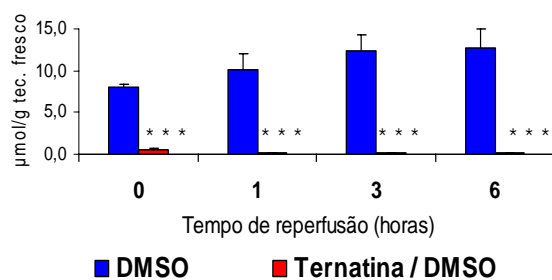
4.1.5 Efeito da ternatina+dimetilsulfóxido sobre as concentrações teciduais de TBARS em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção / destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 6, Figuras 20 e 21)

Observou-se redução significativa ($p < 0,001$) nas concentrações de TBARS, no testículo dos ratos tratados com ternatina+DMSO (GT/D) e submetidos à isquemia/reperfusão, comparados aos ratos do grupo dimetilsulfóxido (GD), tratados com DMSO e também submetidos à I/R, no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (T-1, T-3 e T-6).

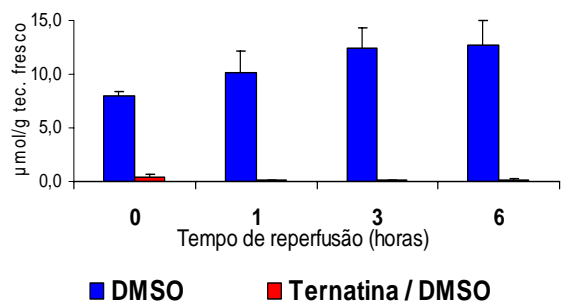
TABELA 6 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina+DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)			
		0	1	3	6
Dimetilsulfóxido + Isquemia/Reperfusão	DMSO (GD)	7,95 \pm 0,37	10,17 \pm 1,93	12,46 \pm 1,88	12,76 \pm 2,25
Ternatina + DMSO + Isquemia/Reperfusão	Ternatina / DMSO (GT/D)	0,46 \pm 0,15 ***	0,12 \pm 0,03 ***	0,14 \pm 0,01 ***	0,18 \pm 0,04 ***

Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 24 ratos (Média \pm E.P.M)
*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle (GD)



Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)
*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle (GD)



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média \pm E.P.M)
(variações temporais)

FIGURAS 20 e 21 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina+DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

4.1.6 Efeito do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico e ternatina + dimetilsulfóxido sobre as concentrações teciduais de TBARS, comparando os ratos pré-tratados com antioxidantes aos ratos pré-tratados com solução salina, todos submetidos à I/R do testículo, no tempo máximo de isquemia (T-0) (Tabela 7, Figuras 22 e 23)

Observaram-se alterações significantes ($p < 0,001$) das concentrações de TBARS, com redução nos grupos dimetilsulfóxido (GD), ácido lipóico (GA) e ternatina/DMSO (GT/D), comparados ao grupo Controle (GC), no tempo de máximo de isquemia (T-0). Nas comparações intergrupais observaram-se alterações significantes entre os grupos GA vs. GC, GT/D vs. GC e GT/D vs. GD.

TABELA 7 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)

Tratamento	Grupo (N=24)	ISQUEMIA (T-0)
Solução salina + Isquemia	Controle (GC)	$27,58 \pm 3,73^{**}$
Dimetilsulfóxido + Isquemia	Dimetilsulfóxido (GD)	$7,95 \pm 0,37^{**} \uparrow\uparrow\uparrow$
Ácido Lipóico + Isquemia	Ácido lipóico (GA)	$6,65 \pm 0,34^{**} \uparrow\uparrow\uparrow$
Ternatina + DMSO + Isquemia	Ternatina+DMSO (GT/D)	$0,47 \pm 0,15^{**} + \uparrow\uparrow\uparrow$

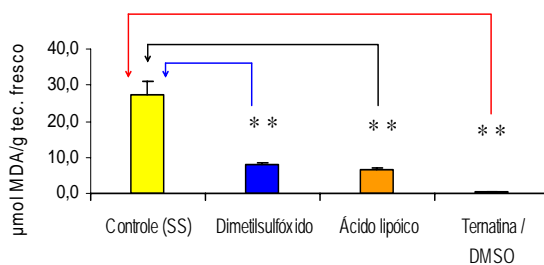
ANOVA – Testes de Dunnett e Tukey-Kramer em 24 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle

+ $p < 0,05$ comparado ao grupo Dimetilsulfóxido

$\uparrow\uparrow\uparrow$ $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle

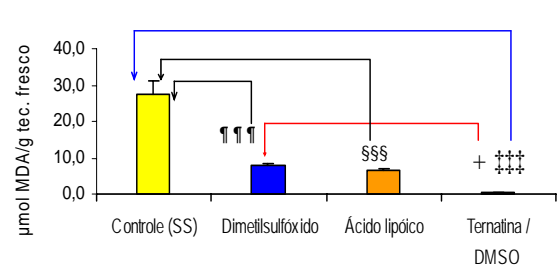
$\uparrow\uparrow\uparrow$ $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle



ISQUEMIA (T-0)

ANOVA – Teste de Dunnett em 24 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle



ISQUEMIA (T-0)

ANOVA – Teste de Tukey-Kramer em 24 ratos (Média \pm E.P.M)

+ $p < 0,05$ comparado ao grupo Dimetilsulfóxido

$\uparrow\uparrow\uparrow$ $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle

$\uparrow\uparrow\uparrow$ $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle

$\uparrow\uparrow\uparrow$ $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle

FIGURAS 22 e 23 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina+DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)

4.1.7 Efeito do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico e ternatina+DMSO sobre as concentrações teciduais de TBARS, comparando os ratos pré-tratados com antioxidantes aos ratos pré-tratados com solução salina, todos submetidos à I/R do testículo, na reperfusão (T-1 + T-3 + T-6) (Tabela 8, Figuras 24 e 25)

Observaram-se alterações significantes ($p < 0,05$) das concentrações de TBARS, com redução dos valores aferidos nos grupos dimetilsulfóxido (GD), ácido lipóico (GA) e ternatina/DMSO (GT/D), comparados ao grupo Controle (GC), durante a reperfusão (T-1+T-3+T-6). Nas comparações intergrupais observaram-se alterações significantes entre os grupos GD, GA e GT/D vs. GC, GT/D vs. GA e GD.

TABELA 8 – Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle , pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperfusão (T1+T3+T-6)

Tratamento	Grupo (N=18)	REPERFUSÃO (T1+T3+T6)
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	$35,01 \pm 1,70$
Dimetilsulfóxido + Isquemia/Reperfusão	Dimetilsulfóxido (GD)	$11,79 \pm 1,13$ **
Ácido Lipóico + Isquemia/Reperfusão	Ácido lipóico (GA)	$7,64 \pm 0,89$ ***
Ternatina + DMSO+ Isquemia/Reperfusão	Ternatina+DMSO (GT/D)	$0,15 \pm 0,02$ *** +++ ††

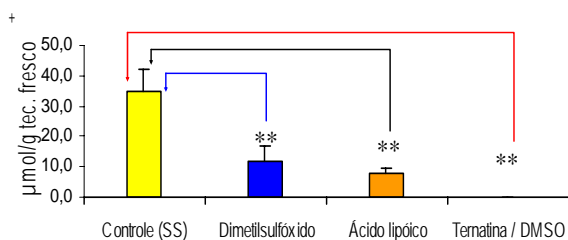
ANOVA – Testes de Dunnett e Tukey-Kramer em 24 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle

*** $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle

†† $p < 0,01$ comparado ao grupo Ácido lipóico

+++ $p < 0,001$ comparado ao grupo DMSO

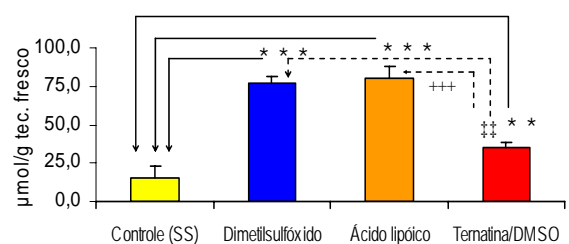


REPERFUSÃO (T1 + T3 + T6)

ANOVA – Teste de Kruskal-Wallis / Dunn em 72 ratos (Média \pm E.P.M) (grupos DMSO, Ácido lipóico e Ternatina/DMSO comparados ao grupo Controle)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle

*** $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle



REPERFUSÃO (T1+T3+T6)

ANOVA – Teste de Kruskal-Wallis / Dunn em 72 ratos (Média \pm E.P.M) (comparações múltiplas)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle

*** $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle

†† $p < 0,01$ comparado ao grupo Ácido lipóico

+++ $p < 0,001$ comparado ao grupo DMSO

FIGURAS 24 e 25 - Concentrações de TBARS ($\mu\text{mol MDA/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina +DMSO) ao grupo GC - Controle , pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperfusão (T1+T3+T-6)

4.1.8 Efeito do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos pré-tratados com solução salina (SS) (Tabela 9, Figuras 26 e 27)

Ocorreu uma redução significativa ($p < 0,01$) nas concentrações de GSH no testículo dos ratos do grupo Controle (GC), submetidos à I/R do testículo, comparados ao grupo Simulado (Sham), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão. Houve aumento significativo da concentração de GSH no grupo Sham após uma (T-1) e três horas de reperfusão (T-3) comparados ao T-0.

TABELA 9 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/reperfusão (GC)

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após destorção ou operação simulada (Sham)			
		0	1	3	6
Solução salina + Sham	Simulado (GS)	60,80 \pm 8,09	106,00 \pm 12,67 +++	96,71 \pm 10,22 ‡	85,91 \pm 2,21
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	15,40 \pm 3,87 **	17,25 \pm 3,21 ***	15,66 \pm 3,57 ***	13,47 \pm 2,85 ***

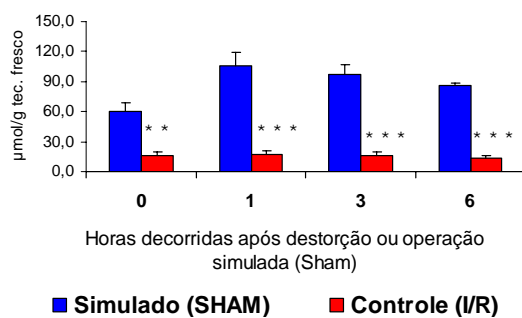
Testes: t e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 24 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle

‡ $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

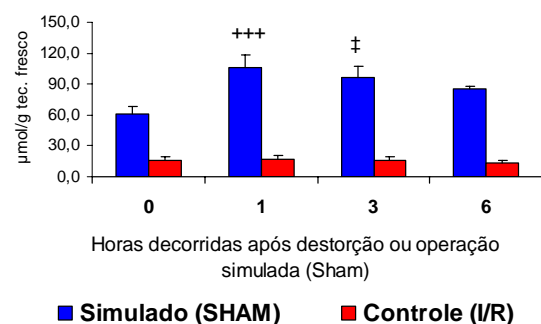
+++ $p < 0,001$ comparado ao T-0 no mesmo grupo



Teste t em 6 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média \pm E.P.M) (variações temporais)

‡ $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

+++ $p < 0,01$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

FIGURAS 26 e 27 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/reperfusão (GC)

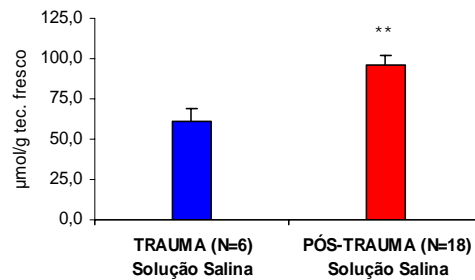
4.1.9 Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo de ratos pré-tratados com solução salina, comparando os grupos Simulado (Trauma vs. Pós-Trauma) e Controle (Isquemia / Reperusão) (Tabelas 10 e 11, Figuras 28 e 29)

Houve aumento significativo nas concentrações teciduais de GSH, no testículo dos ratos do grupo Simulado (Sham), no período pós-trauma.

TABELA 10 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os subgrupos Trauma vs. Pós-trauma (G-1), em ratos pré-tratados com solução salina (grupo Simulado) e submetidos ao trauma

TRATAMENTO	GRUPO	TRAUMA	PÓS-TRAUMA
Solução salina + Sham	Simulado (GS)	60,80 \pm 8,09	96,21 \pm 5,52**

Teste *t* em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M) ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle



Teste *t* em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M) ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

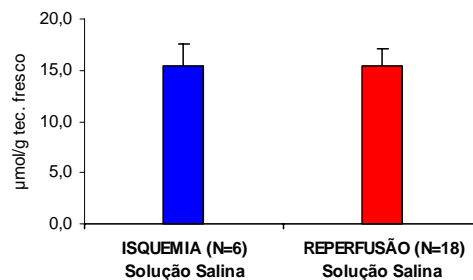
FIGURA 28 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os subgrupos Trauma vs. Pós-trauma, em ratos tratados com solução salina e submetidos ao trauma (grupo Simulado)

Não ocorreram diferenças significantes nos ratos do grupo Controle (GC).

TABELA 11 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os subgrupos Isquemia vs. Reperusão (G-2), em ratos pré-tratados com solução salina e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	ISQUEMIA	REPERFUSÃO
Solução salina + Isquemia/Reperusão	Controle (GC)	15,40 \pm 3,87	15,46 \pm 1,79

Teste *t* em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)



Teste *t* em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

FIGURA 29 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os subgrupos Isquemia vs. Reperusão em ratos tratados com solução salina e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

4.1.10 Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção / destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 12, Figuras 30 e 31)

Ocorreu aumento significativo ($p < 0,001$) nas concentrações de GSH no testículo dos ratos tratados com DMSO (GD) comparados ao grupo Controle (GC), tratados com solução salina, todos submetidos à I/R, no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (T-1, T-3 e T-6). Houve aumento significativo ($p < 0,001$) nas concentrações de GSH no testículo dos ratos tratados com DMSO, após 3 horas de reperfusão (T-3), comparado ao tempo máximo de isquemia (T-0).

TABELA 12 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC), tratado com solução salina e DMSO (GD), tratado com dimetilsulfóxido e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

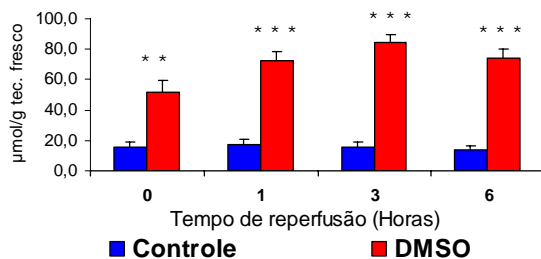
TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)			
		0	1	3	6
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	15,40 \pm 3,87	17,25 \pm 3,21	15,66 \pm 3,56	13,47 \pm 2,85
Dimetilsulfóxido + Isquemia/Reperfusão	DMSO (GD)	51,34 \pm 8,02 **	77,72 \pm 5,48 ***	84,43 \pm 4,86 *** +++	73,97 \pm 6,24 ***

Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 24 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle

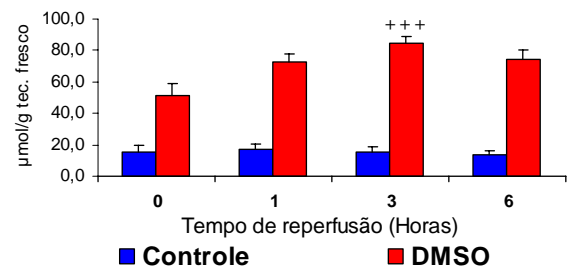
+++ $p < 0,001$ comparado ao T-0 no mesmo grupo



Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média \pm E.P.M)
(variações temporais)

+++ $p < 0,001$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

FIGURAS 30 e 31 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos Controle (GC) vs. Dimetilsulfóxido (GD) tratados, respectivamente, com solução salina e dimetilsulfóxido e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

4.1.11 Efeito do ácido lipóico (LA) sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção / destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 13, Figuras 32 e 33)

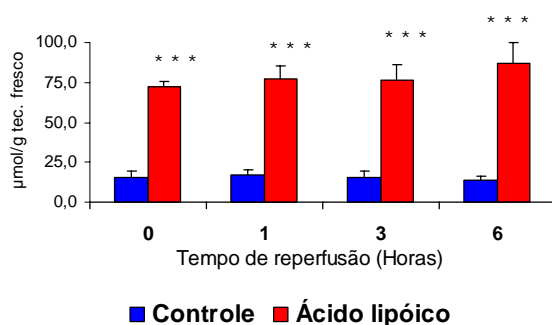
Observou-se aumento significativo ($p < 0,01$) nas concentrações de GSH, no testículo dos ratos tratados com LA (GA) comparados aos ratos do grupo Controle (GC), tratados com solução salina, ambos submetidos à isquemia/reperfusão, no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão.

TABELA 13 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se grupos Controle (GC), tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), tratado com ácido lipóico e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)			
		0	1	3	6
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	15,40 \pm 3,87	17,25 \pm 3,21	15,66 \pm 3,56	13,47 \pm 2,85
Ácido Lipóico + Isquemia/Reperfusão	Ac. Lipóico (GA_IR)	72,65 \pm 3,25 ***	77,61 \pm 8,00 ***	76,12 \pm 10,07 ***	87,08 \pm 12,60 ***

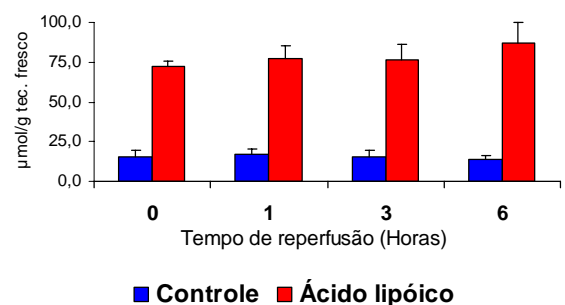
Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 24 ratos (Média \pm E.P.M)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média \pm E.P.M) (variações temporais)

FIGURAS 32 e 33 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se grupos Controle (GC), tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), tratado com ácido lipóico, submetidos à torção/destorção do cordão espermático

4.1.12 Efeito da ternatina+DMSO (TN+DMSO) sobre as concentrações teciduais de GSH em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção / destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 14, Figuras 34 e 35)

Observou-se redução significativa ($p < 0,01$) nas concentrações de GSH, no testículo dos ratos tratados com ternatina+DMSO (GT/D) comparados aos ratos do grupo GD, tratados com DMSO, todos submetidos à torção / destorção do cordão espermático durante a reperfusão (T-1, T-3 e T-6).

