

GUADALUPE DE CARVALHO XAVIER

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR
COM SELÊNIO + VITAMINA “E” EM CAPRINOS
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO ESCROTAL**

RECIFE-PERNAMBUCO

Fevereiro/2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR
COM SELÊNIO + VITAMINA “E” EM CAPRINOS
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO ESCROTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof^a Dr^a M^a Madalena Pessoa Guerra

RECIFE-PERNAMBUCO

Fevereiro/2007

Catálogo na fonte
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

X3e Xavier, Guadalupe de Carvalho
Efeito da suplementação alimentar com selênio +
vitamina “E” em caprinos submetidos à insulação escrotal.

Guadalupe de Carvalho Xavier. -- 2007.
76 f.

Orientadora : Maria Madalena Pessoa Guerra
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Uni -
versidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de
Medicina Veterinária.
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 636.390 824

1. Selênio
 2. Vitamina E
 3. Insulação escrotal
 4. Espermatogênese
 5. Caprino
- I. Guerra, Maria Madalena Pessoa
II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM
SELÊNIO + VITAMINA “E” EM CAPRINOS
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO ESCROTAL**

Dissertação de Mestrado elaborada por

Guadalupe de Carvalho Xavier

Aprovada em : 27/02/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE

Orientadora

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo/UNESP

Prof. Dr^ª Elizabeth da Silveira Neves /UFPE

Prof. Dr. Rômulo José Vieira/UFPI

A Deus, que esteve sempre presente nos momentos mais difíceis, onde encontrei forças para motivar e superar os obstáculos em busca de um futuro próspero.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, iluminando e abrindo meus caminhos, sobretudo mostrando que as dificuldades existem para serem superadas, favorecendo o amadurecimento espiritual e emocional;

Aos meus Pais, por terem me dado a vida e proporcionarem a minha chegada à vida acadêmica;

Aos meus irmãos, Yaponira e Dostiewsky, pela paciência dispensadas;

À Prof^a Dr^a Maria Madalena Pessoa Guerra, pela oportunidade, atenção, infinita compreensão, exemplo de garra e respeito;

Aos Professores Dr. Pierre Soares Castro e Dr. Valdomiro Amaro da Silva Júnior, pela dedicação, paciência, atenção, disponibilidade, ensinamentos e colaboração imprescindível à concretização deste trabalho;

Aos meus queridos colegas do ANDROLAB (Laboratório de Andrologia/UFRPE), pelo acolhimento e companheirismo dispensados;

À colega Andréa Fernandes de Souza, pela dedicação, conhecimentos e momentos compartilhados, sua participação foi essencial para a execução desse estudo;

Aos amigos Ana Cristina Marinho Maymone, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior e Sandra M. de Torres, pelo esforço, dedicação e companheirismo dispensados;

À amiga Annita Ducastell, colega de trabalho, com quem pude contar nos momentos de angústias, de conquistas e de alegrias proporcionados pela vida;

Ao meu companheiro Jorge Guilherme, pela compreensão e paciência dispensadas nos momentos mais difíceis desta caminhada;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, nas pessoas da Prof.^a Dr^a Áurea Wischral e da secretária Edna Cherias, pela atenção e compreensão;

À INTEGRAL Agroindústria LTDA, por ter cedido e permitido o uso de seu produto em nossa experimentação;

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudo durante a realização do mestrado;

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse sonho.