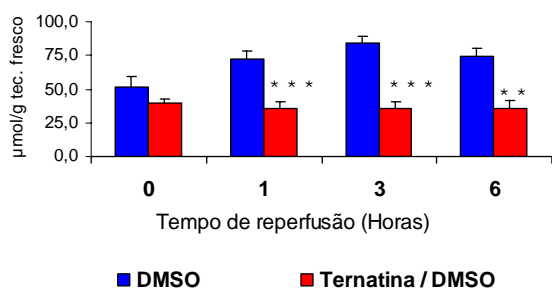
TABELA 14 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina+DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)			
		0	1	3	6
Dimetilsulfóxido + Isquemia/Reperfusão	DMSO (GD)	51,34±8,02	77,72±5,48	84,43±4,86	73,97 ± 6,24
Ternatina + DMSO Isquemia/Reperfusão	Ternatina/ DMSO (GT/D)	39,85±2,43	35,99±4,54 ***	35,22±5,69 ***	35,65±5,88 **

Testes: t e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 24 ratos (Média ± E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

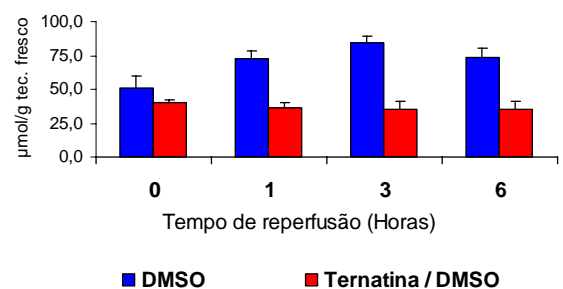
*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Teste t em 6 ratos (Média ± E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle

*** $p < 0,001$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média ± E.P.M)
(variações temporais)

FIGURAS 34 e 35 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tecido fresco) no testículo, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina +DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

4.1.13 *Efeito do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico e ternatina+dimetilsulfóxido sobre as concentrações teciduais de GSH, comparando os ratos pré-tratados com antioxidantes aos ratos pré-tratados com solução salina, todos submetidos à I/R do testículo, no tempo máximo de isquemia (T-0) (Tabela 15, Figuras 36 e 37)*

Observaram-se alterações significantes ($p < 0,001$) das concentrações de GSH, com aumento dos valores aferidos nos grupos dimetilsulfóxido (GD), ácido lipóico (GA) e ternatina/DMSO (GT/D), comparados ao Controle (GC), no tempo de máximo de isquemia (T-0)

TABELA 15 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)

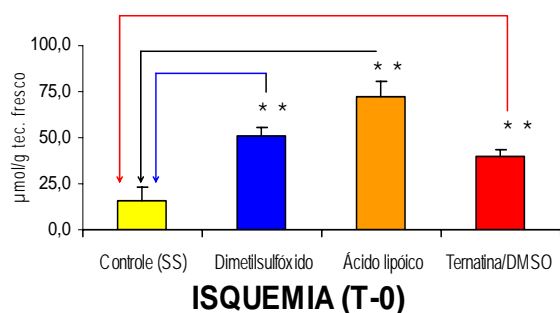
Tratamento	Grupo (N=6)	ISQUEMIA (T-0)
Solução salina + Isquemia	Controle (GC)	15,40 ± 3,87
Dimetilsulfóxido + Isquemia	Dimetilsulfóxido (GD)	51,34 ± 8,02 **
Ácido Lipóico + Isquemia	Ácido lipóico (GA)	72,65 ± 3,25 ** ‡
Ternatina + DMSO + Isquemia	Ternatina+DMSO (GT/D)	39,85 ± 2,43 ** +++

ANOVA – Testes de Dunnett e Tukey-Kramer em 24 ratos (Média ± E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle

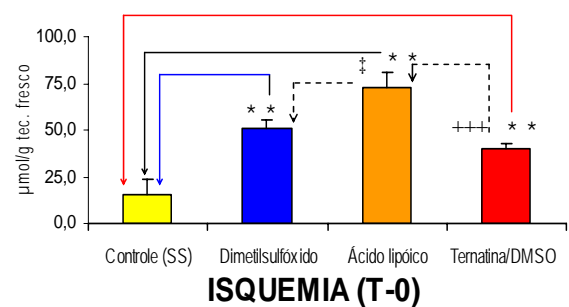
‡ $p < 0,05$ comparado ao grupo Dimetilsulfóxido

+++ $p < 0,001$ comparado ao grupo Ácido lipóico



ANOVA – Teste de Dunnett em 24 ratos (Média ± E.P.M)

** $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle



ANOVA – Teste de Tukey-Kramer em 24 ratos (Média ± E.P.M)

‡ $p < 0,05$ comparado ao grupo Dimetilsulfóxido

** $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle

+++ $p < 0,001$ comparado ao grupo Ácido lipóico

FIGURAS 36 e 37 - Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)

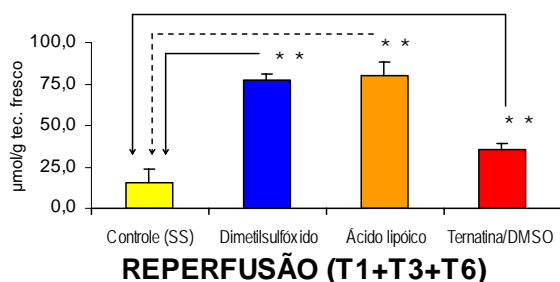
4.1.14 Efeito do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico e ternatina + dimetilsulfóxido sobre as concentrações teciduais de GSH, comparando os ratos pré-tratados com antioxidantes aos ratos pré-tratados com solução salina, todos submetidos à torção / destorção do cordão espermático do testículo, na reperfusão (T-1 + T-3 + T-6) (Tabela 16, Figuras 38 e 39)

Observaram-se alterações significantes das concentrações de GSH, com redução nos grupos dimetilsulfóxido (GD), ácido lipóico e ternatina/DMSO (GT/D), durante a reperfusão (T-1 + T-3 + T-6), comparados ao Controle (GC).

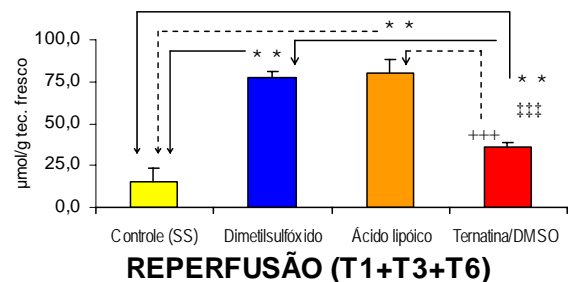
TABELA 16 – Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperfusão (T-1+T-3+T-6)

Tratamento	Grupo (N=18)	REPERFUSÃO (T1+T3+T6)
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	15,46 \pm 1,79
Dimetilsulfóxido + Isquemia/Reperfusão	Dimetilsulfóxido (GD)	77,04 \pm 3,27 **
Ácido Lipóico + Isquemia/Reperfusão	Ácido lipóico (GA)	80,27 \pm 5,76 **
Ternatina + DMSO + Isquemia/Reperfusão	Ternatina+DMSO (GT/D)	35,62 \pm 2,93 ** ††† †††

ANOVA – Testes de Dunnett e Tukey-Kramer em 72 ratos (Média \pm E.P.M)
 ** p<0,01 comparado ao grupo Controle ††† p<0,001 comparado ao grupo Dimetilsulfóxido
 †††† p<0,0001 comparado ao grupo Dimetilsulfóxido
 ††††† p<0,00001 comparado ao grupo Dimetilsulfóxido



ANOVA – Teste de comparações múltiplas de Dunnett em 72 ratos (Média \pm E.P.M)
 ** p<0,01 comparado ao grupo Controle



Anova (Tukey-Kramer) em 72 ratos (Média \pm E.P.M) (variações intergrupais)
 ** p<0,01 comparado ao grupo Controle
 ††† p<0,001 comparado ao grupo Dimetilsulfóxido
 †††† p<0,0001 comparado ao grupo Dimetilsulfóxido

FIGURA 38 e 39- Concentrações de GSH ($\mu\text{mol/g}$) no testículo, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, na reperfusão (T-1+T-3+T-6)

4.2 No plasma

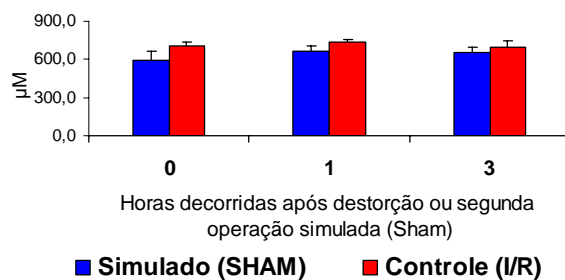
4.2.1 Efeito do trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico sobre a Capacidade Antioxidante Total do plasma em ratos pré-tratados com solução salina (Tabela 17, Figuras 40 e 41)

Não foram encontradas diferenças significantes na Capacidade Antioxidante Total do plasma dos ratos submetidos à operação simulada (GS), comparados aos ratos submetidos à isquemia/reperfusão (GC), ambos tratados com solução salina, em nenhum dos tempos estudados .

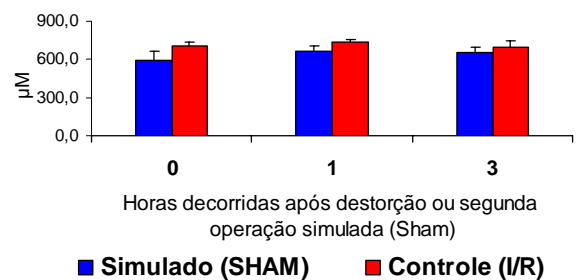
TABELA 17 - Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/reperfusão (GC)

TRATAMENTO	GRUPO	Horas decorridas após destorção ou operação simulada (Sham)		
		0	1	3
Solução salina + Sham	Simulado (GS)	589,3 \pm 70,7	664,6 \pm 42,7	651,1 \pm 46,9
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	707,1 \pm 33,8	732,2 \pm 26,2	695,5 \pm 52,4

Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)



Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)



Anova (Tukey-Kramer) em 18 ratos (Média \pm E.P.M)

FIGURAS 40 e 41 – Capacidade antioxidante total do plasma (μM), comparando-se os grupos Simulado (GS) e Controle (GC), pré-tratados com solução salina e submetidos ao trauma (GS) e à isquemia/reperfusão (GC)

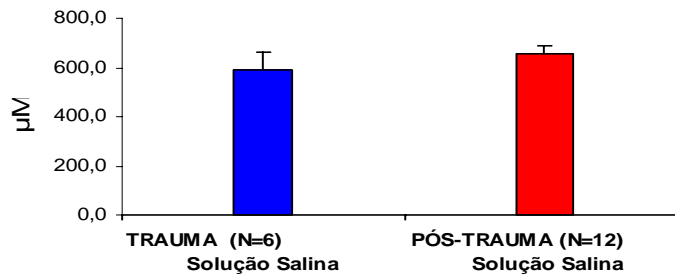
4.2.2 Capacidade Antioxidante Total no plasma de ratos pré-tratados com solução salina, comparando os grupos G-1 (Trauma vs. Pós-Trauma) e G-2 (Isquemia / Reperfusão) (Tabelas 18 e 19, Figuras 42 e 43)

Não ocorreram diferenças significantes na Capacidade Antioxidante total no plasma dos ratos do grupo Simulado (Sham), no período pós-trauma.

TABELA 18 – Capacidade antioxidante total no plasma (μM) de ratos pré-tratados com solução salina, comparando-se os subgrupos Trauma vs. Pós-trauma, em ratos tratados com solução salina (grupo Simulado) e submetidos ao trauma

TRATAMENTO	GRUPO	TRAUMA	PÓS-TRAUMA
Solução salina + Sham	Simulado (GS)	589,3 \pm 70,69	657,90 \pm 30,32

Teste *t* em 6 e 12 ratos (Média \pm E.P.M)



Teste *t* em 6 e 12 ratos (Média \pm E.P.M)

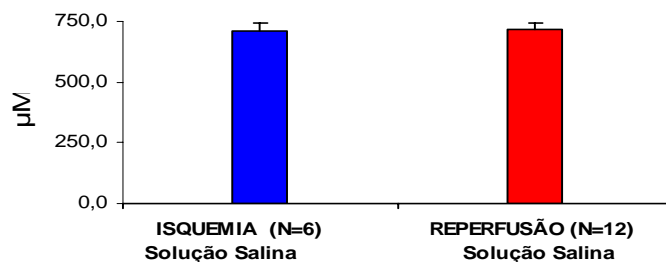
FIGURA 42- Capacidade antioxidante total no plasma (μM) de ratos pré-tratados com solução salina, comparando-se os subgrupos Trauma vs. Pós-trauma, em ratos tratados com solução salina (grupo Simulado) e submetidos ao trauma

Não ocorreram diferenças significantes na Capacidade Antioxidante total no plasma dos ratos do grupo Controle, durante a reperfusão.

TABELA 19 – Capacidade antioxidante total no plasma (μM), comparando-se os sub-grupos Isquemia vs. Reperfusão (grupo Controle), em ratos pré-tratados com solução salina e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	ISQUEMIA	REPERFUSÃO
Solução salina+Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	707,10 \pm 33,81	713,90 \pm 24,86

Teste *t* em 6 e 12 ratos (Média \pm E.P.M)



Teste *t* em 6 e 12 ratos (Média \pm E.P.M)

FIGURA 43 - Capacidade antioxidante total no plasma (μM), comparando-se os sub-grupos Isquemia vs. Reperfusão (grupo Controle), em ratos pré-tratados com solução salina e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

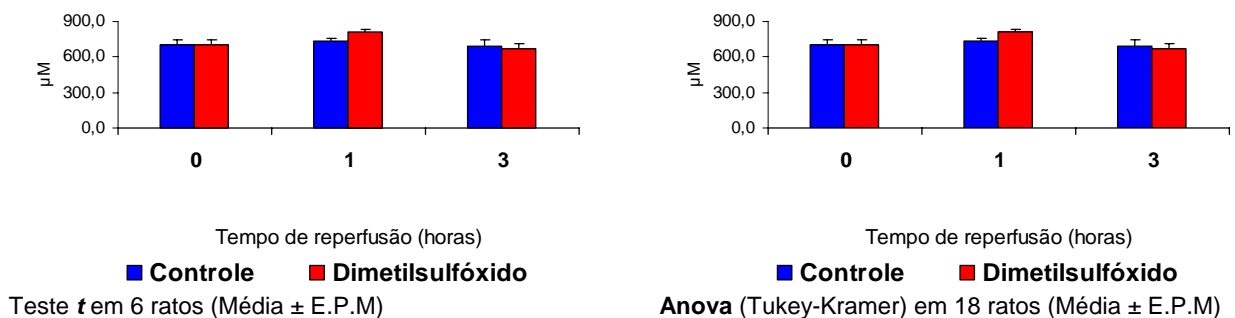
4.2.3 Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) sobre a Capacidade Antioxidante Total do plasma em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção/destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 20, Figuras 44 e 45)

Não foram encontradas diferenças significantes na Capacidade Antioxidante Total do plasma dos ratos pré-tratados com solução salina (GC), comparados aos ratos pré-tratados com dimetilsulfóxido (GD), ambos submetidos à isquemia/reperfusão, em nenhum dos tempos estudados .

TABELA 20 – Capacidade antioxidante total no plasma (μM), comparando-se os grupos Controle (GC), tratado com solução salina e DMSO (GD), tratado com dimetilsulfóxido, e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)		
		0	1	3
Solução salina + Isquemia/Reperfusão	Controle (GC)	707,1 \pm 33,8	732,2 \pm 26,2	695,5 \pm 52,4
Dimetilsulfóxido Isquemia/Reperfusão	DMSO (GD)	697,5 \pm 24,2	811,4 \pm 63,5	672,4 \pm 41,8

Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)



FIGURAS 44 e 45 - Capacidade antioxidante total no plasma (μM), comparando-se os grupos Controle (GC), tratado com solução salina e DMSO (GD), tratado com dimetilsulfóxido, e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

4.2.4 Efeito do ácido lipóico (LA) sobre a Capacidade Antioxidante Total do plasma em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção/destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 21, Figuras 46 e 47)

Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da capacidade antioxidante total do plasma dos ratos tratados com ácido lipóico (GA) após uma hora de reperfusão, comparada aos valores aferidos nos ratos tratados com solução salina, ambos submetidos à I/R. Observou-se ainda aumento significativo ($p < 0,05$) da Capacidade Antioxidante Total do plasma (CAP) dos ratos tratados com ácido lipóico (GA), após uma hora de reperfusão, seguindo-se por redução significativa ($p < 0,01$) da CAP no tempo T-3 comparado ao T-1, no mesmo grupo (GA).

TABELA 21 – Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se grupos Controle, tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), submetidos à torção/destorção do cordão espermático

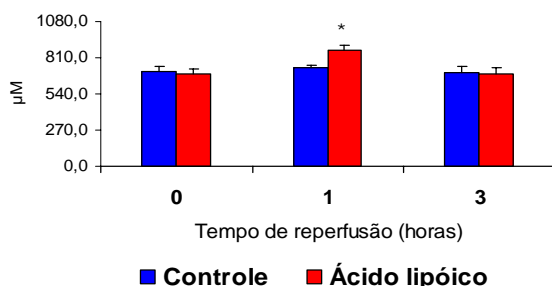
TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)		
		0	1	3
Solução salina + Isquemia/Reperusão	Controle (GC)	707,1 \pm 33,8	732,2 \pm 26,2	695,5 \pm 52,4
Ácido Lipóico + Isquemia/Reperusão	Ácido lipóico (GA)	693,6 \pm 33,5	865,4 \pm 33,5 * +	688,9 \pm 43,3 † †

Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle

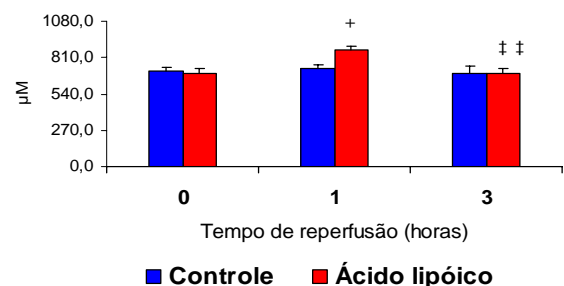
† $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

† † $p < 0,01$ comparado ao T-1 no mesmo grupo



Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 18 ratos (Média \pm E.P.M)

+ $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

† † $p < 0,01$ comparado ao T-1 no mesmo grupo

FIGURAS 46 e 47- Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se grupos Controle, tratado com solução salina e Ácido lipóico (GA), submetidos à torção/destorção do cordão espermático

4.2.5 Efeito da ternatina (TN) sobre a Capacidade Antioxidante Total do plasma em ratos submetidos ao trauma anestésico, cirúrgico e isquêmico (torção/destorção do cordão espermático), no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão (Tabela 22, Figuras 48 e 49)

Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da Capacidade Antioxidante Total do plasma dos ratos tratados com ternatina+DMSO (GT/D) após uma hora de reperfusão comparados aos ratos tratados com DMSO (GD), ambos submetidos à I/R. Observou-se ainda aumento significativo ($p < 0,05$) da CAP do plasma no G-5, após uma hora de reperfusão, seguindo-se por redução significativa ($p < 0,01$) da CAP no tempo T-3 comparado ao T-1, no mesmo grupo (G-5).

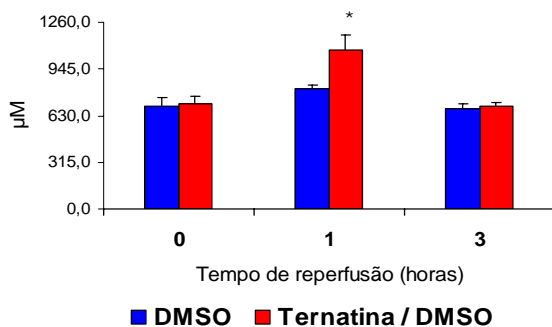
TABELA 22 – Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina+DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

TRATAMENTO	GRUPO	Tempo de reperfusão (Horas)		
		0	1	3
Dimetilsulfóxido + Isquemia/Reperfusão	DMSO (GD)	697,5 \pm 24,2	811,4 \pm 63,5	672,4 \pm 41,8
Ternatina + DMSO Isquemia/Reperfusão	Ternatina / DMSO (GT/D)	712,9 \pm 48,6	1.078,0 \pm 97,7 * +	697,5 \pm 24,2 ††

Testes: *t* e ANOVA com comparações *post hoc* (Tukey-Kramer), em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

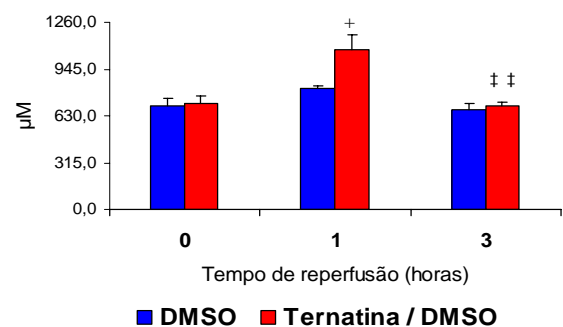
* $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle + $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

†† $p < 0,01$ comparado ao T-1 no mesmo grupo



Teste *t* em 6 ratos (Média \pm E.P.M)

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle



Anova (Tukey-Kramer) em 18 ratos (Média \pm E.P.M)

+ $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

†† $p < 0,01$ comparado ao T-1 no mesmo grupo

Testes: *t* de Student e Tukey, em 6 e 18 ratos (Média \pm E.P.M)

* $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle † $p < 0,05$ comparado ao T-0 no mesmo grupo

†† $p < 0,01$ comparado ao T-1 no mesmo grupo

FIGURAS 48 e 49 - Capacidade antioxidante total (μM) no plasma, comparando-se os grupos DMSO (GD), tratado dimetilsulfóxido e Ternatina/DMSO (GT/D), tratado com ternatina+DMSO e submetidos à torção/destorção do cordão espermático

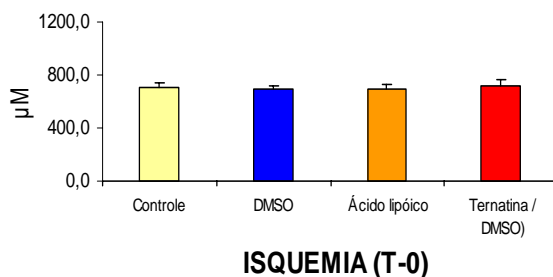
4.2.6 Efeito do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico e ternatina+DMSO sobre a Capacidade Antioxidante Total do plasma, comparando os ratos pré-tratados com antioxidantes aos ratos pré-tratados com solução salina, todos submetidos à I/R do testículo, no tempo máximo de isquemia (T-0) (Tabela 23, Figuras 50 e 51)

Não se observaram alterações significantes da Capacidade Antioxidante Total no plasma dos ratos, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (DMSO, Ácido lipóico e Ternatina) ao grupo Controle, nem nas comparações intergrupais, no tempo máximo de isquemia (T-0).

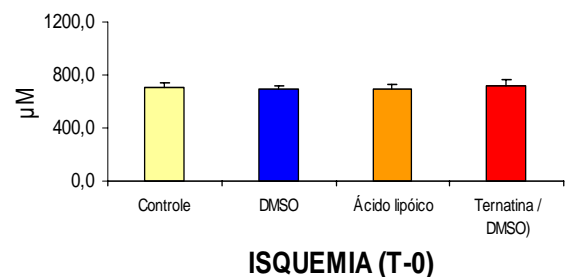
TABELA 23 – Capacidade Antioxidante Total no plasma, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)

Tratamento	Grupo (N=6)	ISQUEMIA (T-0)
Solução salina + Isquemia	Controle (GC)	707,1±33,8
Dimetilsulfóxido + Isquemia	Dimetilsulfóxido (GD)	697,5±24,2
Ácido Lipóico + Isquemia	Ácido lipóico (GA)	693,6±33,5
Ternatina + DMSO + Isquemia	Ternatina+DMSO (GT/D)	712,9±48,6

ANOVA – Testes de Dunnett e Tukey-Kramer em 24 ratos (Média ± E.P.M)



ANOVA (Dunnett) em 24 ratos (Média ± E.P.M)



Anova (Tukey-Kramer) em 24 ratos (Média ± E.P.M) (comparações intergrupais)

FIGURAS 50 e 51 - Capacidade Antioxidante Total no plasma, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, no tempo máximo de isquemia (T-0)

4.2.7 Efeito do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico e ternatina+DMSO sobre a Capacidade Antioxidante Total do plasma, comparando os ratos pré-tratados com antioxidantes aos ratos pré-tratados com solução salina, todos submetidos à I/R do testículo, no tempo máximo de isquemia (T-0) (Tabela 24, Figuras 52 e 53)

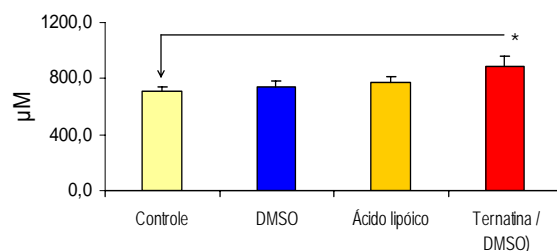
Observaram-se alterações significantes ($p < 0,05$) da Capacidade Antioxidante Total no plasma dos ratos pré-tratados com ternatina+DMSO (GT/D), comparados aos ratos do grupo Controle, durante a reperfusão (T-1 + T-3). Não foram observadas diferenças nas comparações intergrupais.

TABELA 24 – Capacidade Antioxidante Total no plasma, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, durante a reperfusão (T-1 + T-3)

Tratamento	Grupo (N=12)	REPERFUSÃO (T1+T3)
Solução salina + Isquemia/Reperusão	Controle (GC)	713,9±28,5
Dimetilsulfóxido + Isquemia/Reperusão	Dimetilsulfóxido (GD)	741,9±41,9
Ácido Lipóico + Isquemia/Reperusão	Ácido lipóico (GA)	777,2±37,3
Ternatina+DMSO + Isquemia/Reperusão	Ternatina+DMSO (GT/D)	887,5±74,7 *

ANOVA – Testes de Dunnett e Tukey-Kramer em 48 ratos (Média ± E.P.M)

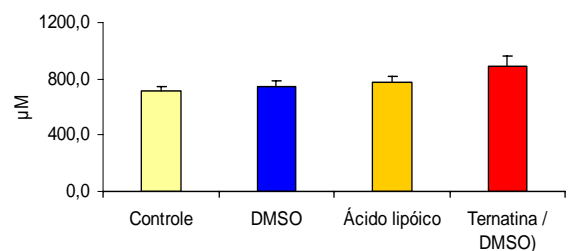
* $p < 0,05$ comparado ao grupo G-2_SS (I/R)



REPERFUSÃO (T1+T3)

ANOVA (Dunnett) em 48 ratos (Média ± E.P.M)

* $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle



REPERFUSÃO (T1+T3)

Anova (Tukey-Kramer) em 48 ratos (Média ± E.P.M)

(comparações intergrupais)

FIGURAS 52 e 53 - Capacidade Antioxidante Total no plasma, comparando-se os grupos pré-tratados com antioxidantes (GD - Dimetilsulfóxido, GA - Ácido lipóico e GT/D – Ternatina + DMSO) ao grupo GC - Controle, pré-tratado com solução salina, todos submetidos à torção do cordão espermático, durante a reperfusão (T-1 + T-3)

5 DISCUSSÃO

O rato foi o animal de experimentação escolhido para esse estudo. Trata-se de um mamífero de baixo custo de manutenção, apresenta elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico (FESTING, 1979) e já foi utilizado por grande número de pesquisadores no estudo dos efeitos da isquemia/reperfusão sobre o testículo torcido (Quadro 3, Anexo B). Optou-se por utilizar animais pubescentes (55 – 65 dias de idade) vez que na adolescência ocorre o segundo pico de incidência da torção do cordão espermático (MELEKOS; ASBACH; MARKOU, 1988; ANDERSON; WILLIAMSON, 1988). A normalidade da distribuição dos pesos dos animais utilizados no experimento foi comprovada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Apêndice B).

O éter dietílico foi o anestésico utilizado pela facilidade de uso com um mínimo de equipamento, apesar de suas conhecidas desvantagens: indução de salivagem excessiva, irritação do epitélio respiratório. Sabe-se que vários anestésicos, entre os quais citam-se o éter dietílico, o halotano e o óxido nitroso, podem desencadear a formação de radicais livres no fígado. A exposição do rato a uma mistura de óxido nitroso a 50% durante 15 minutos não alterou a função mitocondrial do rato (VAN JAARSVELD et al., 1991). Outros pesquisadores demonstraram que a anestesia com cloridrato de cetamina (30mg/Kg, i.p.) e a simples manipulação cirúrgica do testículo não induzem alterações nas concentrações de TBARS (AKGÜR; KILINC; AKTUG, 1993).

Liu et al. (1993) demonstraram que tanto o jejum pré-operatório como a anestesia por inalação de vapores do éter dietílico agravam o estresse oxidativo em ratos Wistar adultos, ressaltando que esses efeitos são independentes e aditivos. No estudo, o aumento do estresse oxidativo e a depleção da glutatona hepática e renal foram diretamente proporcionais à duração da anestesia. Por outro lado, o aumento da peroxidação lipídica foi maior nos ratos submetidos ao jejum pré-operatório em comparação aos animais alimentados até o horário do procedimento (LIU et al., 1993).

Utilizou-se, no presente estudo, a anestesia por inalação do éter dietílico em todos os animais, precedida por um jejum de 12 horas. Os procedimentos cirúrgicos

foram de curta duração (5 a 10 minutos), o que minimizou a incidência das complicações.

Optou-se, neste estudo, por utilizar a torção testicular executando duas voltas completas (720°) do cordão espermático, método que simula o quadro clínico encontrado em humanos (JANETSCHEK et al., 1987; RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988; BECKER; TURNER, 1995).

Merimsky, Rock e Katz (1982) submeteram ratos Charles River adultos à ligadura do cordão espermático para produção da isquemia testicular. Ortolano e Nasrallah (1986) utilizaram a ligadura seletiva da artéria espermática, técnica cirúrgica conhecida como manobra de Fowler-Stephens, freqüentemente usada na correção da criptorquidia humana, em ratos Sprague-Dawley adultos e pré-púberes, para a produção de uma isquemia transiente do testículo. Janetschek et al. (1987) estudaram os efeitos da torção testicular experimental em ratos e concluíram que torções superiores a 360° produzem efeitos hemodinâmicos similares aos observados em situações clínicas reais. Ryan, Gorey e Fitzpatrick (1988) realizaram estudos com diversos modelos de isquemia testicular em ratos, com ou sem fixação do testículo após a torção e concluíram que torções de 360°, independentemente do método de fixação testicular, não produziam congestão venosa ou estase vascular. Quando a rotação era aumentada para 720°, seguida da fixação testicular pela aplicação de pontos de sutura no mesórquio, as modificações circulatórias eram significativas, aproximando-se daquelas observadas na torção testicular humana. Becker e Turner (1995) estudaram as alterações endócrinas e exócrinas na torção do cordão espermático em ratos Sprague-Dawley pré-púberes, concluindo que torções de 360° não produziam alterações significativas em qualquer dos testículos, independentemente do tempo de duração da isquemia. Por outro lado, quando a torção do cordão espermático era de 720°, as lesões do testículo torcido eram significativas, tanto maiores quanto maior fosse a duração da isquemia. Palmer, Plzak e Cromie (1997) realizaram um estudo comparativo das alterações histológicas induzidas por torção (720°, duas voltas completas) ou pinçamento do cordão espermático. Os pesquisadores concluíram que a isquemia obtida pelo pinçamento do cordão espermático produzia, no rato, uma isquemia mais importante que aquela obtida com a torção testicular de 720°. Dokucu et al. (2000) utilizaram a torção testicular de 720°, em ratos Sprague-Dawley pré-púberes, para estudar os efeitos do óxido

nítrico sobre a histologia do testículo contralateral. O mesmo modelo foi utilizado por Guimarães e Vasconcelos (2002) para estudar as alterações agudas do metabolismo oxidativo no testículo isquêmico de ratos Wistar pré-púberes.

Há controvérsias com relação ao tempo ideal de isquemia experimental para o estudo do estresse oxidativo no testículo do rato. Ralitchkova et al, (1990) submeteram 32 ratos Wistar adultos à torção do cordão espermático (TCE) de 360° e concluíram que após 4 horas de isquemia as alterações testiculares são irreversíveis. Turner (1985) submeteu ratos Sprague-Dawley à TCE unilateral com duração de uma, duas e quatro horas e examinou os testículos aos 7, 30 e 60 dias após a destorção. Graves alterações histopatológicas foram observadas, no testículo torcido, após 2 horas de isquemia. Nos animais submetidos a 4 horas de isquemia não houve retorno da perfusão no testículo torcido. Greenstein et al. (1992) estudaram o efeito do pré-tratamento com polietileno glicol-superóxido dismutase (PEG-SOD) em ratos submetidos à isquemia por torção de 720° do cordão espermático (três horas) e não observaram diferenças significantes entre os grupos controle e tratamento. Esses resultados foram semelhantes aos apresentados por Bergh, Damber e Marklund (1988), que estudaram os efeitos de das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) na isquemia (60 e 100 minutos) testicular.

Akgür et al. (1994a) estudaram os efeitos da torção do cordão espermático em ratos submetidos à isquemia de duração variável e crescente (3, 6, 12 e 24 horas), comprovando aumentos significantes (179%, 231%, 342% e 286%, respectivamente) dos níveis de TBARS ao término do período de isquemia. Nos ratos submetidos a 6, 12 e 24 horas de isquemia e 2 horas de reperfusão não houve aumento dos níveis de TBARS, demonstrando a intensidade da lesão isquêmica, de tal monta que inviabilizou os efeitos da lesão de reperfusão. Esses achados haviam sido previamente demonstrados por Turner e Brown (1993). Afirmam esses pesquisadores que períodos de isquemia superiores a três horas na torção testicular experimental (720°) excedem o período máximo necessário para a produção de lesões testiculares, tornando impossível a separação dos efeitos da isquemia das lesões produzidas na reperfusão.

Akgür et al. (1994b) estudaram os efeitos antioxidantes do alopurinol, em ratos submetidos à isquemia testicular durante 1, 3 e 5 horas seguida de reperfusão

por 2 horas. Nos ratos submetidos à isquemia de 3 horas de duração observou-se um aumento significativo (283%) da peroxidação lipídica em relação ao grupo controle. Nos ratos submetidos à isquemia de 3 horas de duração e reperfusão de 2 horas também ocorreu aumento significativo (399%) da peroxidação lipídica, confirmando o efeito aditivo da lesão de reperfusão, resultando em maiores lesões celulares, traduzidas pelo aumento da concentração de TBARS.

Turan, Küçükaydin e Bekereciöglül (1996) estudaram os níveis de peroxidação lipídica na TCE em ratos Sprague-Dawley adultos submetidos a 3 horas de isquemia e 6 horas de reperfusão. Como não foram detectadas diferenças significantes entre o grupo *Sham* e o grupo isquêmico os autores concluíram que a lipoperoxidação não é um fenômeno importante no testículo após três horas de isquemia, pelo menos após 6 horas da destorção testicular.

Uguralp, Mizrak e Karabulut (2005) estudaram os efeitos do resveratrol na torção de 720° do cordão espermático com isquemia prolongada (4 horas), aferindo os níveis de MDA e GSH e comprovaram os efeitos protetores do flavonóide.

O Quadro 4 apresenta, de forma resumida, o tempo de isquemia e o tipo de antioxidante utilizado por diferentes pesquisadores, nos últimos 17 anos (1988 - 2005) (Anexo C).

O rato, diferentemente dos humanos, apresenta uma livre comunicação entre a cavidade peritoneal e o interior do escroto, sendo este último revestido pelo prolongamento do peritônio parietal. Nesse ambiente, o testículo e o epidídimo estão literalmente dependurados em um mesentério do peritônio visceral conhecido como mesórquio, de modo semelhante ao mesentério intestinal dos seres humanos. O bordo inferior do mesórquio é denominado ligamento mesorquial e é nele que são colocados os pontos de fixação do testículo (RYAN; GOREY; FITZPATRICK, 1988).

Ryan, Gorey e Fitzpatrick (1988) realizaram estudos com diversos modelos de isquemia testicular, com ou sem fixação do testículo após a torção e concluíram que torções de 720°, seguidas da fixação testicular pela aplicação de pontos de sutura no mesórquio produziam alterações circulatórias significativas, aproximando-se daquelas observadas na torção testicular humana. A fixação transparenquimal do testículo produz alterações semelhantes, mas a passagem da agulha de sutura pelo parênquima, ao propiciar a ruptura de túbulos seminíferos, determina o aparecimento de lesões adicionais, que podem invalidar os resultados da pesquisa, Rodriguez e Kaplan (1988) realizaram experimentos, usando ratos Sprague-Dawley,

na tentativa de encontrar um método ideal de fixação testicular; foram usados a eversão da túnica vaginal, a fixação do testículo com fios (absorvíveis ou inabsorvíveis) talco ou tetraciclina, para a produção de reação inflamatória. Nenhum dos métodos estudados provou ser adequado para a realização do experimento. Dixon et al., (1993) estudaram os efeitos da fixação transparenquimal do testículo, em ratos Sprague-Dawley pré-púberes utilizando diferentes fios de sutura e encontraram uma reação inflamatória em todos os casos.

A opção pela técnica de fixação do testículo torcido ao mesóquio levou em consideração o trabalho de Ryan, Gorey e Fitzpatrick (1988) e a utilização prévia da mesma técnica de fixação testicular em estudo anterior (GUIMARÃES, 2002).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto químico dotado de marcante capacidade solvente e pode atravessar rapidamente as membranas biológicas. Estas características o tornam o solvente de escolha, nos estudos experimentais, para a administração de drogas hidrofóbicas (VARMA et al., 1987). Concentrações variáveis (2% a 3%) foram utilizadas por Souza (1993), Rao et al. (1997), Souza et al. (1999) e Rao et al. (2003). A partir de 1997 esses pesquisadores utilizaram, como padrão, a diluição da ternatina em solução contendo 3% de DMSO.

Romeo et al. (2004) utilizaram o DMSO como veículo para a administração intraperitoneal de raxofelast, um análogo hidrofílico da vitamina E, na torção testicular experimental (torção 720° - 3 horas). A dosagem utilizada foi de 1,0 mL/Kg de uma solução contendo DMSO/NaCl 0,9% 1:9 v/v. A diluição utilizada resultou em uma menor concentração de DMSO que a preconizada para diluição da ternatina, por diversos pesquisadores (SOUZA; RAO; SILVEIRA, 1997; RAO et al., 1997; SOUZA; RAO; SILVEIRA, 1998; SOUZA; TOME; RAO, 1999; RAO et al., 2003).

Não há um consenso quanto ao volume, diluições e quantidade total de DMSO utilizados em animais experimentais. Carpenter, Angel e Morgan (1994) utilizaram doses de 1,5 mg/Kg i.p. em ratos adultos, administrado 24 horas antes do isolamento de retalhos retalhos cutâneos. De La Torre et al. (1998) utilizaram doses maiores de DMSO (250 mg/Kg diariamente, durante 7 dias, via i.p.) em ratos adultos submetidos à isquemia carotídea bilateral. No presente estudo, a opção pela utilização do DMSO a 3% fundamentou-se nos trabalhos de RAO et al. (2003), considerando ainda que a diluição da ternatina em soluções contendo baixas concentrações de dimetilsulfóxido é de difícil execução.

O ácido α -lipóico (LA), mercê de suas características especiais, que o tornam solúvel tanto em meios lipídicos como em meios aquosos, pode ser dissolvido em várias substâncias para a aplicação parenteral. Panigrahi et al. (1996) utilizaram uma solução de bicarbonato de sódio (7,5%, p:v) como veículo, para administração endovenosa do ácido α -lipóico num estudo destinado a verificar os efeitos protetores do LA no tecido cerebral isquêmico e reperfundido. Gurer et al. (1999) utilizaram uma solução de etanol:salina (1:1) como veículo, administrado por via i.p., para estudar os efeitos do LA sobre hemácias expostas ao chumbo. Posteriormente, Sivaprasad, Nagaraj e Varalakshmi (2002) estudaram os efeitos do LA na peroxidação lipídica do rim, induzida por intoxicação plúmbica, utilizando solução salina como veículo para a administração do LA por via intraperitoneal. Mitsui et al. (1999) também utilizaram a solução salina como veículo para a administração intraperitoneal do LA, ao estudarem os efeitos neuroprotetores do LA em nervos periféricos submetidos à isquemia/reperfusão. Justifica-se, diante do exposto, a opção pela utilização da solução salina a 0,9% como veículo para a administração intraperitoneal do ácido α -lipóico.