RESUMO

Objetivando verificar o efeito da suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E (Selevit E[®]) nos parâmetros testiculares e seminiais de caprinos submetidos a estresse térmico induzido por insulação escrotal (IE), utilizou-se 12 animais com idade variando entre 7 e 8 meses, os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (G1= Controle; G2= Selênio e Vitamina E - Selevit E), passando por um período de adaptação de 60 dias, período no qual os animais foram submetidos a duas colheitas de sêmen e pesados a cada sete dias para correção alimentar de dieta de manutenção e correção da suplementação para o G2. Antes de serem colocadas as bolsas para IE, realizou-se a mensuração da circunferência escrotal dos animais de ambos os grupos. Animais de ambos os grupos foram induzidos a IE durante 18 dias, período no qual foram submetidos a duas colheitas de sêmen, uma anterior à IE (0d), uma ao término da IE (18d) e quatro no período PIE (7, 21, 35 e 42d). Ao término da IE, sortearam-se aleatoriamente três animais de cada grupo para orquiectomia bilateral, mantendo-se a suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E nos animais restantes do G2. A dieta de manutenção foi fornecida para ambos os grupos por mais 42 dias, correspondendo à fase de pós IE (PIE), no final do qual os animais restantes de G1 e G2 também foram orquiectomizados para registro de parâmetros biométricos e volumétricos do parênquima testicular, onde os testículos direito e esquerdo, assim como o epidídimo direito e esquerdo, foram pesados e preparados para posterior análise biométrica e histométrica. As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de eletroejaculação. O grupo de animais que recebeu Selênio e Vitamina E teve média significativamente maior de circunferência escrotal ao término da IE, enquanto que o grupo controle apresentou-se mais suscetíveis aos efeitos degenerativos da IE. O tempo de IE teve efeito significativo sobre as características quanti-qualitativas do sêmen nos animais de ambos os grupos (G1 e G2), com redução dos parâmetros avaliados (MIP, vigor, concentração espermática, integridade de DNA e de acrosoma), exceto o volume seminal. Da mesma forma, observou-se lesões compatíveis com degeneração testicular nos animais orquiectomizados de ambos os grupos. No entanto, constatou-se diferença significativa para os parâmetros biométricos e volumétricos do parênquima testicular apenas para o parâmetro vaso sanguíneo nesse mesmo período. Em contrapartida, a concentração sérica de testosterona aumentou significativamente ao término da IE e diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) entre os grupos. Durante o período PIE (42d PIE) não foi observado efeito de tratamento nos parâmetros seminiais, mas constatou-se efeito de dias. No entanto, ao término do período PIE os parâmetros seminiais apresentaram-se, em média, com valores próximos aos valores antes da IE. Os parâmetros biométricos e volumétricos do parênquima testicular, ao término do período PIE, evidenciaram diferença significativa para os parâmetros de túbulo seminífero, epitélio seminífero, diâmetro tubular e altura de epitélio. Pode-se observar também variação significativa entre os grupos para a concentração sérica de testosterona. Conclui-se que o suplemento com Selênio e Vitamina E não previniu ou reverteu os efeitos provocados pela técnica de insulação escrotal. Entretanto, a continuação desta suplementação, 42 dias após término da IE, acelerou a recuperação do processo espermatogênico em caprinos.