Resumindo, o delineamento experimental levou em consideração os seguintes fatores:

O tempo de isquemia do testículo, para o estudo da lesão de isquemia/reperfusão, segundo os vários pesquisadores citados, varia de duas a seis horas (Anexo C). O tempo de isquemia, estabelecido em 3 horas, foi estipulado mediante o sucesso de alguns estudos apresentados (TURNER, 1985; RALITCHKOVA et al,1990; TURNER; BROWN, 1993; AKGÜR et al.,1994a; ABES et al., 2001; ROMEO et al., 2004; OZKAN et al., 2004);

O tempo de reperfusão de 6 horas (coletas 0, 1, 3 e 6 horas após a destorção do testículo) usou como parâmetro o estudo de Walsh et al. (1990) onde ficou demonstrado que a peroxidação lipídica se inicia alguns minutos após o início da reperfusão e se prolonga por 12 horas.

A fixação do testículo baseou-se no modelo atraumático proposto por Ryan, Gorey e Fitzpatrick, 1988.

A utilização do dimetilsulfóxido como diluente da ternatina, usando uma solução a 3%, concentração considerada elevada mas necessária para a perfeita diluição do flavonóide e, considerando os inúmeros trabalhos onde ficou claramente demonstrada a ação antioxidante desse diluente, motivou o estudo dos possíveis

efeitos do DMSO, como antioxidante isolado, no testículo submetido à isquemia por torção do cordão espermático.

A utilização do ácido α -lipóico, um antioxidante universal e com reconhecida ação sobre o metabolismo da glutatona foi estimulada pela necessidade de maior abrangência do estudo do estresse oxidativo no testículo.

A utilização da ternatina, flavonóide com reconhecida ação protetora no fígado de animais expostos a substâncias hepatotóxicas (RAO et al., 2003), foi motivada pelo desejo de verificar sua eficácia na lesão isquêmica do testículo.

Para a validação do modelo de isquemia foram realizados estudos estatísticos comparando-se os ratos do grupo Controle (GC) com os ratos do grupo Simulado (GS), ambos tratados com solução salina, aferindo-se as concentrações de MDA e GSH no homogenato de testículo e a Capacidade Antioxidante Total no plasma desses animais. Para verificar a ocorrência da lesão de reperfusão, foram comparados os valores aferidos no período máximo de isquemia (T-0) e durante a reperfusão.

O teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA) foi introduzido por Kohn e Liversedge em 1944 e ainda é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica (CHIRICO, 1994). O malonaldeído (MDA), também conhecido como aldeído malônico ($C_3H_4O_2$) é um aldeído de cadeia curta, resultante da decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (BONNES; GUÉRIN, 1992). Trabalhos científicos utilizando a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na avaliação dos índices de peroxidação lipídica, em modelos experimentais de torção do cordão espermático, estão disponíveis na literatura médica (AKGÜR et al., 1994; OZKAN et al., 2004).

No presente estudo, após três horas de isquemia, a concentração de TBARS no grupo Controle (GC) foi de $27,48 \pm 3,73$ μ mol MDA/g. Esse resultado, comparado ao obtido no grupo grupo Simulado (GS) ($14,29$ μ mol MDA/g) em amostra colhida após a segunda operação simulada, demonstrou aumento significativo (92,3%) da peroxidação lipídica do testículo submetido à isquemia. O mesmo resultado foi observado nos tempos T-1, T-3 e T-6, comparando-se GC vs. GS (Tabela 1, Figuras 12 e 13). Embora não fossem detectadas diferenças significantes nas concentrações de MDA entre tempos T-0 e T-1, no grupo Simulado (*Sham*) (Tabela 1, Figuras 12 e 13), ficou evidente o aumento significativo da peroxidação lipídica ao

se comparar os valores de MDA aferidos ao término do período de trauma anestésico e cirúrgico (duas operações *Sham*) com as concentrações de MDA aferidas no período pós-trauma ($14,29 \pm 2,20$ versus $21,05 \pm 0,92$, $p < 0,01$) (Tabela 2, Figura 14). Esses resultados se assemelham ao apresentados por Akgür et al. (1994a), Saba et al. (1997) e Wilhelm Filho et al. (2004). Aparentemente, a simples manipulação do testículo, durante as duas operações simuladas, pode produzir um trauma suficiente para desencadear a produção de radicais livres em concentração suficiente para a iniciação da peroxidação lipídica.

Akgür, Kilinc e Aktüg (1993) demonstraram que a lesão provocada pela torção do cordão espermático representava uma somatória das ações deletérias da isquemia agravada pela lesão de reperfusão. O aumento da peroxidação lipídica após uma hora de reperfusão, comparado ao tempo de isquemia máxima ($40,30 \pm 2,15$ versus $27,48 \pm 3,73$, $p < 0,05$) no testículo submetido à torção por três horas (GC), nos ratos tratados com solução salina (Tabela 1, Figuras 12 e 13), confirma o agravamento da lesão isquêmica pela reperfusão do órgão. O mesmo fenômeno não ocorreu após três e seis horas de reperfusão, onde os valores aferidos não foram diferentes de T-0. No estudo comparativo do tempo de isquemia máxima (T-0) com o período de reperfusão (T-1+T-3+T-6), no grupo GC, verifica-se que houve um aumento de 27,4% nas concentrações de MDA durante a reperfusão ($27,48 \pm 3,73$ versus $35,01 \pm 1,70$, $p < 0,05$) confirmando o agravamento da lesão celular iniciada durante o período isquêmico (Tabela 3, Figura 15).

A capacidade antioxidante dos tecidos e órgãos não é uniforme. Modelos experimentais, utilizando ratos, comprovaram que o fígado é o órgão dotado de maior capacidade antioxidante, seguido pelo sangue, coração e músculo (DI MEO; VENDITT; DE LEO, 1996). No fígado submetido à isquemia, os efeitos da reperfusão se iniciam alguns minutos após o retorno da perfusão e perduram por doze horas (WALSH et al., 1990). Esse fato sugere que o fenômeno de reperfusão ocorre de maneira diferente, na dependência do órgão ou tecido envolvido no processo. Segundo Akgür et al. (1994a) o testículo comporta-se de modo semelhante ao intestino, víscera capaz de evitar a lesão de reperfusão, após curtos períodos de isquemia parcial.

Outro parâmetro utilizado na validação do modelo foi o estudo das concentrações de GSH no testículo submetido à operação simulada (GS) e à isquemia/reperfusão (GC). Nos traumas cirúrgicos, principalmente quando

associados a hipóxia, podem ser detectadas reduções das concentrações teciduais de glutathione (LUO et al., 1998). No presente estudo (Tabela 9, Figuras 26 e 27) observou-se uma redução significativa dos níveis de GSH ($15,40 \pm 3,87$ versus $60,80 \pm 8,09$, $p < 0,01$) nos ratos submetidos à isquemia/reperfusão e tratados com solução salina (GC), em relação aos animais do grupo *Sham* (GS), no tempo máximo de isquemia e durante a reperfusão, *pari passu* com o aumento dos níveis de malonaldeído (Tabela 1, Figuras 12 e 13). Comparando-se os valores aferidos no ao término da segunda operação simulada (trauma) à média dos valores aferidos no período pós-trauma (T-1 + T-3 + T-6), verifica-se aumento das concentrações de glutathione, mostrando a reação do sistema glutathione frente ao trauma cirúrgico e anestésico (Tabela 10, Figura 28). No trauma isquêmico (Tabela 11, Figura 29), os valores permaneceram inalterados, talvez pelo grau de lesão tissular decorrente de uma isquemia prolongada (3 horas).

Os sistemas antioxidantes dos organismos vivos dependem da atividade de enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase), macromoléculas (albumina, ceruloplasmina, ferritina) e pequenas moléculas (ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutathione reduzida, ácido úrico, bilirrubina) para o pleno exercício de sua atividade protetora. A capacidade antioxidante total dos líquidos extracelulares representa a somatória da ação dos antioxidantes endógenos e de antioxidantes exógenos, provenientes da alimentação ou de oferta de drogas antioxidantes. A ação cooperativa dos diferentes antioxidantes oferece maior proteção que a ação isolada de cada uma deles. Conseqüentemente, a capacidade antioxidante total, ao considerar a ação conjunta de todos os antioxidantes do organismo vivo, oferece uma informação biológica de maior relevância que a aferição das ações isoladas de cada componente (PRIOR; CAO, 1999; GHISELLI et al., 2000).

Estão disponíveis vários procedimentos para avaliação do conteúdo total de antioxidantes em misturas complexas, tais como os fluidos biológicos. O FRAP, “ferric reducing ability of plasma”, é um método muito utilizado para a determinação da capacidade antioxidante do plasma e mede a capacidade que o plasma apresenta para reduzir os íons Fe^{+++} em Fe^{++} em uma reação redox acoplada a um método colorimétrico (BENZIE; STRAIN, 1996). Wayner et al. (1985) desenvolveram um teste para aferição da capacidade antioxidante do plasma e introduziram o acrônimo TRAP (“Total Radical-trapping Antioxidant Parameter”) para defini-lo. O

teste se baseia na medição do consumo de oxigênio durante uma reação controlada de peroxidação lipídica induzida pela decomposição térmica do 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) diidrocloreto (ABAP). O teste "Total Antioxidant Power" foi desenvolvido pelo laboratório Oxford Biomedical Research e se baseia na detecção dos níveis de antioxidantes totais em líquidos biológicos (plasma proveniente de sangue heparinizado, soro e outros) através da avaliação da interação entre o Cu^+ , derivado do Cu^{++} , e a ação combinada dos antioxidantes presentes na amostra. O Cu^+ produzido é detectado após a formação de um complexo resultante da reação do Cu^+ com a batocuproina.

A ausência de diferenças significantes da Capacidade Antioxidante Total no plasma (CAP) nos animais submetidos ao trauma anestésico e cirúrgico, comparados aos animais expostos aos efeitos da lesão de isquemia/reperfusão, acrescidos do trauma imposto pela anestesia e pelo procedimento cirúrgico, permite inferir que a torção do cordão espermático não induziu, no modelo estudado, repercussões sistêmicas detectáveis (Tabela 17, Figuras 40 e 41; Tabela 18, Figura 42 e Tabela 19, Figura 43). Esse achado não é surpreendente, considerando-se que os animais utilizados no estudo eram jovens e o tamanho do testículo raramente excedia 1,5 cm no seu eixo longitudinal (Figura 4). O "kit" laboratorial TA-1, utilizado na avaliação da CAP, é dotado de grande sensibilidade e permite analisar o poder antioxidante de seis diferentes substâncias presentes no plasma (bilirrubina, albumina, vitamina E, ácido ascórbico, ácido úrico e glutatona). Assim a ausência de diferenças significantes entre esses dois grupos (GC e GS) pode representar, na realidade, a ausência de repercussões sistêmicas da lesão testicular e não uma possível limitação do método empregado na análise da CAP desses animais.

A resposta bioquímica e vascular, nos seres vivos submetidos aos efeitos deletérios da isquemia tem uma relação causa/efeito relacionado à presença de substâncias que atuam sobre o mecanismo de irrigação dos tecidos, incrementando ou reduzindo o fluxo sanguíneo na região comprometida. Um exemplo dessa ação pode ser identificado na atividade das plaquetas, onde o aumento ou diminuição do grau de obstrução vascular pode ser decorrente da adesão ao tecido lesado ou pela agregação plaquetária. Através de outro mecanismo, as plaquetas podem liberar substâncias vasoativas que promovem vasoconstrição e espasmos vasculares (JACOB; HERSCHLER, 1986). As plaquetas abrigam essas substâncias vasoativas nos grânulos alfa (fibrinogênio) e nos corpúsculos densos (ATP, ADP, serotonina e

cálcio) e as secretam na corrente sanguínea através do seu sistema canalicular. Todas as substâncias mencionadas, à exceção do ATP, podem induzir uma redução significativa do fluxo sanguíneo por atividade física ou reatividade química sobre a vasculatura dos tecidos lesados (BALDINI; MYERS, 1980). O DMSO pode bloquear a ação de muitas dessas substâncias liberadas pelas plaquetas como ocorre na inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP e pela trombina, *in vitro* (SCHIFFER et al., 1976). Outro exemplo da ação protetora do DMSO na isquemia é seu efeito antagônico na liberação de cálcio pelas células e plaquetas, reduzindo o espasmo arterial (CLARK et al., 1978; RUIGROK et al., 1981). Além disso, o DMSO é capaz de melhorar a fosforilação oxidativa na própria mitocôndria; essa ação se deve à diminuição da atividade da ATPase nas partículas submitocondriais, com redução da utilização de O₂ durante a isquemia celular (GHOSH et al., 1976). O DMSO, utilizado neste estudo como diluente da ternatina é, comprovadamente, um potente antioxidante, atuando como seqüestrador de radicais livres (ITOH e GUTH, 1985; SALIM, 1992). Dotado de inúmeras propriedades, merece destaque a proteção contra a lesão isquêmica.

No presente estudo, os ratos receberam três aplicações intraperitoneais (i.p.) de DMSO a 3%, num intervalo de 24 horas (33 mg/Kg/dose). Assim, cada rato recebeu entre 4,95 e 6,6 mg de DMSO i.p. A opção pela diluição a 3% teve como parâmetro a concentração do diluente (DMSO) utilizado como veículo para a aplicação intraperitoneal da ternatina. O curto período de aplicação da droga não induziu, aparentemente, alterações comportamentais detectáveis pela inspeção dos animais antes de cada aplicação intraperitoneal, na fase de pré-tratamento nem no período máximo de reperfusão (6 horas).

A quantificação do malonaldeído tecidual nos ratos pré-tratados com DMSO, mostrou que esta substância pode atenuar, de modo significativo, os efeitos da isquemia sobre o testículo submetido à torção do cordão espermático. Houve redução significativa ($p < 0,001$) da concentração de TBARS em todos os tempos estudados, comparando-se os animais pré-tratados com DMSO aos ratos recipientes de solução salina, no mesmo intervalo de tempo e em igual volume, denotando a ação protetora do antioxidante, com redução da intensidade da peroxidação dos componentes lipídicos da membrana (Tabela 4, Figuras 16 e 17). No tempo de isquemia máxima a redução das concentrações de MDA foi de 71% ($27,46 \pm 3,73$ versus $7,95 \pm 0,37$ – $p < 0,001$) e na primeira hora de reperfusão esta redução correspondeu a

74% ($40,30 \pm 2,15$ versus $10,17 \pm 1,93$ – $p < 0,001$) Os efeitos protetores do DMSO persistiram até o tempo máximo de reperfusão (T-6) (Tabela 4, Figuras 16 e 17). Observa-se assim que o DMSO a 3% (10ml/Kg) é capaz de reduzir os efeitos da isquemia/reperfusão no testículo submetido à torção do cordão espermático por três horas, durante a isquemia e na reperfusão. Koksai et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes, utilizando doses maiores, no músculo estriado (membro pélvico) do rato. A isquemia foi produzida por pinçamento vascular, mantida por 4 horas e seguida por um breve período de reperfusão (1 hora). A administração trans-operatória de DMSO (15 mg/kg/h, i.v.) induziu uma redução significativa ($p < 0,05$) da peroxidação lipídica.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Abes et al. (2001), que submeteram ratos adultos à torção / destorção do cordão espermático. Os valores de tiobarbiturato ácido-reativo (TBARS) estavam muito reduzidos (50%) nos testículos de animais que haviam recebido $100 \mu\text{mol/kg}$ de ATP-MgCl₂ antes e depois da destorção, demonstrando o efeito protetor da substância. Ozkan et al. (2004) pesquisaram os efeitos do aspartato de zinco na torção testicular experimental. Os autores demonstraram a ação protetora da substância, quando administrada antes da destorção, reduzindo a peroxidação lipídica do testículo em ratos Sprague-Dawley pré-púberes submetidos à isquemia testicular (4 h), por torção do cordão espermático (720°).

As células respondem ao estresse oxidativo com o aumento seu conteúdo em glutathiona, como parte da resposta adaptativa à lesão oxidativa. Estudos recentes comprovaram a ação inibitória do DMSO, impedindo o aumento dos níveis de glutathiona em resposta ao estresse oxidativo, *in vitro*, quando utilizando em altas doses (KUROZUMI; TAKAHASHI; KOJIMA, 2005). No presente estudo, utilizaram-se pequenas doses de DMSO, como já foi explicado anteriormente. Além disso, as aferições das concentrações de GSH foram efetuadas *in vivo*. O aumento dos níveis de glutathiona, nos ratos submetidos à isquemia/reperfusão e pré-tratados com DMSO (GD), em relação aos níveis aferidos no tempo máximo de isquemia e durante a reperfusão, nos ratos recipientes de solução salina comprova o efeito protetor do DMSO, nas condições do presente experimento (Tabela 12, Figuras 30 e 31). Aparentemente, o aumento da glutathiona tecidual não se refletiu no plasma dos animais submetidos ao estudo, pré-tratados com dimetilsulfóxido, fato confirmado

pela leitura dos níveis da capacidade antioxidante do plasma, obtendo-se valores não diferentes dos obtidos nos animais pré-tratados com solução salina (Tabela 20, Figuras 44 e 45). Estes resultados poderiam sugerir que as repercussões da isquemia/reperfusão do testículo, sobre os níveis de glutathione, se manifestaram com maior intensidade no tecido isquêmico.

Para avaliar-se os possíveis efeitos benéficos do ácido lipóico (LA) na prevenção ou redução da peroxidação lipídica do testículo submetido à isquemia, utilizou-se uma solução aquosa (1,0 mg/ml) de ácido α -lipóico diluído em soro fisiológico.

No presente estudo o LA mostrou-se eficaz na redução dos índices de peroxidação lipídica do testículo submetido à isquemia/reperfusão, em todos os tempos estudados (T-0, T-1, T-3 e T-6) (Tabela 5, Figuras 18 e 19), mesmo sendo administrado em doses menores que as utilizadas por outros pesquisadores (SUMATHI; JAYANTH; VARALAKSHMI, 1993; PANIGRAHI et al., 1996; CHILDLLOW et al., 2002; OBROSOVA et al. 2003; SIVAPRASAD; NAGARAJ; VARALAKSHMI, 2004).

O cádmio é um metal pesado capaz de induzir a peroxidação das membranas lipídicas celulares nas células expostas à sua ação tóxica. Sumathi, Jayanth e Varalakshmi (1993) obtiveram efeitos positivos na prevenção da peroxidação lipídica no fígado e rim em animais expostos ao cádmio e tratados com ácido α -lipóico (15 e 30mg/Kg) i.p., 30 minutos após a exposição ao tóxico. Os pesquisadores concluíram que o efeito protetor é dose-dependente e que a dose satisfatória era 30 mg/Kg, onde o efeito protetor foi mais eficiente.

Panigrahi et al. (1996) submeteram ratos Wistar à isquemia cerebral induzida por oclusão carotídea bilateral por 30 minutos, associada à hipotensão sistêmica, com uma mortalidade de 78% durante 24 h de reperfusão. O pré-tratamento com ácido α -lipóico 25mg/Kg diluído em 1,0 ml de bicarbonato de sódio a 7,5% resultou na sobrevivência de 74% dos animais, demonstrando a eficiência do LA na proteção cerebral, reduzindo os efeitos da isquemia-reperfusão.

Sivaprasad, Nagaraj e Varalakshmi (2002) estudaram os efeitos do LA isoladamente ou combinado com o ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico, sobre a peroxidação renal em ratos intoxicados com chumbo e observaram efeitos protetores quando o LA foi usado isoladamente (25 mg/Kg/dia, durante 7 dias) ou combinado

com o quelante. Posteriormente, utilizando a mesma dosagem de LA, o mesmo efeito foi encontrado no fígado de ratos intoxicados por chumbo.

Childlow et al. (2002) estudaram os efeitos da administração de LA (100 mg/kg/dia, i.p., durante 11 dias) a ratos submetidos à isquemia retiniana induzida por elevação da pressão intraocular e concluíram que o LA é capaz de proteger a retina dos efeitos nocivos da isquemia-reperfusão, através de sua atividade sequestradora de radicais livres.