Palavras-chave: Insulação escrotal, Selevit E, Parâmetros espermáticos, Parâmetros biométricos, histomorfometria, testículos, caprino.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the effect of diet supplementation with Selenium and Vitamin E (Selevit E®) on the testis and seminal parameters of goats induced to scrotal insulation, it were used 12 animals with age varying between seven and eight months, distributed randomly in two groups (G1= Control; G2= Selenium and Vitamin E) and submitted to adaptation period of 60 days. In this period the animals were submitted to two semen harvests and weighted each seven days to supplement and diet correction on the G2 animals. Before putting the testis plastic bags to SI, it was measured scrotal circumference of all animals. Animals of both groups were induced to SI during 18 days, period of which they were submitted to six semen harvests, one before SI (0d), one at the finish of SI (18d) and four on the post-insulation period (PSI). At the end of SI, it was chosen randomly three animals of each group to be submitted to bilateral orchietomy. The G2 animals have diet supplementation with Selenium and Vitamin E during this period. The maintenance diet was offered to both groups during 42 days, corresponding to post-scrotal insulation (PSI). At the end of this period, the animals of G1 and G2 groups also were orchietomized to have biometric and volumetric testis parameters, where left and right testis as well as left and right epididymis were weighted and prepared to biometric and histometric analyses. The semen harvests were done by eletroejaculation method. The Seleniun and Vitamin E group animals have significantly high scrotal circumference at the end of SI, whereas the Selenium and Vitamin E group had values significantly higher of scrotal circumference at the end of SI, whereas the Control animals were more sensitive to degenerative effects of the SI on the same period. The SI time had significant effect on the quanti-qualitative characteristics of the semen on the animals of both groups (G1 and G2), with reduction of the evaluated parameters (PM, vigor, sperm concentration, acrosoma and DNA integrity), except to semen volume. At the same way it was observed damages like testis degeneration on orchietomized animals of both groups. However, there was significant difference on the biometric and volumetric parameters of testis parenchyma only to blood vessel volume at this period. In contrast, the serum testosterone concentration increased highly at the end of SI and differed between groups ($P < 0.05$). During the PSI period (36d PSI) there was no treatment effect on the seminal parameters, but it was observed day effect. However, at the end of PSI period the seminal parameters have values close to basal day (0d). The biometric and volumetric parameters of testis parenchyma, at the end of PSI period, have significant difference on the seminiferous tubules and seminiferous epithelium, as well as on the tubular diameter and epithelium height of goats induced to scrotal insulation. It was observed also significant variation between groups to serum testosterone concentration. It can be concluded that the supplementation with Selenium and Vitamin E did not prevent drastic alterations caused by scrotal insulation technique. However, the continuous supplementation, 36 days after the end of SI, accelerated the spermatogenic recuperation process on goats.

Keywords: Scrotal insulation, Selevit E, sperm parameter, biometric parameter, histomorphometry, testis, goat.

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Efeito da temperatura nos testículos.....	11
2.2 Proteínas do choque térmico.....	12
2.3 Testosterona.....	13
2.4 Espécies de oxigênio reativo (ROS)	14
2.5 Antioxidantes.....	16
2.6 Selênio e Vitamina E.....	18
3 EXPERIMENTOS.....	21
3.1 Efeito da suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos induzidos à insulação escrotal	22
3.2 Efeito da suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros testiculares e teor sérico de testosterona de caprinos induzidos à insulação escrotal.....	37
4 REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A competitividade em que o sistema agroindustrial da caprino-ovinocultura se insere no agronegócio brasileiro, identificando conflitos e potencialidades, destaca a importância social e econômica da exploração destas espécies. Embora até pouco tempo atrás esta atividade não fosse significativa em relação à pecuária nacional, hoje constitui uma alternativa econômica viável e sustentável para diversificar a produção, principalmente para pequenos e médios criadores. Os caprinos e ovinos possuem grande capacidade de adaptação às condições ambientais (NOGUEIRA FILHO e KASPRZYKOWSKI, 2006).

O Semi-Árido brasileiro possui duas estações do ano diferenciadas quanto à ocorrência de precipitações pluviométricas, sendo uma chuvosa (inverno) e uma seca (verão). A precipitação pluviométrica anual média é de 650 mm e a temperatura média varia entre 22,2 e 36,6 °C, caracterizando um clima quente e semi-árido (ARAÚJO FILHO, 1992).

A eficiência reprodutiva do rebanho é um dos pontos primordiais do sistema produtivo, porém os problemas relacionados à menor capacidade de resistência, adequação a diferentes manejos, como nutricional e reprodutivo, ainda não foram completamente desvendados. No âmbito da reprodução, considerando os índices produtivos e reprodutivos, uma das hipóteses que poderia explicar a menor fertilidade dos caprinos criados nas condições adversas do semi-árido nordestino seria a ocorrência do estresse térmico nos testículos.

O estresse oxidativo é definido como o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são capazes de danificar as estruturas de DNA, carboidratos, lipídios, proteínas e componentes celulares. A função molecular das células é afetada pelo processo de oxidação que determina degeneração, alterando a atividade biológica essencial para a função celular. Os efeitos prejudiciais da oxidação devem ser evitados, sendo primordial a compreensão do funcionamento das ROS envolvidas no processo de homeostase celular, assim como a ocorrência de fatores patológicos (SILVA, 2006).

As implicações da biologia das ROS são importantes para diversos aspectos da vida moderna, desde a indústria alimentícia, impedindo a oxidação de alimentos, a áreas de ciências médicas, tais como neurologia, cardiologia e, mais recentemente, a reprodução, tornando cada vez mais claro que o processo de oxidação celular está relacionado com o processo de infertilidade (SILVA, 2006).

Na espécie caprina, não se tem encontrado referências bibliográficas sobre o efeito de temperaturas elevadas e suplementação alimentar com antioxidantes como Selênio e Vitamina E, apesar do interesse comercial e científico nesta espécie. Assim, estudos nesta área podem incrementar a eficiência reprodutiva dos caprinos submetidos às elevadas temperaturas do Nordeste brasileiro, principalmente de raças exóticas importadas de outros continentes.

O Selênio e a Vitamina E, dois elementos quimicamente diferentes, com propriedades antioxidantes individuais, possuem a mesma função no sistema biológico. A Vitamina E impede a formação de hidroxiperóxidos e a subsequente peroxidação da glutationa-peroxidase, a qual é selênio dependente (UNDERWOOD e SUTLLE, 1999).

É evidente que a deficiência de Selênio e Vitamina E, além da óxido-redução que é um processo normal que acomete de forma diversificada os tecidos do organismo animal, é tema de interesse da comunidade científica na elaboração de produtos que sejam capazes de suprir as deficiências, bem como minimizar os efeitos adversos do estresse oxidativo através da suplementação destes nutrientes na dieta de diversas espécies. Com base na utilização destes nutrientes na dieta de caprinos criados em regiões do semi-árido nordestino, onde o estresse térmico incide fortemente sobre os testículos e, conseqüentemente, sobre a espermatogênese, pesquisas são requeridas para a melhor compreensão da resposta do animal aos efeitos adversos causados pela elevada incidência de estresse térmico nos testículos.

Objetivou-se com este trabalho estudar o efeito da suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E sobre a qualidade espermática e a histomorfometria do parênquima testicular de caprinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Efeito da temperatura nos testículos

Em regiões tropicais próximas à linha do Equador, onde não há variação da luminosidade diária, não ocorrem diferenças estacionais na produção espermática dos machos de raças nativas (CHEMINEAU, 1986; HIBBERT et al., 1986). Nessas áreas, as variações quanti-qualitativas do ejaculado de caprinos parecem estar condicionadas a outros fatores mais importantes do que o fotoperíodo, tais como a temperatura ambiente (NUNES et al., 1988; MACHADO et al., 2000). Pesquisas têm demonstrado que elevadas temperaturas ambientais podem interferir negativamente na qualidade espermática de ruminantes, sendo a motilidade individual progressiva e o porcentual de células morfológicamente anormais as características seminais mais afetadas (KRAEMER, 2000; MARTINS et al., 2003; CHEMINEAU, 2004; VALLE et al., 2005).

O tempo necessário para a formação dos espermatozoides, a partir de espermatogônias, é de 58 a 60 dias na espécie caprina (SANTOS e SIMPLÍCIO, 2000) e o período de permanência destes espermatozoides no epidídimo é de 13 a 15 dias (SWIERSTRA, 1968). Estudo realizado com carneiros Santa Inês criados no Estado do Ceará e submetidos à insulação escrotal, demonstrou que o tempo necessário para o aparecimento de padrões normais de concentração espermática foi de 79 dias, indicando que o estresse térmico interferiu nos primeiros estágios da espermatogênese, provavelmente nas fases de multiplicação das espermatogônias e no início da meiose (MOREIRA et al., 2001), corroborando com os relatos de Yin et al. (1997), ao verificarem apoptose em espermátides e espermatócitos de ratos e camundongos expostos a temperaturas elevadas.