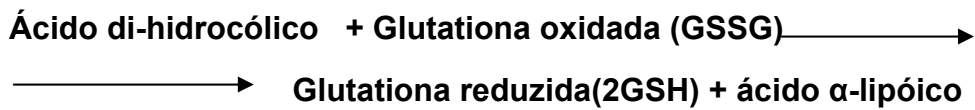
Obrosova et al. (2003) demonstraram a ação antioxidante do ácido α -lipóico sobre o estresse oxidativo precoce do rim de ratos Wistar diabéticos. No experimento, os ratos receberam 100 mg/Kg/dia, i.p., durante três semanas antes da indução do diabetes experimental.

A adriamicina, um potente agente citotóxico e antineoplásico, exerce pronunciada ação tóxica sobre o testículo. Ratos Wistar adultos tratados com doses diárias de adriamicina (1 mg/Kg, i.v., 10 dias) apresentaram uma redução significativa da peroxidação lipídica do testículo quando tratados com uma única dose de ácido α -lipóico (35 mg/Kg peso i.p.) administrada um dia antes do início do tratamento com adriamicina (Prahalathan; Selvakumar; Varalakshmi, 2004).

Estudos comprovaram a atividade citoprotetora da ação conjunta da glutatona oxidada e do ácido α -lipóico reduzido, impedindo a peroxidação lipídica da membrana celular (BAST; HAENNEN, 1989; BASTIAANS; HAENNEN; BAST, 1990). No presente estudo, as concentrações de GSH foram significantes maiores ($p < 0,001$) em ratos pré-tratados com LA, comparados aos ratos pré-tratados com solução salina, no tempo máximo de isquemia e durante a reperfusão (Tabela 13, Figuras 32 e 33). A ação do LA aumentou, em mais de quatro vezes, as concentrações de MDA tecidual, no tempo máximo de isquemia ($15,40 \pm 3,87$ versus $72,65 \pm 3,25$). Esses valores não foram diferentes durante a reperfusão, sugerindo uma ação protetora continuada do antioxidante.

Sabe-se que o ácido α -lipóico é um poderoso regenerador da glutatona e pode produzir um aumento expressivo nos níveis intracelulares do tripeptídeo após sua administração (BUSSE et al., 1992; HAN; TRITSCHLER; PACKER, 1995; BIEWENGA; HAENEN; BAST, 1997). O efeito antioxidante do LA, traduzido pelo aumento da concentração de GSH ao final da isquemia e durante a reperfusão, em comparação aos valores aferidos no grupo Controle (GC) pode ser devido à

regeneração do GSH, após sua redução a ácido di-hidrolipóico (DHLA). Este último participa ativamente do mecanismo de regeneração do GSH (BIEWENGA; HAENEN; BAST, 1997). Outros pesquisadores verificaram que a redução do ácido α -lipóico a ácido di-hidrolipóico ocorre também nos eritrócitos na presença de glicose mas não de desoxi-glicose, o que sugere um processo dependente de NADPH e importante para a proteção, na corrente sangüínea, contra o estresse oxidativo (CONSTANTINESCU et al., 1995). A reação química do processo é a que se segue:



A ação do LA sobre o metabolismo energético é conhecida. Está comprovado que o LA aumenta a capacidade do sistema de transporte de glicose, estimulado por insulina, além do aumento da atividade das vias oxidativas e não oxidativas do metabolismo da glicose, em músculo esquelético de ratos resistentes ao hormônio (JACOB et al., 1996).

Os resultados obtidos nesta etapa do estudo (Tabela 13, Figuras 32 e 33) são compatíveis com os apresentados por Sumathi et al. (1993). Esses pesquisadores estudaram os efeitos do LA em ratos hiperoxalúricos, que apresentam um alto índice de peroxidação lipídica, associada a uma diminuição acentuada dos níveis de glutathiona. A administração de LA induziu redução significativa dos níveis de peroxidação lipídica com aumento dos níveis de glutathiona hepática (SUMATHI et al., 1993). O efeito protetor do LA também ocorreu em ratos expostos á ação da butionina sulfoximina, uma substância hepatotóxica capaz de causar depleção da glutathiona hepática (SUMATHI; BASKARAN; VARALAKSHMI, 1996).

A análise dos resultados obtidos na determinação da capacidade antioxidante total do plasma (CAP) mostrou o efeito protetor do antioxidante (Tabela 21, Figuras 46 e 47), traduzido pelo aumento da CAP ($865,4 \pm 33,5$ versus $732,2 \pm 26,2$ – $p < 0,05$) nos ratos dos ratos pré-tratados com LA (GA), uma hora após a destorção do cordão espermático, em relação aos ratos pré-tratados com solução salina (GC). A ação protetora do LA somente ocorreu após uma hora de reperfusão (T-1), com retorno aos níveis iniciais após 3 h de reperfusão. Após o restabelecimento da oferta de sangue oxigenado ao testículo (destorção) observou-se um aumento da CAP nos

ratos pré-tratados com LA, comparando-se T-1 a T-0 ($865,4 \pm 33,5$ versus $693,6 \pm 33,5$ – $p < 0,05$) e, em seguida, uma redução da CAP no tempo T-3 ($688,9 \pm 43,3$ versus $865,4 \pm 33,5$ – $p < 0,01$), sugerindo um possível consumo do LA disponível para a restauração da glutatona (Tabela 21, Figuras 46 e 47).

Os flavonóides constituem um grupo de produtos naturais polifenólicos de baixo peso molecular, são largamente distribuídos no reino vegetal e apresentam alta reatividade que se manifesta na afinidade pelos polímeros biológicos e íons de metais pesados, atividade catalítica e capacidade em dinamizar o transporte de elétrons e seqüestrar radicais livres (HARTMAN; SHANKEL, 1990; ARORA; NAIR; STRASBURG, 1998a, 1998b).

Estudos demonstrando as propriedades antioxidantes dos diversos flavonóides, (rutina, quercitina, catequina, miricetina, morina e ternatina) têm se multiplicado na literatura médica, comprovando o efeito protetor dessas substâncias em diferentes modelos de peroxidação lipídica (COTELLE et al., 1992; SOUZA; TOME; RAO, 1999; NIJVELDT et al., 2001; BARTOSIKOVA et al., 2003; KAHRAMAN et al., 2003 ; SINGH; CHANDER; CHOPRA, 2005). Dentre as múltiplas propriedades dos flavonóides destaca-se a sua excepcional ação protetora contra o estresse oxidativo resultante de sua ação seqüestradora de espécies reativas de oxigênio, tais como o radical hidroxila (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994) e o anion superóxido (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988). Determinante essencial para a inibição da liberação de anions superóxido parece ser um grupamento hidroxila (OH) presente no anel (B) da molécula dos flavonóides. Os flavonóides bloqueiam a ação da enzima NADPH-oxidase, localizada na membrana plasmática, responsável pela formação de anions superóxido (TAUBER et al., 1984). Ao se examinar a estrutura da ternatina (Figura 6), constata-se que há um grupamento OH na posição 4' do anel B o que explicaria seu potencial anti-peroxidativo. Ao lado da atividade antioxidante, alguns flavonóides exibem uma ação pró-oxidante, induzindo a oxidação da glutatona, sendo essa habilidade inversamente proporcional ao seu potencial redox (GALATI et al., 2002).

No presente estudo, a ternatina,/DMSO mostrou-se capaz de diminuir a intensidade da peroxidação lipídica no testículo exposto aos efeitos nocivos da isquemia, reduzindo drasticamente os níveis de MDA, no tempo máximo de isquemia ($0,46 \pm 0,15$ versus $7,95 \pm 0,37$ – $p < 0,001$). Essa redução persistiu durante o período de reperfusão (Tabela 6, Figuras 20 e 21). Souza, Rao e Silveira (1992, 1998)

demonstraram os efeitos protetores da ternatina na prevenção da lesão hepática induzida por paracetamol e por tetracloreto de carbono, em ratos. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores, na lesão hepática induzida por pela Aflotoxina B₁ (SOUZA; TOME; RAO, 1999).

A ternatina não conseguiu reverter os efeitos da torção do cordão espermático no tempo máximo de isquemia, uma vez que não foram observadas diferenças significantes nas concentrações de GSH comparando-se GT/D *versus* GD (Tabela 14, Figuras 34 e 35). Durante a reperfusão ocorreu redução significativa ($p < 0,01$) das concentrações de GSH. A redução dessas concentrações poderia ser uma devida ao aumento do estresse oxidativo, decorrente, conjectura-se, de uma possível atividade pró-oxidante da ternatina, atividade essa já demonstrada em outros flavonóides (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994; SAHU; GRAY, 1993, 1996, 1997).

Segundo Zhang et al. (1997) os flavonóides dotados de certas características químicas (hidroxilação nas posições C-5 e C-7 no anel A, a presença de um grupamento carbonil na posição C-4 e de um anel tipo B ligado a C-2 é capaz de inibir a ação da enzima glutathiona redutase, responsável pela produção da glutathiona reduzida (GSH). Estudos recentes demonstram que os flavonóides podem comportar-se como substâncias antioxidantes ou pró-oxidantes, sendo fatores determinantes para esse comportamento as condições do ensaio, a concentração do flavonóide no local onde as substâncias reativas estão sendo produzidas, a estabilidade do radical do flavonóide doador de um átomo de hidrogênio ao radical atacante, seu caráter lipofílico e o pH do meio (TRUEBA, 2003). Alguns dos mecanismos pelos quais os flavonóides exercem suas atividades pró-oxidantes incluem a redução temporal de Cu^(II) a Cu^(I) (RAHMAN et al., 1989; RAHMAN et al., 1992; BROWN et al., 1998), da geração de radicais livres de oxigênio (SAHU; GRAY, 1993, 1996, 1997) e alterações das funções protetoras da glutathiona e da enzima glutathiona S-transferase (GST). Sahu e Gray (1996) estudaram os efeitos de três flavonóides (quercitina, miricetina e kaempferol) sobre a glutathiona e a GST, demonstrando experimentalmente, *in vitro*, a atividade pró-oxidante destes flavonóides polifenólicos. As pesquisas atuais sinalizam para a presença de um grupamento catecol na estrutura do flavonóide como elemento fundamental para o desenvolvimento da sua atividade antioxidante, ao passo que a atividade pró-oxidante estaria relacionada à presença de um grupamento pirogálico na estrutura do flavonóide (TRUEBA, 2003).

O uso do DMSO com diluente pode ter contribuído para esse possível efeito pró-oxidante da ternatina. Hanasaki, Ogawa e Fukui (1994) demonstraram, pesquisando os efeitos pró-oxidantes de alguns flavonóides, especificamente a baicalina, a quercitina, a morina e a miricetina, que estas substâncias eram capazes de incrementar a geração do radical hidroxila, através da reação de Fenton, num ensaio baseado na determinação do ácido metassulfônico produzido pela reação do dimetilsulfóxido com este radical.

O aumento da concentração de substâncias oxidantes, *in vivo*, resulta, de maneira geral, na diminuição da capacidade antioxidante total. A interpretação das mudanças da capacidade antioxidante total no plasma depende das condições do ensaio. Um aumento da capacidade antioxidante total do plasma não é, necessariamente, uma condição favorável, caso seja secundária a uma resposta adaptativa ao estresse ocorrido anteriormente. Por outro lado, a redução da capacidade antioxidante total não pode ser interpretada como uma condição desfavorável, se a produção de substâncias reativas ao oxigênio estiver diminuída (PRIOR; CAO, 1999).

A associação ternatina+DMSO promoveu um aumento da Capacidade Antioxidante Total (CAP) no plasma dos ratos pré-tratados com o flavonóide, após 1 h de reperusão (Tabela 22, Figuras 48 e 49), sugerindo que essas substâncias desempenham uma ação antioxidante sistêmica por outros mecanismos ainda não esclarecidos e que, aparentemente, não estão relacionados ao aumento das concentrações de glutathiona plasmática.

As concentrações médias de MDA, GSH e CAP, aferidas nos ratos tratados com antioxidantes (GD, GA e GT/D) foram comparadas ao grupo GC, pré-tratado com solução salina, utilizando-se, para tanto, o teste de comparações múltiplas de Dunnett, adequado para este tipo de análise estatística (DAWSON; TRAPP, 2004). Obteve-se, assim, um estudo comparativo dos diversos grupos estudados, no tempo máximo de isquemia (T-0) e durante a reperusão.

Houve redução significativa ($p < 0,01$) das concentrações de MDA em todos os grupos tratados com antioxidantes (GD, GA e GT/D) comparados ao grupo GC, tratado com solução salina, no tempo máximo de isquemia. Comparado ao controle (G-2), o DMSO reduziu o nível de MDA em 71% ($7,95 \pm 0,37$ versus $27,58 \pm 3,73$, $p < 0,01$). O LA, por seu turno foi capaz de proporcionar uma redução de 73% ($6,65 \pm 0,34$ versus $27,58 \pm 3,73$, $p < 0,01$) nos níveis de MDA, em comparação ao seu grupo controle (GC).

Das substâncias estudadas, a ternatina apresentou maior atividade antiperoxidativa, reduzindo a concentração do malonaldeído em 98% ($0,47 \pm 0,15$ versus $27,58 \pm 3,73$, $p < 0,01$), quando comparada ao controle solução salina (GC) (Tabela 7, Figuras 22 e 23). Os efeitos anti-peroxidativos dos antioxidantes estudados também se fizeram presentes durante a reperfusão, onde foram constatadas reduções significantes das concentrações de MDA ($p < 0,01$), comparando-se os grupos GD ($11,79 \pm 1,13$ versus $35,01 \pm 1,70$), GA ($7,64 \pm 0,89$ versus $35,01 \pm 1,70$) e GT/D ($0,15 \pm 0,02$ versus $35,01 \pm 1,70$, $p < 0,05$) ao grupo G-2, demonstrando a ação protetora desses três antioxidantes (Tabela 8, Figuras 24 e 25).

As variações das concentrações de GSH também foram avaliadas no tempo máximo de isquemia e durante a reperfusão, utilizando a mesma sistemática de comparação e análise estatística. Aumento significativo ($p < 0,01$) das concentrações de GSH, nos grupos pré-tratados com antioxidantes, no tempo máximo de isquemia, foi observado nos grupos GD ($15,46 \pm 3,87$ versus $51,34 \pm 8,02$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco), GA ($15,40 \pm 3,97$ versus $72,65 \pm 3,25$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) e GT/D ($15,40 \pm 3,97$ versus $39,85 \pm 2,43$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) (Tabela 15, Figuras 36 e 37). Apesar do aumento das concentrações de GSH no grupo pré-tratado com ternatina+DMSO (GT/D), observou-se que esses valores foram menores, em termos percentuais (46%), que aqueles aferidos nos ratos pré-tratados somente com DMSO. Resultados semelhantes ($p < 0,01$) também foram encontrados na fase de reperfusão: GD ($15,46 \pm 1,79$ versus $77,04 \pm 3,27$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco), GA ($15,46 \pm 1,79$ versus $80,27 \pm 5,76$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco), e GT/D ($15,46 \pm 1,79$ versus $35,62 \pm 2,93$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco) (Tabela 16, Figuras 38 e 39). Verifica-se, ao se analisar os dados apresentados, que o DMSO e o LA foram capazes de aumentar as concentrações de GSH em 80% e 81%, respectivamente. A ternatina+DMSO, mostrou, por outro lado, uma possível ação pró-oxidante no tecido isquêmico, uma vez que os valores encontrados foram substancialmente menores (54%) que aqueles obtidos pelo uso isolado do DMSO, no grupo GD (Tabela 17, Figuras 40 e 41).

O estudo da capacidade antioxidante total do plasma (CAP) mostrou que entre substâncias estudadas, apenas a ternatina/DMSO (GT/D) demonstrou uma atividade antioxidante efetiva, promovendo um incremento significativo ($p < 0,05$) na CAP, durante a reperfusão (Tabela 24, Figuras 52 e 53). O mesmo fenômeno não se repetiu durante a isquemia (Tabela 23, Figuras 50 e 51). O aumento da CAP, durante a reperfusão, em ratos pré-tratados com o flavonóide confirma, mais uma

vez, a ação sistêmica da ternatina/DMSO, durante a reperfusão, atuando sobre os antioxidantes plasmáticos, vez que o uso isolado do DMSO (GD) não foi capaz de induzir alterações significantes na CAP do plasma (Tabela 20, Figuras 44 e 45).

Esses resultados fortalecem a hipótese de que a isquemia e reperfusão são processos geradores de radicais livres. O modelo de isquemia/reperfusão utilizado no presente estudo se mostrou adequado, considerando a ocorrência de peroxidação lipídica no tempo máximo de isquemia, e um agravamento da lesão, identificado pelo aumento das concentrações de MDA, após uma hora de reperfusão. Os diferentes antioxidantes estudados mostraram grande eficiência na proteção da membrana celular, reduzindo a peroxidação lipídica, em todos os experimentos, tanto no tempo máximo de isquemia como durante a reperfusão. A atividade antiperoxidativa da ternatina, diluída em DMSO, suplantou em muito, em termos de redução das concentrações de MDA, os valores aferidos nos ratos pré-tratados com DMSO e ácido α -lipóico. Com relação as concentrações de GSH, tanto o DMSO como o ácido α -lipóico mostraram-se eficientes na regeneração da glutathiona, em todas as fases do estudo. Entretanto, a ternatina+DMSO não foi capaz de promover o aumento das concentrações de GSH, no tempo máximo de isquemia, a exemplo do que ocorreu com os outros dois antioxidantes. Durante a reperfusão ocorreu uma redução significativa das concentrações de glutathiona, em relação aos valores aferidos no grupo GD, traduzindo uma possível atividade pró-oxidante da ternatina, revelada pelos baixos níveis teciduais deste tripeptídeo. Merece destaque a atividade sistêmica da ternatina. A aferição da CAP nos ratos pré-tratados com o flavonóide, mostrou que sua ação de manifesta somente durante a reperfusão e se inicia após uma hora de reperfusão. O LA também promoveu o aumento da CAP após uma hora de reperfusão. Entretanto, esses resultados não foram reiterados nas comparações dos grupos pré-tratados com antioxidantes (GT/D, GA e GD) onde somente a combinação ternatina+DMSO foi capaz de promover um aumento significativo da CAP, durante a reperfusão (Tabela 24, Figuras 52 e 53). No tecido, os efeitos da ternatina sobre as concentrações de GSH sugerem uma possível ação pró-oxidante do flavonóide.

Por fim, pode-se afirmar que a lesão de isquemia/reperfusão é complexa, e deve ser combatida, na torção do cordão espermático, com ações objetivas, traduzidas pela intervenção cirúrgica precoce, reduzindo ao máximo a ação dos mediadores inflamatórios e das substâncias reativas ao oxigênio além da utilização

de substâncias capazes de melhorar a resistência dos tecidos à isquemia, diminuindo a produção e neutralizando a ação dos radicais livres. As drogas empregadas no presente experimento ainda necessitam de estudos adicionais para definir sua biodisponibilidade e aplicação em seres humanos. Pesquisas adicionais, utilizando diferentes concentrações desses antioxidantes e um menor tempo de isquemia, com manifestação de lesões mais exuberantes durante a reperfusão, permitirão avaliar todo o potencial terapêutico desses antioxidantes.

6 CONCLUSÃO

A torção/destorção do cordão espermático induz aumento da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo no testículo, no tempo máximo de isquemia e na reperfusão.

O dimetilsulfóxido e o ácido α -lipóico oferecem proteção contra a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo do testículo, durante a lesão de isquemia e reperfusão do testículo.

A ternatina protege o testículo contra a peroxidação lipídica durante a lesão de isquemia e reperfusão.

A ternatina e o ácido α -lipóico aumentam a proteção antioxidante no plasma dos ratos submetidos à isquemia/reperfusão do testículo durante a reperfusão

O modelo de isquemia/reperfusão do testículo utilizado no estudo não gera repercussões sistêmicas detectáveis no plasma dos ratos submetidos à torção/destorção do cordão espermático.

REFERÊNCIAS

ABASIYANIK, A.; DAGDONDEREN, L. Beneficial Effects of Melatonin Compared With Allopurinol in Experimental Testicular Torsion. **J. Pediatr Surg.**, v. 39, p.1238-1241, 2004.

ABES, M.; SARIHAN, H.; DEGER, O.; UYDU, H. A. The effect of ATP-MgCl₂ on prevention of reperfusion injury after unilateral testicular torsion. **Eur. J Pediatr. Surg**, v. 11, n. 4, p. 255-258, 2001.

ABUL, H.T.; MATHEW, T.C.; ABUL, F.; AL-SAYER, H.; DASHTI, H.M. Antioxidant enzyme level in the testes of cirrhotic rats. **Nutrition**. v. 18, n.1, p. 56-59, 2002.

ADIVAREKAR, P.K.; BHAGWAT, S.S.; RAGHAVAN, V.; BANDIVDEKAR, A.H. Effect of Lomodex-MgSO₄ in the prevention of reperfusion injury following unilateral testicular torsion: an experimental study in rats. **Pediatr. Surg. Int.**,v. 21, n. 3, p.184-190, 2005.

AGARWAL, A., IKEMOTO, I., LOUGHLIN, K. R. Prevention of testicular damage by free-radical scavengers. **Urology**, v. 50, n. 5, p. 759-763, 1997.

AHMED, F.A.; WHELAN, J.; ANNE M.; JEQUIER, A.M.; CUMMINS, J.M. Torsion-induced injury in rat testes does not affect mitochondrial respiration or the accumulation of mitochondrial mutations. **Int. J. Androl.**, v. 23, p. 347-356, 2000.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biol. Reprod.**,v. 41, n. 1, p. 183-197, 1989.

AKGÜR, F.M.; KILINC, K.; TANYEL, F. C.; BÜYÜKPAMUKCU, N.; HICSÖNMEZ, A. Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. **Urology**, v. 44, n. 3, p. 413-418, 1994a.

AKGÜR, F.M., KILINÇ, K., AKTUG, T., OLGUNER, M. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. **J. Urol.**,v. 15, p. 1715-1717, 1994b.

AKGÜR, F. M.; KILINC, K.; AKTUG, T. Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in prepuberal rats. **Urol. Res.**, v. 21, n. 6, p. 389-393, 1993.

ANDERSON, J. B.; WILLIAMSON, R. C. N. The fate of the human testis following unilateral torsion of the spermatic cord. **British J. Urol.**, v. 58, n.6, p. 698-704, 1986.

ANDERSON, J.B; WILLIAMSON, R.C.N. Testicular torsion in Bristol: a 25 year review. **Br. J. Surg.**, v.75, p. 988-992, 1988.

ANDIRAN, F.; OKUR, D.H.; KILINC, A.; GEDIKOGLU, G.; KILINC, K.; TANYEL, F.C. Do experimentally induced ipsilateral testicular torsion, vas deferens obstruction, intra-abdominal testis or venous obstruction damage the contralateral testis through a common mechanism? **BJU Int.**, v. 85, n. 3, p. 330-335, 2000.

ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 356, n. 2, p. 133-141, 1998a.

_____. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998b.

ARTEEL, G.E.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Protection against peroxynitrite. **FEBS Lett.**, v. 445, n. 2-3, p. 226-30, 1999.

AUTHIER, N.; DUPUIS, E.; KWASIBORSKI, A.; ESCHALIER, A.; COUDORE', F. Behavioural assessment of dimethylsulfoxide neurotoxicity in rats. **Toxicol. Lett.**, v. 132, n. 117-121, 2002.

AVLAN, D.; ERDOUGAN, K.; CIMEN, B.; DUZMEZ APA D.; CINEL, I.; AKSOYEK, S. The protective effect of selenium on ipsilateral and contralateral testes in testicular reperfusion injury. **Ped. Surg. Int.**, v. 21, p. 274-278, 2005.

BALDINI, M.G.; MYERS, T.J. One more variety of 'storage pool disease'. **JAMA**, v. 244, n.2, p. 173-175, 1980.

BAKER, L.A.; TURNER, T.T. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. **J. Androl.**, v. 16, n.1, p.12-17, 1995.

BARKER, K.; RAPER, F.R. Torsion of the testis. **Br. J. Urol.**, 36:35-41, 1964.

BARTOSIKOVA, L.; NECAS, J.; SUCHY, V.; KUBINOVA, R.; VESELA, D.; BENE, L.; ILLEK, J.; SALPLACHTA, J.; FLORIAN, T.; FRYDRYCH, M.; KLUSAKOVA, J.; T. BARTOSIK, L.; FRANA, L.; FRANA, P.; DZUROVA, J. Antioxidative Effects of Morine in Ischemia-Reperfusion of Kidneys in the Laboratory Rat. **ACTA VET. BRNO**, v. 72, p. 87-94, 2003.

BARTSCH G.; FRANK S. T.; MARBERGER, H.; MICUZ, G. Testicular torsion: late results with special regard to fertility and endocrine function. **J. Urol.**, v.124, n.3, p. 375-278, 1980.

BAST, A.; HAENAN, G.R.M.M. Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 963, p.558-561, 1988.

- BASTIAANS, H.M.M.; HAENAN, G.R.M.M. Interplay between ascorbic acid, tocopherol, glutathione and lipoic acid in the protection against microsomal lipid peroxidation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 183, p. 2436-2437, 1990.
- BAUCHE, F.; FOUCHARD, M.H.; JEGOU, B. Antioxidant system in rat testicular cells. **FEBS Lett.**, v. 349, n.3, p.392-396, 1994.
- BECKER JR., E. J.; TURNER, T. T. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. **J. Androl.**, v. 16, n. 4, p. 342-51, 1995.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BERGH, A.; DAMBER, J.E.; MARKLUND, S.L. Morphologic changes induced by short-term ischemia in the rat testis are not affected by treatment with superoxide dismutase and catalase. **J. Androl.**, v. 9, n. 1 p. 15-20, 1988.
- BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. **Gen. Pharmac.**, v. 29, n. 3, p. 315-331, 1997.
- BLANK, M. L.; O'NEILL, P. J.; STEIGMAN C. K.; COBB L. M.; WILDE R. A.; HAVENSTEIN P. J.; CHAUDRY I. H. Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in prepubertal rats. **Urol. Res.**, v. 21, n. 6, p. 389-393, 1993.
- BOHM, H.; BOEING, H.; HEMPEL, J.; RAAB, B.; KROK, A. Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. **Z. Ernährungswiss**, v. 2:147-163, 1998.
- BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldeyde a valuable of peroxidation? **Biochem. Pharmacol.**, v.44, n.5, p.985-988, 1992.
- BONORDEN, W.R.; PARIZA, M.W. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: KOTSONIS, F.N.; MACKEY, M.; HJELLE, J.(eds.). **Nutritional toxicology**. New York: Raven Press Ltd., 1994. p. 19-48.
- BORAN, C.; OZKAN, K.U. The effect of zinc therapy on damaged testis in prepubertal rats. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 20, n. 6, p. 444-448, 2004.
- BOZLU, M.; ESKANDARI, G.; CAYAN, S.; CANPOLAT, B.; AKBAY, E.; ATIK, U. The effect of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitors on biochemical changes in testicular ischemia-reperfusion injury. **J. Urol.**, v. 169, p.1870-1873, 2003.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Centro de Divulgação Universitária, 1960.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BROWN, J.E.; KHODR, H.; HIDER, R.C.; RICE-EVANS, C.A. Structural dependence of flavonoids interactions with Cu_2^+ ions: implications for their antioxidant properties. **Biochem. J.**, v. 330, p. 1173-1178, 1998.

BRUCK, R.; SHIRIN, H.; AEED, H.; MATAS, Z.; HOCHMAN, A.; PINES, M.; AVNI, Y. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. **J. Hepatol.**, v. 35, p. 457-464, 2001.

BUSSE, E.; ZIMMER, G.; SCHOPOHL, B.; KORNHUBER, B. Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. **Arzneimittelforschung**, v. 42, n.6, p. 829-831, 1992.

CARPENTER, R.J.; ANGEL, M.F.; MORGAN, R.F. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 110, n. 2, p. 228-231, 1994.

CARREAU, J.P. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. **Methods Enzymol.**, v. 62, p.152-158, 1979.

CAVALETTI, G.; OGGIONI, N.; SALA, F.; PEZZONI, G.; CAVALLETTI, E.; MARMIROLI, P.; PETRUCCIOLI, M.G.; FRATTOLA, L.; TREDICI, G. Effect on the peripheral nervous system of systemically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study. **Toxicol. Lett.** v. 118, p. 103-107, 2000.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHIDLOW, G.; SCHMIDT, K.-G.; WOOD, J.P.M.; MELENA, J.; OSBORNE, N.N. α -lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. **Neuropharmacol.**, v. 43, p.1015–1025, 2002.

CHIRICO, S. High Performance Liquid Chromatography-based Thiobarbituric acid tests. **Methods in Enzimology**, v.233, p.314-318, 1994.

CHOLBI, M.R.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl_4 -induced microsomal lipid peroxidation. **Experientia**, v. 47, n. 2, p. 195-9, 1991.

CLARK, M.G.; GANNON, B.J.; BODKIN, N.; PATTEN, G.S.; BERRY, M.N. An improved procedure for high-yield preparation of intact beating heart cells from adult rat: Biochemical and morphologic study. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.10, n.12, p.1101-1121, 1978.

CLARK, S.F. The biochemistry of antioxidants revisited. **Nutr. Clin. Pract.** v. 17, p.5-17, 2002.

CONSTANTINESCU, A.; PICK, U.; HANDELMAN, G.J.; HARAMAKI, N.; HAN, D.; PODDA, M.; TRITSCHLER, H.J.; PACKER, L. Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 50, n. 2, p. 253-261,1995.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Lesão e morte celular. In: ROBBINS: **Patología estructural e funcional**. 5. ed.,Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 1996, p.1-30.

COTELLE, N.; BERNIER, J.L.; J. P. HENICHART, J.P.; CATTEAU, J.P.; GAYDOU, E.; WALLET, J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones.**Free Rad. Biol. Med.**, v. 13, p. 211-219, 1992.

DAWSON, B.; TRAPP, R.G. **Bioestatística básica e clínica**. 3.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2004.

DE GROOT, H.; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 3, p. 249-255, 1998.

DE LA TORRE, J.C.; NELSON, N.;SUTHERLAND, R.J.,; PAPPAS, B.A. Reversal of ischemic-induced chronic memory dysfunction in aging rats with a free radical scavenger-glycolytic intermediate combination. **Brain Res.**, v. 779, p. 285-288, 1998.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, n. 4 (Pt 1), p. L163-173, 1989.

DI MEO, S.; VENDITT, P.; De LEO, T. Tissue protection against oxidative stress. **Experientia**, v. 52, n. 8, p.786-794, 1996.

DIXON T.K.; RITCHEY, M. L.; BOYKIN, W.; HARPER, B.; ZEIDMAN, E.; THOMPSON, I.M. Transparenchymal suture fixation and testicular histology in a prepuberal rat model. **J. Urol.**, v. 149, n. 5, p.1116-1118, 1993.

DOKUCU, A.I.; OZTURK, H.; OZDEMIR, E.; KETANI, A.; BUYUKBAYRAM, H.; YUCESAN, S. The protective effects of nitric oxide on the contralateral testis in prepubertal rats with unilateral testicular torsion. **BJU Int.**, v. 85, n. 6, p. 767-771, 2000.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 47-97, 2002.

DUPRE, S.; SPOTO, G.; MATARESE, R.M.; ORLANDO, M.; CAVALLINI, D. Biosynthesis of lipoic acid in the rat: incorporation of 35S- and 14C-labeled precursors. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 202, n. 2, p. 361-5, 1980.

EL-MISSIRY, M.A. Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.124, Part C, p. 233-237, 1999.

EVANS, J.L.; GOLDFINE, I.D. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Technol. Ther.**, v. 2, n. 3, P. 401-13, 2000.

FERRANDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v. 32, n.3-4, p. 283-288, 1991.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FESTING, M. F. W. Suitability of the rat for different investigations. In: ALTMAN, P. I.; KATZ, D. D. (Eds.)- **Inbred and genetically defined strains of laboratory animals, mouse and rat**. Bethesda, **Fed. Am. Soc. Exp. Biol.**, v. 1, p. 237-238, 1979.

FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.**, v. 4, n.2, p.587-597, 1990.

FRASER, I., SLATER, N., TATE, C., SMART, J.G. Testicular torsion does not cause autoimmunization in man. **Br. J. Urol.**, v.72, n. 237-238, 1985.

FREISLEBEN, H-J. Lipoic acid reduces ischemia-reperfusion injury in animal models. **Toxicology**, v.148, p. 159-171, 2000.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J.X.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxy radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 91-104, 2002

GALLEANO, M. PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocyte resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1271, n. 2-3, p. 321-326, 1995.

GALVEZ, J.; DE LA CRUZ, J.P.; ZARZUELO, A.; DE LA CUESTA, F.S. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, v. 51, p.127-133, 1995.

GAUSCHE, M. Genitourinary surgical emergencies. **Pediatr. Ann.**, v. 25, n. 8, p. 458-464, 1996.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, n. 11, p.1106-1114, 2000.

GHOSH, A.K.; TATSUJI, I.; GHOSH, S.; SLOVITER, H.A. Effects of dimethylsulfoxide on metabolism of isolated perfused rat brain. **Biochem. Pharmacol.**, v. 25, n. 9, p.115-117, 1976.

GIANNAKOPOULOS, X.; ZIKOPOULOS, C.; NTOURNTOUFI, A.; ANDRONIKOU, S. Intrauterine unilateral torsion of the spermatic cord. **Minerva Urol. Nefrol.**, v. 47, n. 2, p. 95-96, 1995.

GOMEZ, G. I.; RUIZ, R. J.L.; SANZ, M. E.; CONDE, S. S.; BRIONES, M. G.; LINARES, Q. A.; GARCIA, N. R.; BURGOS, R. F.J.; ESCUDERO, B. A. Testicular torsion in the geriatric patient. Review of the literature apropos of a case. **Actas Urol Esp.**, v. 27, n. 6, p. 465-467, 2003.

GRACE, P.A. Ischaemia-reperfusion injury (review). **British J. Surg.**, v. 81, n. 5, p. 637-647, 1994.

GREENSTEIN, A.; SCHREIBER, L.; MATZKIN, H. The effect of methylene blue on histological damage after spermatic cord torsion in a rat model. **BJU Int.**, v. 88, n.1, p.90-02, 2001.

GREENSTEIN, A., SMITH-HARRISON, L.I., WAKELY, P.E., KOLOLGI, S., SALZBERG, A.D., KOONTZ, W. E. JR. The effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. **J. Urol.**, v. 148, n. 2 pt 2, p. 639-641, 1992.

GREENWALD, R.A. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 8, n. 2, p.201-9, 1990.

GUIMARÃES, S. B. **Estudo experimental das alterações agudas na glicemia e concentrações testiculares de ATP e glicose induzidas por torção unilateral, *in vivo***. 2002.76 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.L. *In vivo* acute changes in ATP and glucose concentrations in ipsilateral testicles of prepubertal rat. **Acta Cir. Bras.**, v.17, n.2, p.110-115, 2002

GURER, H.; OZGUNES, H.; OZTEZCAN, S.; ERCAL, N. Antioxidant role of α -lipoic acid in lead toxicity. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 27, n. 1/2, p. 75–81, 1999.

HALL, A.G. Glutathione and the regulation of cell death. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 457, p. 199-203, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HAN, D.; TRITSCHLER, H.J.; PACKER, L. Alpha-lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte Jurkat cell line. **Biochem. Biophys. Res.**, v. 207, p. 258-264, 1995.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, v.16, p. 845-850, 1994.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HAVESTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, v.32, n.7, p.1141-1448, 1983.

HERMANN, R.; NIBCH, G.; BORBE, H. O.; FIEGER, H.; RUUS, P.; NOWAK, H.; RIETHMILLER-WINZEN, H.; PEUKERT, M.; BLUME, H. Enantio selective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic α -lipoic acid formulations in healthy volunteers. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 4, p. 167-174, 1996.

IKEDA, Y.; LONG, D. M. Comparative effects of direct and indirect hydroxyl radical scavengers on traumatic brain oedema. **Acta Neurochir. Suppl. (Wien)**, v.51, p.74-76, 1996.

ITOH, M.; GUTH, P.H. Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, n. 5(Pt 1), p. 1162-1167, 1985.

JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Pharmacology of DMSO. **Cryobiology**, v. 23, n. 1, p. 14-27, 1986.

JANETSCHEK, G.; SCHRECKENBERG, F.; GRIMM, W.; MARBERGER, M. Hemodynamic effects of experimental testicular torsion. **Urol. Res.**, v. 15, n. 5, p. 303-306, 1987.

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; SERTESER, M.; KOKEN, T. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **J. Nephrol.**, v. 16, n. 2, p. 219-224, 2003.

KOKSAL, C.; BOZKURT, A. K.; CANGEL, U.; USTUNDAG, N.; KONUKOG, D.; MUSELLIM, B.; SAYIN, A. G. Attenuation of Ischemia/Reperfusion Injury by *N*-Acetylcysteine in a Rat Hind Limb Model. **J. Surg. Res.**, v.111, p. 236-239, 2003.

KOLB, K.H.; JAENECKE, G.; KRAMER, M.; SCHULZE, P.E. Absorption, distribution and elimination of dimethyl sulfoxide in man and animals. **An. N. Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 85-95, 1967.

KUROZUMI, R.; TAKAHASHI, M.; KOJIMA, S. Involvement of mitochondrial peroxynitrite in nitric oxide-induced glutathione synthesis. **Biol. Pharm. Bull.**, v.28, n. 5, p. 779-785, 2005.

LEIFERT, W.R.; JAHANGIRI, A.; MCMURCHIE, E. J. Antiarrhythmic fatty acids and antioxidants in animal and cell studies. **J. Nutr. Biochem.**, v.10, p. 252-267, 1999.

LIMA, M.A.; SILVEIRA, E.R.; MARQUES, M.S.L.; SANTOS, R.H.A.; GAMBARDELA, M.T.P. Biologically active flavonoids and terpenoids from *Egletes viscosa*. **Phytochemistry**, v.41, n.1, p. 217- 223, 1996.

LIU, P. T.; KENTISH, P. A.; SYMONS, A. M.; PARKE, D. V. The effects of ether anaesthesia on oxidative stress in rats - dose response. **Toxicology**, v. 80, p. 37-49, 1993.

LLESUY, S.F. Introducción y Espécies Activas de Oxigênio. In: MARRONI, N. P. (org.). **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, p. 21-32.

LUO, J.L.; HAMMARQVIST, F.; ANDERSSON, K.; WERNERMAN, J. Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 2 (Pt 1), p. E359-365, 1998.

MASTROGIACOMO, I.; ZANCHETTA, P.; GRAZIOTTI, P.; BETTERLE, C.; SCRUFARI, P.; LEMBO, A. Immunological and clinical study of patients after spermatic cord torsion. **Andrologia** , 14(1):25-30, 1982.

MATHEW, T.; KARUNANITHY, R.; YEE, M.H.; NATRAJAN, P.N. Hepatotoxicity of dimethylformamide and dimethylsulfoxide at and above the levels used in some aflatoxin studies. **Lab. Invest.**, v. 42, p. 257-262, 1980.