Recentemente mostrou-se que, em resposta ao estresse térmico, a degeneração das células germinativas ocorre através da morte celular programada (apoptose) caracterizada pela fragmentação de DNA (TAPANAINEM et al., 1993; BILLING et al., 1995; MIEUSSET et al., 1995). Neste processo, o Fator 1 da transcrição do choque térmico é ativado, induzindo apoptose de espermatócitos, resultando em infertilidade de ratos (NAKAI et al., 2000).

A degeneração do epitélio seminífero pode ocorrer rapidamente e, se o período em que os testículos são submetidos à temperatura elevada não for muito longo, a

recuperação completa pode ocorrer em um período curto de tempo, apresentando melhora 60 dias após a remoção do agente causal (McENTEE, 1990). Nos insultos severos, em que a espermatogônia A é atingida, pode ocorrer azoospermia (FONSECA e CHOW, 1995). No entanto, a regeneração do epitélio germinativo é possível e dependerá da sobrevivência das espermatogônias e das células de Sertoli. Se não for possível a regeneração, pode-se instalar fibrose ou calcinose nos testículos (THOMSON, 1990; McENTEE, 1990). A fase regenerativa é marcada por recuperação da concentração, da motilidade, do vigor e do número de espermatozóides morfológicamente normais, que, apesar da desorganização do epitélio germinativo durante a fase de degeneração, demonstra grande capacidade de recuperação devido à resistência das espermatogônias e das células de Sertoli (BARTH, 1993; FONSECA e CHOW, 1995; GABALDI, 2000).

Medidas testiculares estão associadas com produção espermática diária (OSINOWO et al., 1992; SOUZA e COSTA, 1992), número de espermátides por células de Sertoli e área dos túbulos seminíferos, além de apresentarem relação inversa com a taxa de degeneração de células germinativas em touros (BERNDTSON et al., 1987; PALASZ et al., 1994; MOURA e ERICKSON, 1997). Assim, a diminuição da consistência do parênquima testicular está associada à redução na produção de espermatozóides (COULTER e FOOTE, 1979) e ao aumento do número de espermátocitos e espermátides degeneradas em todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero em touros (MULLER et al., 1992).

Diversos tipos de estresse metabólico, como exposição ao calor, a metais pesados, a ingestão de dietas acrescidas de ionóforos, a análogos de aminoácidos e a venenos que afetam a produção de ATP, determinam alterações na expressão de genes que resultam em acúmulo de proteínas de choque térmico (HSP).

2.2 As proteínas de choque térmico (HSPs)

As HSPs formam um grupo diversificado de proteínas encontradas em bactérias, plantas e animais (SHARP et al., 1999), classificadas em seis famílias de acordo com seu peso molecular: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e pequenas HSPs, dentre estas a HSP27 (JOLLY e MORIMOTO, 2000). Estas proteínas podem ser constitutivas ou induzíveis, sendo encontradas nos mais diferentes compartimentos da célula. As proteínas HSP90 e HSP60 são constitutivas, enquanto que a HSP70 e a

HSP27, além de serem constitutivas, também são induzíveis por estresses como calor, estresse oxidativo, isquemia, etc. (SHARP et al., 1999; GARRIDO et al., 2001; VALENTIM et al., 2001; 2003).

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

A HSP27, pequena proteína de choque térmico, protege vários tipos celulares contra o estresse (KATO et al., 1995; 2001) e sua atividade pode ser regulada através do aumento de sua expressão em condições estressantes e da fosforilação (MEHLEN et al., 1996; MEHLEN et al., 1997; BRUEY et al., 2000a). A HSP70, assim como a HSP27, também possui ação antiapoptótica em situações de estresse celular (GARRIDO et al., 2001). A HSP105, proteína do choque térmico, específica das células germinativas (ITOH e TASHIMA, 1990; 1991), é transportada do citoplasma para o núcleo da célula após dois dias de transferência do testículo da bolsa escrotal para a cavidade abdominal de ratos. Esta proteína liga-se a p53 em células cultivadas dos testículos sob temperatura semelhante àquela da bolsa escrotal (32,5 °C), fato que não ocorre quando submetidos a 37 ou 42 °C (KUMAGAI et al., 2002). Outras proteínas do choque térmico (HSP 27 e 90) encontradas nas células de Sertoli, em espermatogônias, em espermatócitos e em espermátides, também apresentaram concentrações elevadas e moveram-se do citoplasma ao núcleo em células isoladas dos testículos de ratos submetidos à temperatura de 37 a 42 °C (BIGGIOGERA et al., 1996).

2.3 Testosterona

Redução das secreções hormonais apresenta efeito negativo na produção e na maturação de células germinativas normais (HUTSON et al., 1997). Alguns estudos indicam que a diminuição da concentração de testosterona causa apoptose nas células germinativas testiculares, especialmente nas células haplóides (TROIANO et al., 1994), tornando a esteroidogênese desordenada durante alguns meses (GENDREL et al., 1980). A exposição do animal a elevadas temperaturas por período prolongado causa redução nas concentrações plasmáticas de testosterona, ocorrendo aumento desta

concentração após um período curto de adaptação (SETCHELL, 1998; GABALDI, 2000).

As células intersticiais ou de Leydig, localizadas fora dos túbulos seminíferos, estão sob o controle de LH e secretam andrógenos, dos quais o mais importante é a testosterona. As células de Sertoli são o componente não germinativo dos túbulos seminíferos, localizadas entre a membrana basal e o lúmen, e envolvem as células germinativas em inúmeros grupos. Dentre as funções da célula de Sertoli está a secreção de mais de 100 proteínas, como a proteína transportadora de andrógenos (ABP), que tem como função principal o transporte extracelular de testosterona até o local da espermatogênese. No entanto, o controle da espermatogênese é realizado tanto pelo FSH quanto pela testosterona (DE KRETZER et al., 1988; WINTER, 1990; DADOUNE et al., 1993).

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

2.4 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

As ROS possuem um elétron não pareado e se comportam como moléculas altamente reativas (HICKS, 2001), podendo causar danos por reações com as diversas biomoléculas, subtraindo elétrons para conseguir sua estabilidade. Os substratos moleculares mais frequentemente utilizados são os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, nucleotídeos do DNA, além de proteínas e carboidratos (VILARROJAS et al., 1996; BECKMAN e AMES, 1998).

Dentre as principais ROS destacam-se o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (-OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último é a ROS mais envolvida em danos de espermatozóides equino (BAUMBER et al., 2000) e, em virtude de não possuir elétrons livres, não é considerada um radical livre. No entanto, é uma molécula

bastante reativa e pode ser precursora de radicais -OH na presença de metais de transição (HICKS e MEDINA-NAVARRO, 1995; HICKS, 2001). A reação inicial de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados é denominada de peroxidação lipídica e é produzida pelas ROS através de uma reação em cadeia (MEDINA-NAVARRO et al., 1997; WANG et al., 2001).

As ROS podem se formar a partir de moléculas estáveis mediante ruptura homolítica e reações de transferência de elétrons. Estas reações ocorrem por absorção de energia ionizante, como radiações ionizantes, ultravioleta e térmica; reação redox de transferência não enzimática de elétrons no caso de reações catalisadas por metais de transição; e reações catalisadas por enzimas, como a superóxido dismutase que catalisa a formação de H₂O₂ (HICKS, 2001).

Fisiologicamente, as ROS são formadas durante a respiração mitocondrial e as anomalias na mitocôndria podem contribuir para a sua produção excessiva (AL-ABDULLA e LEE, 1998; THANNICKAL e FANBURG, 2000; YVES, 2000).