- MAXWELL, S.R.; LIP, G.Y. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 44, n. 4, p. 307-317, 1997.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The Utility of Superoxide Dismutase in Studying Free Radical Reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 22, p. 6056-6063, 1969.
- MEISTER, A. Mechanism and regulation of the glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase of Escherichia coli. **Adv.Enzymol.Relat.Areas Mol.Biol.**, v. 62, p. 315-374, 1989.
- MELEKOS, M. D.; ASBACH, H.W.; MARKOU, S.A. Etiology of acute scrotum in 100 boys with regard to age distribution. **J. Urol.**, v. 139, n. 5, p.1023-5, 1988.
- MERIMSKY, E.; ROCK, M.; KATZ, S. Assessment of fertility after testicular torsion: an experimental study. **Urol. Res.**, v. 10, p. 51-54, 1982.
- MITSUI, Y.; SCHMELZER, J. D.; ZOLLMAN, P. J.; MITSUI, M.; TRITSCHLER, H. J.; LOW, P. A. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. **J. Neurol. Sci.**, v.163, p. 11-16, 1999.
- MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N-E. L. Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.182, p. 84-90, 2002.
- NIJVELDT, J. R.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.;VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 74, p. 418-425, 2001.
- OBROSOVA, I. G.; FATHALLAH, L.; LIU, E.; JAFFAR NOUROOZ-ZADEH, J. Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of dl- α -lipoic acid. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 34, n. 2, p. 186–195, 2003.
- ORTOLANO, V.; NASRALLAH, P. F. Spermatic vessel ligation (Fowler-Stephens maneuver): experimental results with regard to fertility. **J. Urol.**, v. 136, n.1 (Pt 2), p. 211-213, 1986.
- OZKAN, K.U.; BORAN, Ç.; KILINC, M.; GARIPARDIC, M.; KURUTAS, E.B. The Effect of Zinc Aspartate Pretreatment On Ischemia-Reperfusion Injury and Early Changes of Blood and Tissue Antioxidant Enzyme Activities After Unilateral Testicular Torsion-Detorsion. **J. Pediatr. Surg.**, v. 39, n. 1, p. 91-95, 2004.
- OZOKUTAN, B. H.; KUCUKAYDIN, M.; MUHTAROGLU, S.; TEKIN, Y. The role of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, n. 1, p. 101-103, 2000.

PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Rad. Biol. Med.**, v.19, n.2, p.227-250, 1995.

PALMER, J. S., PLZAK, L. F., CROMIE, W. J. Comparison of blood flow and histological changes in rat models of testicular ischemia. **J. Urol.**, v.158 n. (3 pt 2), p.1138-1140, 1997.

PALMER J.S.; CROMIE, W.J.; LEE, R.C. Surfactant administration reduces testicular ischemia-reperfusion injury. **J. Urol.**, v. 159, n. 6, p. 2136-2139, 1998.

PANIGRAHI, M.; SADGUNA, Y.; SHIVAKUMAR, B.R.; KOLLURI, S.V.R.; ROY, S.; PACKER, L.; RAVINDRANATH, V. α -Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. **Brain Res.**, v.717, p.184-188, 1996.

PELTOLA V, HUHTANIEMI I, AHOTUPA M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. **J. Androl.**, v. 13, n. 5, p. 450-455, 1992.

PRAHALATHAN, C; SELVAKUMAR, E.; VARALAKSHMI, P. Remedial effect of DL-alpha-lipoic acid against adriamycin induced testicular lipid peroxidation. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 7, n. 1-2, p. 209-214, 2004.

PRILLAMAN, H. M.;TURNER, T.T. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. **J. Urol.**, v.157, n. 1, p. 340-345,1997.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, n.11-12, p. 1173-1181, 1999.

PURI, P., BARTON, D., O'DONELL, B. Prepuberal testicular torsion: subsequent fertility. **J. Pediatr. Surg.**, v. 20, n. 6, p. 598-601, 1985.

QUIJANO, C.; ALVAREZ, B.; GATTI, R.M.; AUGUSTO, O.; RADI, R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. **Biochem. J.**, v. 322 (Pt 1), p.167-173, 1997.

RAHMAN, A.; FAZAL, F.; GREENSILL, J.; AINLEY, K.; PARISH, J.H.; HADI, S.M. Strand scission in DNA induced by dietary flavonoids: role of Cu(I) and oxygen free radicals and biological consequences of scission. **Mol. Cell Biochem.**, v.111, p. 3-9, 1992.

RAHMAN, A.; SHAHABUDDIN, S.; HADI, S.M.; PARISH, J.H. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu (II): role of Cu (I) and oxygen free radicals. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 1833-1839, 1989.

RALITCHKOVA, L.; NANOV, Z.; GOTCHEV, D.; HINEV, A.; LIBALD, T.; WOLNIK, R. Experimental testicular torsion--early and late morphological and enzymohistochemical changes. **Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe**, v. 23, n.3, p. 185-8, 1990.

RAO, V.S.; FIGUEIREDO, E.G.; MELO, C.L.; VIANA, G.S.; MENEZES, D.B.; MATOS, M.S.; SILVEIRA, E.R. Protective effect of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* less., in experimental liver injury. **Pharmacology**, v. 48, n. 6, p.392-397,1994.

RAO, V.S.; PAIVA, L.A.; SOUZA, M.F.; CAMPOS, A. R.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A.; TEIXEIRA, M.J.; SILVEIRA, E.R. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. **Planta Med.**, v. 69, n. 9, p. 851-853, 2003.

RAO, V.S.; SANTOS, F.A.; SOBREIRA, T.T.; SOUZA, M.F.; MELO, C.L.; SILVEIRA, E.R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Med.**, v. 63, n. 2, p.146-149, 1997.

RAO, V.S.N.; PAIVA, L. A. F.; SOUZA, M. F.; CAMPOS, A. R.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C.; TEIXEIRA, M. J.; SILVEIRA, E. R. Ternatin, an Anti-Inflammatory Flavonoid, Inhibits Thioglycolate-Elicited Rat Peritoneal Neutrophil Accumulation and LPS-Activated Nitric Oxide Production in Murine Macrophages. **Planta med.**, v. 69, p. 851-853, 2003

REED, L. J. Multienzyme complex. *Acc. Chem. Res.*, v. 7, p. 40-46, 1974.

REGADERA, J.; NISTAL, M.; PANIAGUA, R. Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. Correlation of angiographic and histologic studies with systemic arteriosclerosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.109, n.7, p.663-667, 1985.

REILLY, P.M.; SCHILLER, H.J.; BULKLEY, G.B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am. J. Surg.**, v. 161, n. 4, p. 488-503, 1991.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J., Flavonoids as scavengers of superoxide anions. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, n. 5, p. 837–841, 1988.

RODRIGUEZ, L.E.; KAPLAN, G.W. An experimental study of methods to produce intrascrotal testicular fixation. **J Urol.**, v.139, n.3, p. 565-567, 1988.

ROMEO, C.; ANTONUCCIO, P.; ESPOSITO, M.; MARINI, H.; IMPELLIZZERI, P.; TURIACO, N.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A.; ZUCCARELLO, B.; SQUADRITO, F. Raxofelast, a hydrophilic vitamin e-like antioxidant, reduces testicular ischemia-reperfusion injury. **Urol. Res.** v.5, p.367-371, 2004.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p.112-119, 2001.

RUIGROK, T.J.; DE MOES, D.; SLADE, A.M.; NAYLER, W.G. The effect of dimethyl sulfoxide on the calcium paradox. **Am. J. Pathol.** v.103, n.3, p. 390-403, 1981.

RUSSO, A.; ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. **Cell. Biol. Toxicol.**, v.16, n.2, p.91-98, 2000.

RYAN, P.C.; GOREY, T.F.; FITZPATRICK, J.M. Experimental Testicular Torsion: Fixation without Parenchymal Trauma. **Eur.Urol.** v. 14, n. 2, p. 141-44, 1988.

SABA, M.; MORALES, C.R.; De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. - Morphological and biochemical changes following acute torsion in prepubertal rats. **J. Urol.**, v.157, n.3, p.1149-1154, 1997.

SAHU S. C.; GRAY, G.C. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation in induced by miricetin. **Cancer Lett.**, v. 70, n.1-2, p. 73-79, 1993.

_____. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione-S transferase in isolated rat liver nuclei. **Cancer Lett.**, v.104, p. 193-196, 1996.

_____. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. **Food Chem. Toxicol.**, 1997; v.35, n.5, p. 443-447, 1997.

SALIM, A.S. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119:710–717, 1992.

SANTOS, N.C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65, n.7, p.1035-1041, 2003.

SAUGSTAD, O.D. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. **Pediatr Res.**, v. 23, n. 2, p. 143-150, 1988.

SAUVAT, F.; HENNEQUIN, M.; SLIMANE, A.A.; GAUTHIER, F. Un âge pour la torsion testiculaire? **Arch. Pediatr.**, v. 9, p. 1226-1229, 2002.

SAVAS, C., DINDAR, H., ARAS, T., YUCESAN, S. Pentoxifylline improves blood flow to both testes in testicular torsion. **Int. Urol. Nephrol.**, v. 33, n. 1, p. 81-85, 2002.

SCHIFFER, C.A.; WHITAKER, C.I.; SCHMUKLER, M.; AISNER, H.; HIBERT, S.L. The effect of dimethyl sulfoxide on in vitro platelet function. **Thromb. Huemostasis**, v. 36, n.1, p. 221-229, 1976.

SCHOLICH, H.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on α - tocopherol.

Biochem. Biophys. Acta, v.1001, p. 256-261, 1989.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SELVAKUMAR, E.; PRAHALATHAN, C.; MYTHILI, Y.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of dl-alpha-lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. **Reprod. Toxicol.**, v. 19, n. 2, p. 163-167, 2004.

SEUNG-JUNE, O. H.; KWAK, C.; BAEK, M.; KIM, C-S.; SUK, K.; KIM, S.; CHOI, H. Histologic and molecular changes in the ipsilateral and contralateral epididymides of the rat in response to unilateral testicular torsion followed by detorsion. **Fertil. Steril.**, v. 81, (SUPPL. 1), p. 882-887, 2004.

SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; MACEDO, L.M.B. Contribuição do conhecimento químico de plantas do nordeste. *Egletes viscosa* Less. **Cienc. Cult.**, v. 41, p. 511, 1989.

SINGH, D.; CHANDER, V.; CHOPRA, K. Protective effect of catechin on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. **Pharmacol. Rep.** 2005 Jan-Feb; v. 57, n. 1, p. 70-76, 2005.

SIVAPRASAD, R.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. **J Nutr Biochem.**, v.15, n. 1, p. :18-23, 2004.

_____. Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. **Arch.Toxicol.**, v. 76, p. 437-441, 2002.

SKOGLUND, R .W.; MCROBERTS, J. W.; RADGE, H. Torsion of the spermatic cord: a review of the literature and analysis of 70 new cases. **J. Urol.**, v. 104, n. 4, p. 604-607, 1970.

SOUSA, M.F. **Atividade anti-inflamatória, anti-trombótica e anti-anafilática da ternatina, um novo flavonóide da *Egletes viscosa* Less.** 1993. 99 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1993.

SOUZA, M. F.; CUNHA, G. M. A.; FONTENELE, J. B.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N. Antithrombotic activity of Ternatin, a Tetramethomy Flavone from *Egletes viscosa* Less. **Phyther. Res.**, v. 4, 478-481, 1994.

SOUZA, M. F.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 1029-1032, 1992.

_____. Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by ternatin, a bioflavonoid from *Egletes viscosa* Less. **Phytother. Res.**, v. 12, n. 8, p. 557-561, 1998.

_____. Inhibition of lipid peroxidation by ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa* L. **Phytomedicine.**, v.4, n.11, p.27-31, 1997.

SOUZA, M.F.; TOME, A.R.; RAO V.S. Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.51, n.2, p.125-129, 1999.

SOUTO, C.A.V.; LEMOS, N.; LISBOA, J.F.; SOUTO, J.C.S.; LEMOS, F.R.; LEMOS, R. R.Torção do testículo espermático. Análise de 26 casos Atendidos em Dois Hospitais Universitários. **J. B. M.**, v. 77, n. 3, p. 24-28, 1999.

SUMATHI, R.; BASKARAN, G.; VARALAKSHMI, P. Relationship between glutathione and DL alpha-lipoic acid against cadmium-induced hepatotoxicity. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 49, n. 2, p.39-48, 1996.

SUMATHI, R.; JAYANTHI, S.; KALPANADEVI, V.; VARALAKSHMI, P. Effect of DL alpha-lipoic acid on tissue lipid peroxidation and antioxidant systems in normal and glycollate treated rats. **Pharmacol. Res.**, v. 27, n. 4, p.309-18, 1993.

SUMATHI, R.; JAYANTHI, S.; VARALAKSHMI, P. DL a-lipoic acid as a free radical scavenger in glyoxylate-induced lipid peroxidation. **Med. Sci. Res.**, v.21, p.135-137, 1993.

SUZUKI, Y.J.; TSUCHYA, M. PACKER, L. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. **Free Rad. Res. Comms.**, v. 15, p. 255-263, 1991.

SZMANT, H.H. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. Acesso em 10/07/2004. Disponível em:
<http://www.dmsso.org/articles/information/pszmant.html>

TAUBER, A.I.; FAY, J.R.; MARLETTA, M.A. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, n.8, p.1367-1369, 1984.

TURAN, C.; KÜÇÜKAYDIN, N.; BEKERECIÖGLU, A.; KAZEZ, A.; DÖGAN, P.; KUÇÜKAYDIN, M. The effect of vitamin E on ipsilateral and contralateral testis following unilateral testicular torsion in rats. **Res. Exp. Méd. (Berl)**, v. 196, n. 4, p. 243-246, 1996.

THOMAS, W.E.; COOPER, M.J.; CRANE, G.A.; LEE, G.; WILLIAMSON, R.C. Testicular exocrine malfunction after torsion. **Lancet**, v. 2, n. 1, p. 1357-1360, 1984.

TRUEBA, G.P. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v. 22, n. 1, p. 48-57, 2003.

TURNER, T.T. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. **J. Androl.** v.6, n.1, p.65-72, 1985.

TURNER, T. T.; BROWN, K. J.: Spermatoc cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. **Biol. Reprod.**, v.49, n. p.401-407, 1993.

TURNER, T. T.; TUNG, K. S.; TOMOMOSA, H.; WILSON, L. W. Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. **Biol. Reprod.**, v. 57, n.6, p.1267-1274, 1997.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.** v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

UGURALP, S.; KARABULUT, A. B.; MIZRAK, B.; KAYMAZ, F.; KIZILTAY, A.; HASIRCI, N. The effect of sustained and local administration of epidermal growth factor on improving bilateral testicular tissue after torsion. **Urol. Res.**, v. 32, n. 5, p. 323 -331, 2004.

UGURALP, S.; MIZRAK, B.; BAY-KARABULUT, A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. **Eur. J. Pediatr. Surg.**, v. 15, n. 2, p. 114-119, 2005.

UZ, E.; SOGUT, S.; SAHIN, S.; VAR, A.; OZYURT, H.; GULEC, M.; AKYOL, O. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. **World J. Urol.**, v.20, n.4, p.264-270, 2002.

VAN JAARVELD, H.; KUYL, J. M., DE WET; E. H., ALBERTS, D. W.; VAN DER WESTHUIZEN, F. D. Effect of various mixtures of diethylether, halothane, nitrous oxide and oxygen on low molecular weight iron content and mitochondrial function of the rat myocardium. **Free Rad. Res. Commun.** v.15, n.3, p.151-157, 1991.

VARMA, R.K.; KAUSHAL, R.; THOMAS. G.P.; JUNNARKAR, A.Y.; SINGH, P.P.; TRIPATHI, R.M. Evaluation of dimethyl sulfoxide as a solvent in pharmacological experiments. **Ind. J. Exp. Biol.** V. 25, p. 758-760, 1987.

WALSH, T.R. ; RAO, P.N. ; MAKOWKA, L. ; STARZL, T.E. Lipid peroxidation is a nonparenchymal cell event with reperfusion after prolonged liver ischemia. **J. Surg. Res.**, v. 49, n. 1, p. 18-22, 1990.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K. U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. **FEBBS Lett.**, v. 187, v.1, p. 33-37, 1985.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; BORDIN, A. L. B.; CREZCYNSKI-PASA, T. B.; BOVERIS, A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia–reperfusion injury. **Mol. Aspects Med.**, v.25, p. 199–210, 2004.

WRIGHT, J.E. Torsion of the testis. **Br. J. Surg.**, v. 64, p.274-276, 1977.

ZHANG, K.; YANG, E. B.; TANG, W.Y.; WONG, K.P.; MACK, P. Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. **Biochem. Pharmacol.**, v. 54, n. 9, p. 1047-1053 ,1997.

APÊNDICE A – AMOSTRA: Peso dos animais (g)

Grupo Simulado (GS)			
T-0	T-1	T-3	T-6
200	192	190	157
180	174	155	192
160	180	180	187
196	150	171	184
180	200	175	190
180	173	183	170

Grupo Controle (GC)			
T-0	T-1	T-3	T-6
175	171	190	186
200	195	190	170
168	160	176	160
190	173	180	187
185	164	170	190
160	189	180	190

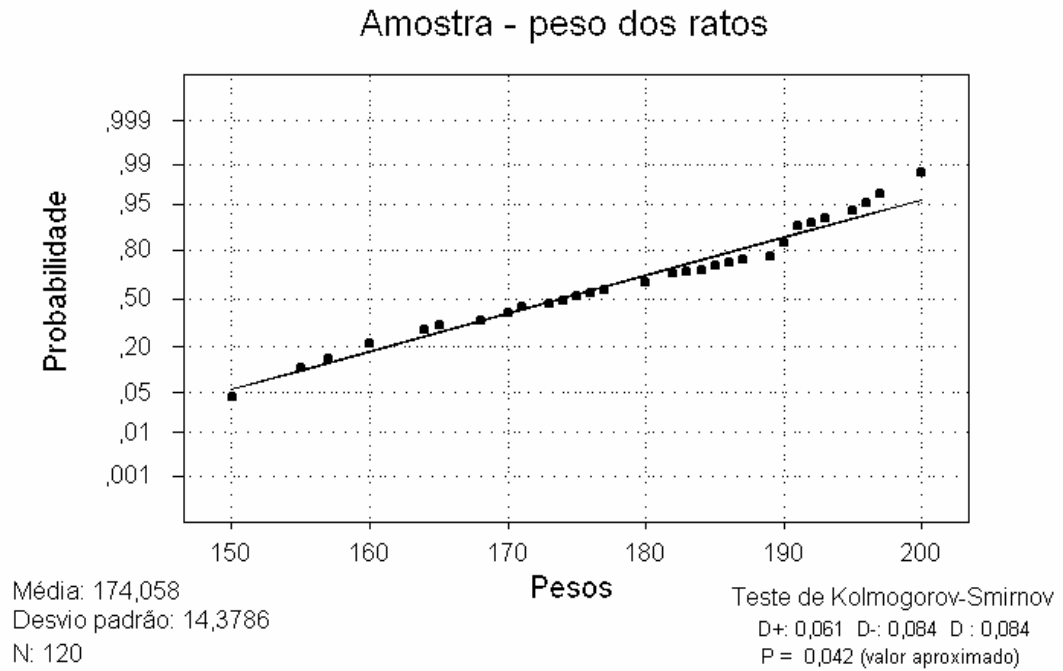
Grupo DMSO (GD)			
T-0	T-1	T-3	T-6
177	170	189	185
150	193	173	184
191	190	180	180
160	155	197	182
197	190	155	174
189	182	180	176

Grupo Ácido lipóico (GA)			
T-0	T-1	T-3	T-6
150	180	160	150
160	160	160	165
155	190	185	155
165	155	170	175
165	170	175	160
150	170	150	160

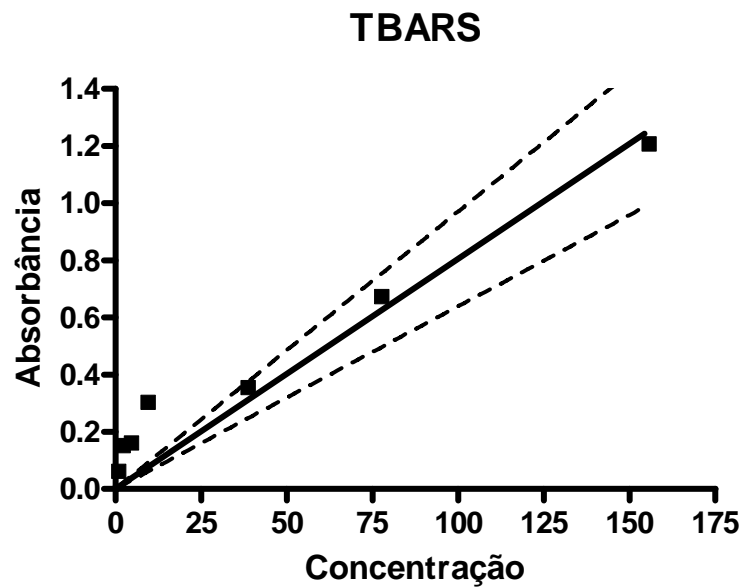
Grupo Ternatina/DMSO (GT/D)			
T-0	T-1	T-3	T-6
190	160	175	185
150	165	190	165
165	150	170	170
165	160	160	195
160	155	180	195
160	150	150	190

APÊNDICE B - Peso dos animais

TESTE DE KOLMOROGOV-SMIRNOV

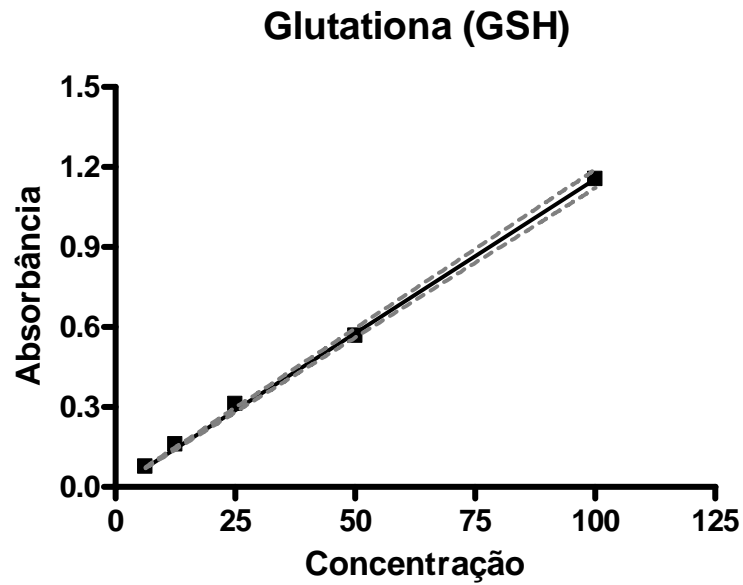


APÊNDICE C - Curva Padrão para cálculo da concentração de malonaldeído (MDA)



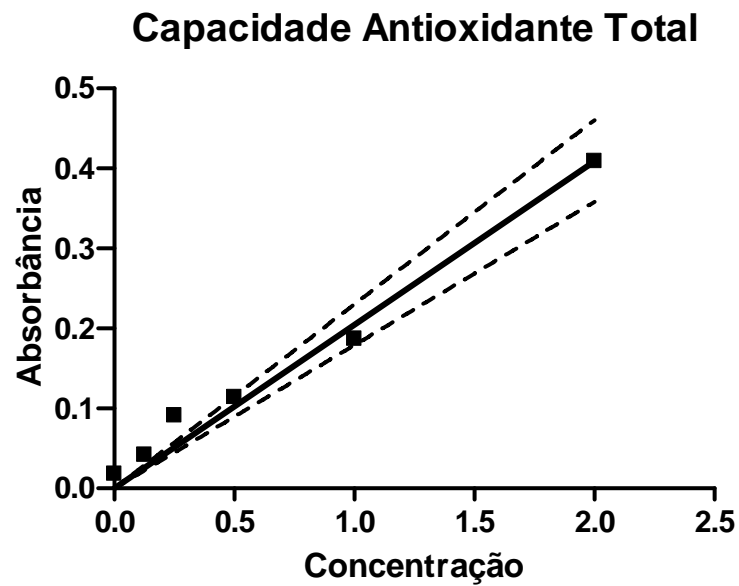
Absorbância	
Best-fit values	
Slope	0.008049 ± 0.0006774
Y-intercept when X=0.0	0,0000
X-intercept when Y=0.0	0,0000
1/slope	124,2
95% Confidence Intervals	
Slope	0.006392 to 0.009707
Goodness of Fit	
Sy.x	0,1212
Is slope significantly non-zero?	
t	11,88
DF	6,000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	7
Number of missing values	0

APÊNDICE D - Curva Padrão para cálculo da concentração de GSH



Absorbância	
Best-fit values	
Slope	0.01156 ± 0.0001251
Y-intercept when X=0.0	0,0000
X-intercept when Y=0.0	0,0000
1/slope	86,50
95% Confidence Intervals	
Slope	0.01121 to 0.01191
Goodness of Fit	
Sy.x	0,01443
Is slope significantly non-zero?	
t	92,44
DF	4,000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

APÊNDICE E - Curva Padrão para cálculo da Capacidade Antioxidante Total do plasma



Absorbância	
Best-fit values	
Slope	0.2046 ± 0.009933
Y-intercept when X=0.0	0,0000
X-intercept when Y=0.0	0,0000
1/slope	4,888
95% Confidence Intervals	
Slope	0.1790 to 0.2301
Goodness of Fit	
Sy.x	0,02293
Is slope significantly non-zero?	
t	20,60
DF	5,000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	6
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	6
Number of missing values	0

APÊNDICE F - DADOS BRUTOS (1)

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{molMDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Simulado - GS (SHAM) -
TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-0	T-1	T-3	T-6
14,7839	16,0262	24,5984	19,2563
8,9449	32,6737	20,8714	19,8775
17,2686	21,6168	19,0078	17,8897
14,7839	15,6535	19,8775	22,1137
22,2379	17,0210	23,9772	21,2441
7,7025	23,8530	21,2441	22,1137

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{molMDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Controle - GC (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)
TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-0	T-1	T-3	T-6
22,4864	45,8609	34,9099	24,8469
16,2747	45,9668	35,1583	28,3254
19,6290	40,7489	30,1890	33,1706
35,4068	31,9282	26,2135	26,8346
32,9221	38,6369	36,7734	33,7918
38,1400	38,6369	28,5739	49,6938

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{molMDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Dimetilsulfóxido - GD (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)
TRATAMENTO: DIMETILSULFÓXIDO

T-0	T-1	T-3	T-6
7,0813	9,3175	14,2869	7,4540
9,0691	13,6658	6,3821	15,7777
7,8267	17,2686	15,5293	14,7839
7,0813	5,5905	14,7839	18,2624
7,5783	10,1872	6,8573	4,3821
9,0691	4,9693	16,8959	15,9020

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{molMDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Ácido lipóico - GA (ISQUEMIA/REPERFUSÃO) -
TRATAMENTO: ÁCIDO LIPÓICO

T-0	T-1	T-3	T-6
5,466	6,336	9,815	7,330
6,336	8,448	13,417	6,212
6,336	6,336	7,206	11,305
7,952	6,833	10,063	7,703
7,081	5,963	5,094	6,336
6,709	5,591	6,584	6,957

DADOS BRUTOS (2)

CONCENTRAÇÕES DE **TBARS** ($\mu\text{molMDA/g}$ tecido fresco) NO TESTÍCULO
Grupo Ternatina/DMSO – GT/D (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)

TRATAMENTO: TERNATINA

T-0	T-1	T-3	T-6
1,0311	0,0373	0,1491	0,3354
0,7081	0,2236	0,1242	0,1118
0,4721	0,0870	0,1733	0,1739
0,4224	0,0870	0,1491	0,1242
0,0870	0,1988	0,1567	0,0994
0,0621	0,1118	0,1118	0,2112

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol/g}$ TECIDO FRESCO) NO TESTÍCULO
Grupo Simulado – GS - (SHAM)

TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-0	T-1	T-3	T-6
32,3260	98,9070	139,3383	89,1668
68,0429	99,1925	104,4432	94,4175
72,4891	54,8599	83,5009	81,7449
56,3997	129,0618	75,3351	80,0408
88,3191	108,4483	104,6854	82,7916
47,1958	145,5665	72,9736	87,2897

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol/g}$ TECIDO FRESCO) NO TESTÍCULO
Grupo Controle - GC (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)

TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA

T-0	T-1	T-3	T-6
5,6832	23,3384	6,9548	6,9375
6,1763	15,8646	26,6514	3,9791
11,2280	11,3751	17,4043	13,8750
28,7794	5,3718	24,6446	19,3420
16,6690	21,5478	12,0239	22,1793
23,8834	25,9940	6,2974	14,4805

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol/g}$ TECIDO FRESCO) NO TESTÍCULO
Grupo Dimetilsulfóxido - GD (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)

TRATAMENTO: DIMETILSULFÓXIDO

T-0	T-1	T-3	T-6
24,8435	60,5604	81,6584	95,3258
34,2464	91,7792	96,9694	51,2095
71,4079	86,7015	77,6793	69,7211
45,7339	71,5117	72,1431	79,0633
72,1431	62,3424	101,3810	65,5689
59,6868	63,4150	76,7278	82,9560

DADOS BRUTOS (3)

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol/g}$ TECIDO FRESCO) NO TESTÍCULO
Grupo Ácido lipóico - GA (ISQUEMIA/REPERFUSÃO) -

TRATAMENTO: ÁCIDO LIPÓICO

T-0	T-1	T-3	T-6
77,4198	97,3154	105,4466	83,8210
64,6174	63,4929	41,4347	112,2803
83,9940	87,6271	62,9739	108,3877
77,2468	97,9209	80,2744	82,8694
66,4340	68,9425	101,8135	105,5331
66,1745	50,3445	64,7904	29,5839

CONCENTRAÇÕES DE **GSH** ($\mu\text{mol/g}$ TECIDO FRESCO) NO TESTÍCULO
Grupo Ternatina/DMSO - GT/D (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)

TRATAMENTO: TERNATINA

T-0	T-1	T-3	T-6
95,3258	40,5697	45,9329	38,4936
51,2095	36,3311	52,0745	44,5488
69,7211	37,0231	23,3557	53,6316
79,0633	45,8464	27,6808	28,1133
65,5689	47,4034	30,4489	33,2170
82,9560	31,9194	36,4176	13,3214

DADOS BRUTOS (4)

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA

Grupo Simulado – GS - (SHAM)**TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA**

T-0	T-1	T-3
608,65	643,40	805,58
597,07	840,33	585,48
851,91	631,82	620,23
307,47	724,49	481,23
562,31	539,15	678,15
608,65	608,65	736,07

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA

Grupo Controle - GC (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)**TRATAMENTO: SOLUÇÃO SALINA**

T-0	T-1	T-3
736,07	666,57	759,24
724,49	701,32	724,49
608,65	828,74	631,82
701,32	793,99	898,25
631,82	689,74	631,82
840,33	712,90	527,56

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA

Grupo Dimetilsulfóxido - GD (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)**TRATAMENTO: DIMETILSULFÓXIDO**

T-0	T-1	T-3
736,07	817,16	539,15
608,65	631,82	608,65
666,57	979,33	840,33
666,57	805,58	701,32
747,66	990,92	643,40
759,24	643,4	701,32

DADOS BRUTOS (5)

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA
Grupo Ácido lipóico - GA (ISQUEMIA/REPERFUSÃO) -
TRATAMENTO: ÁCIDO LIPÓICO

T-0	T-1	T-3
608,65	817,16	597,07
770,82	933,00	608,65
643,40	736,07	817,16
608,65	840,33	608,65
782,41	921,41	823,90
747,66	944,58	678,15

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA
Grupo TERNATINA/DMSO – GT/D (ISQUEMIA/REPERFUSÃO)
TRATAMENTO: TERNATINA

T-0	T-1	T-3
539,15	1384,77	736,07
851,91	1153,09	608,65
840,33	898,25	666,57
701,32	861,94	666,57
643,4	1315,27	747,66
701,32	851,91	759,24

ANEXO A – Estudos experimentais

AUTOR (ES)	ENZIMAS E DROGAS ESTUDADAS
Bergh, Damber e Marklund, 1988	Superóxido dismutase e catalase (seqüestradores de radicais livres)
Blank et al., 1993	Deferoxamina (quelante do ferro) e Diltiazem (antagonista dos íons de cálcio)
Akgür et al.,1994a; Prillaman e Turner, 1997	Alopurinol (inibidor específico da enzima xantina oxidase)
Turan et al., 1996	Vitamina E (protetora das membranas biológicas)
Prillaman e Turner, 1997	Catalase, superóxido dismutase (seqüestradores de radicais livres) e verapamil (bloqueador dos canais de cálcio)
Palmer et al. (1997)	CV-6209 (Antagonista do fator de ativação plaquetária)
Palmer, Cromie e Lee, 1998	Tetronic 1107 (surfactante não iônico)
Dokucu et al.,2000; Ozukutan et al., 2000	N-monometil-L-arginina e L-arginina (Inibidores do óxido nítrico)
El-Missiry, 1999	Vitamina C (mantem a atividade dos antioxidantes presentes no tecido, reduzindo o estresse oxidativo)
Shiraishi, Naita e Yoshida, 2000	Acetil-leucil-leucil-norleucinal (Inibidores das calpaínas e da caspase)
Greenstein, Schreiber e Matzkin, 2001	Azul de metileno (C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S.3H ₂ O - antagonista específico da produção de óxido nítrico)
Abes et al., 2001	ATP-MgCl₍₂₎ (Adenosina trifosfato - cloreto de magnésio)
Uz et al., 2002	CAPE (Cafeato de feniletila - C ₁₇ H ₁₆ O ₄) - inibidor da enzima xantina oxidase
Savas et al.,2002	Pentoxifilina (inibidor não específico das fosfodiesterases)
Bozlu et al., 2003	Poly(ADP-ribose) nicotimamida (inibidora da polimerase)
Abasiyanik e Dagdonderen, 2004	Melatonina (neuro-hormônio produzido pela glândula pineal e potente seqüestrador de radicais livres)
Ozkan et al., 2004	Aspartato de zinco (seqüestrador de radicais livres e inibidor das enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase)
Romeo et al., 2004	IRFI-016 (2,3-dihidro-5-hidroxi-4,6,7-trimetil-2-ácido benzofuranacético) Análogo hidrofílico da vitamina E, seqüestrador de radicais livres e protetor da membrana plasmática
Uguralp et al., 2004	Fator de crescimento epidermal (reduz a intensidade das lesões de isquemia /reperfusão em diversos tecidos)
Adivarekar e Bhagwat, 2005	Lomodex-MgSO₄ (dextran de baixo peso molecular, polímero da glicose, melhora a microcirculação, restaurando a oxigenação dos tecidos.
Avlan et al., 2005	Selênio (reduz os efeitos da lesão de isquemia/reperfusão)
Uguralp, Mizrak e Karabulut (2005)	Resveratrol (antioxidante natural, extraído da uva: trans-3,4',5- trihidroxiestilbeno)

QUADRO 1 – Drogas e enzimas utilizadas na prevenção das lesões oxidativas no testículo submetido à torção/destorção do cordão espermático. Estudos experimentais

ANEXO B - O rato como animal de experimentação

Pesquisador (es)	Ano	Aspectos estudados
Turner	1985	Histologia do testículo (T/D)
Bauche, Fouchard e Jegou	1994	Estresse oxidativo
Baker e Turner	1995	Alterações endócrinas (T/D)
Peltola, Huhtaniemi e Ahotupa	1995	Estresse oxidativo
Agarwal; Ikemoto; Loughlin	1997	Lesão testicular induzida por cloreto de cádmio (Estresse oxidativo)
Turner et al.	1997	Apoptose (T/D)
Abul et al.	2002	Estresse oxidativo no testículo de ratos cirróticos
Ahmed et al., 2000	2000	Lesões mitocondriais (T/D)
Guimaraes e Vasconcelos,	2002	Alterações metabólicas na fosforilação oxidativa do testículo (T/D)
Ozkan et al..	2004	Estresse oxidativo (T/D)
Boran e Ozkan	2004	Histologia do testículo (Trauma)
Unsal et al.	2004	Estresse oxidativo (T/D)
Uguralp et al.	2004	Estresse oxidativo (T/D)
Avlan et al.	2005	Estresse oxidativo (T/D)
Adivarekar et al.	2005	Estresse oxidativo (T/D)

T/D – torção/destorção do cordão espermático

QUADRO 3– Utilização do rato como animal de experimentação no estudo das lesões testiculares

ANEXO C - Tempo de isquemia e o tipo de antioxidante utilizado por diferentes pesquisadores (1988 a 2004).

Pesquisador(es)	Duração da torção (h)	Antioxidante usado	Efeito
Bergh et al., 1988	3	SOD + catalase	-
Greenstein et al., 1992	3	Deferoxamina e diltiazem	-
Akgür et al., 1994	3	Alopurinol	+
Turan, Küçükaydin e Bekereciöglul (1996)	3	Vitamina E	-
Romeo et al. (2004)	3	Análogo da Vitamina E	+
Greenstein, Schreibe e Matzkin (2001)	3	Azul de metileno	-
Ozukutan et al. (2000)	4	N-monometil-L-arginina	-
Palmer et al. (1998)	4	Tetronic 1107	
Akgür et al., 1994	5	Alopurinol	+
Blank et al., 1993	6	deferoxamina e diltiazem	-
Dokucu et al., 2000	6	L-metil ester arginina,	-
Abasiyanik e Dagdonderen (2004)	6	Melatonina	+

(-) – ausência de efeitos protetores

(+) - proteção contra a lesão de isquemia/reperfusão

Quadro 4 – Duração da isquemia e resultados do tratamento com antioxidantes na torção experimental do testículo, em ratos

**ANEXO D – Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)
- Declaração –**



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 4009-8338 Fax (85) 4009-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 14/02, sobre o projeto intitulado “Efeitos do pré-tratamento com dimetilsulfóxido, ácido lipóico ou tertanina sobre o estresse oxidativo em ratos jovens submetidos à torção do cordão espermático”, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA em reunião realizada em 06 de outubro de 2005.

Fortaleza, 11 de outubro de 2005

A handwritten signature in black ink, reading 'Gisela Costa Camarão'. The signature is fluid and cursive.

Profª. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

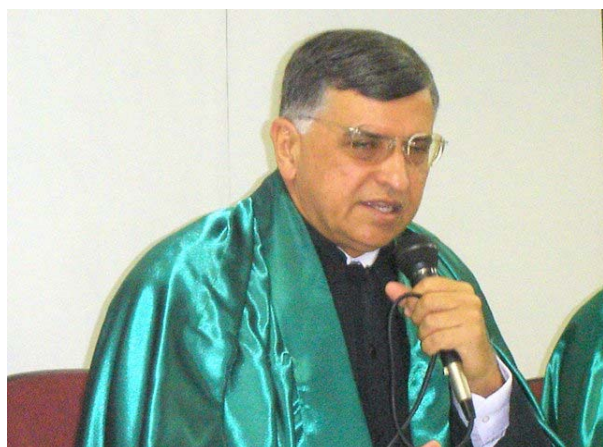
Banca - Defesa de Doutorado – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia (Universidade Federal do Ceará)



Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
(UFC) Orientador



Prof.ª Dr.ª Lydia Masako Ferreira
(UNIFESP)



Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
(UFC – Pró-Reitor de Pós-Graduação)



Prof. Dr. Rodrigo Dornfelt Escalante
(Faculdade Integrada do Ceará - FIC)



Prof. Dr. João Ximenes Aragão Filho
(Universidade Estadual do Ceará - UECE)



Doutorando Sérgio Botelho Guimarães
(Universidade Federal do Ceará - UFC)



Banca Examinadora – 4ª. Defesa de Tese de Doutorado – Departamento de Cirurgia – Universidade Federal do Ceará – Início dos trabalhos



Banca Examinadora – 4ª. Defesa de Tese de Doutorado – Departamento de Cirurgia – Universidade Federal do Ceará – Conclusão dos trabalhos