Embora as ROS representem um dos mecanismos de defesa do organismo durante uma infecção, causando a lise bacteriana, tem-se demonstrado que o excesso na sua produção causa danos aos organismos vivos devido ao estresse oxidativo (HICKS, 2001). Este tipo de estresse tem sido definido como um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os mecanismos antioxidantes dos organismos, que envolvem sistemas enzimáticos e moléculas orgânicas diversas, onde se incluem algumas vitaminas, como a vitamina E e a vitamina C (HERNÁNDEZ-ALVARADO et al., 1995; FREI, 1999).

Na fisiologia espermática normal, as ROS cumprem uma função importante, porém o desequilíbrio entre a produção e a degradação causa efeitos adversos sobre o espermatozóide (BALL et al., 2001 a). Assim, acredita-se que a produção de ROS pode ser benéfica ou prejudicial para a função espermática. Sendo considerada benéfica pelo fato de que a peroxidação leve promove a capacitação e a ativação espermática, atuando como interruptor na tirosinaquinase e determinando hipermotilidade induzida pelo ânion O₂⁻, e aumento na afinidade pela zona pelúcida. No entanto, o estresse oxidativo causado pelo aumento excessivo da produção de ROS é prejudicial quando a peroxidação resulta em dano espermático (GADELLA et al., 2001).

A interação do radical -OH com o material genético modifica o DNA, podendo determinar mutação e depreciação da molécula. Os radicais livres têm sido associados a diversos processos, como a indução de apoptose neuronal por dano oxidativo *in vitro* e *in vivo* (AL-ABDULLA e LEE, 1998).

Danos dos fosfolipídios da membrana e do DNA em espermatozóides humanos são causados pelas ROS e estão envolvidos com a infertilidade masculina. A produção de ROS e o dano de DNA são maiores em espermatozóides imaturos, havendo retenção de citoplasma e anormalidades morfológicas da cabeça espermática (OLLERO et al., 2001). A peroxidação lipídica determinada pela ROS provoca redução da motilidade, da integridade acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial, resultando em perda da viabilidade espermática (BAUMBER et al., 2000).

O estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 reduz o funcionamento mitocondrial e determina morte celular programada (LIU et al., 2000). Todavia, a interrupção da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons predispõe à formação de ROS (HICKS, 2001). Em espermatozóides humanos, o H_2O_2 determina elevada fragmentação do DNA, além de reduzir sua motilidade e sua capacidade de fusão com os ovócitos (AITKEN et al., 1998). A peroxidação lipídica é um exemplo de dano oxidativo em membranas celulares, lipoproteínas e outras estruturas que contêm lipídios. Esta peroxidação ocorre em diversos processos degenerativos (GIROTTI, 1998).

A dinâmica da membrana plasmática dos espermatozóides tem papel importante nos processos de maturação, capacitação e fecundação (WOLFE et al., 1998; MÜLLER et al., 1999). No entanto, uma das principais causas de deteriorização espermática é o estresse oxidativo que causa peroxidação lipídica da membrana plasmática, modificando sua fluidez e permeabilidade, o que pode conduzir a célula a um processo de morte celular (BATELLIER et al., 2001).

Os espermatozóides submetidos à rápida congelação ou aqueles morfológicamente anormais produzem uma quantidade maior de ROS do que os espermatozóides morfológicamente normais (BALL et al., 2001a). A presença de leucócitos no ejaculado também é uma fonte importante de produção de ROS no sêmen humano, que, em grandes quantidades, podem provocar diminuição da capacidade fecundante. Em eqüinos, tem-se comprovado que a incubação de sêmen com 5×10^6 neutrófilos/mL aumenta a geração de H_2O_2 e reduz a motilidade espermática *in vitro* (BAUMBER et al., 2002b).

2.5 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que apresentam função biológica e reduzem ou previnem a oxidação do substrato, resultando em um agente redutor mais potente

(HICKS, 2001). Assim, visando minimizar a peroxidação lipídica, tem-se estudado o efeito da adição de diversos tipos de antioxidantes aos diluentes espermáticos. Em carneiro, tem-se analisado os sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e citocromo C líquido) com o objetivo de melhorar a motilidade e a integridade acrossomol do espermatozóide (MAXWELL e STOJANOV, 1996).

Os espermatozóides encontrados no epidídimo são protegidos da ação das ROS que podem prejudicar o complexo processo de maturação (HINTON et al., 1995; TRAMER et al., 1998). De acordo com Tramer et al. (1998), esta proteção é determinada principalmente pela presença de cinco enzimas: glutathione peroxidase (GPx), fosfolipídio hidropéroxido glutathione peroxidase (PHGPx), glutathione reductase (GR), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Enquanto as enzimas intracelulares SOD, CAT e GR inibem o dano oxidativo (BOREK, 2001).

No sêmen humano, as concentrações de catalase e de superóxido dismutase têm sido avaliadas, uma vez que a astenospermia está relacionada à diminuição da concentração de antioxidantes no ejaculado (SICILIANO et al., 2001). Em ejaculado humano, as mitocôndrias dos espermatozóides contêm grandes quantidades de PHGPx, uma das principais enzimas que previne a peroxidação causada pelo H_2O_2 . A diminuição das concentrações desta enzima nos espermatozóides do homem está associada com infertilidade (IMAI et al., 2001).

O sistema endógeno de defesa antioxidante reduz a toxicidade molecular de O_2 e das espécies reativas de nitrogênio (RNS). Entre as moléculas antioxidantes se tem mencionado repetidamente a melatonina, que é um eficiente inibidor de ROS, embora, sob certas circunstâncias, também apresente ação pró-oxidante (GUZMÁN-GRENFELL et al., 1999). A melatonina inativa radicais altamente reativos, como é o caso do radical-OH, 1O_2 (oxigênio singlet), H_2O_2 , NO, e o ânion peroxinitrito. Além de estimular diversas enzimas antioxidantes (EL-SOKKARY et al., 1999; REITER, 2000).

O sistema de defesa antioxidante exógeno derivado dos componentes da dieta compreende as vitaminas E e C, o β -caroteno (TRIBBLE, 1999), o retinol e os carotenóides, que são poderosos antioxidantes (SCHUNEMAN et al., 2001). A vitamina C e, especialmente, a vitamina E diminuem o grau de peroxidação lipídica. Nos últimos dez anos, a função celular antioxidante do vitamina E tem sido amplamente investigada (AZZI et al., 2000).

Os compostos como os carotenóides e a vitamina E são antioxidantes lipofílicos

da dieta que protegem as lipoproteínas plasmáticas contra a oxidação (DUGAS et al., 1998; TRIBBLE, 1999; SCHUNEMANN et al., 2001). Os carotenóides possuem propriedades benéficas, uma vez que parecem prevenir enfermidades cardiovasculares e o câncer. No entanto, existem poucos dados dos efeitos antioxidantes em humanos que consomem vegetais ricos em carotenóides (BUB et al., 2000). A modificação oxidativa do DNA, das proteínas e dos lipídios causadas por ROS participa dos mecanismos de envelhecimento e das enfermidades crônico-degenerativas (BOREK, 2001). Estudos epidemiológicos indicam que as frutas e os vegetais são promotores da saúde e protegem contra enfermidades, devido ao seu efeito antioxidante (EASTWOOD, 1999).

A vitamina E possui impacto na prevenção de enfermidades crônicas e acredita-se que este efeito esteja associado à redução do estresse oxidativo (UPRETI et al., 1997; BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999; UPSTON et al., 1999; CARR et al., 2000a). A vitamina E pode atuar como um antioxidante ou pró-oxidante, já que inibe ou facilita a peroxidação lipídica das lipoproteínas de baixa densidade. A atividade pró-oxidante da vitamina E é prevenida pelo ascorbato, porque a vitamina E só pode ser efetiva em combinação com a vitamina C (CARR et al., 2000b). A combinação da vitamina E, um antioxidante lipofílico, com a vitamina C ou selênio, são capazes de atenuar as ações deletérias dos peróxidos (SCHWENKE e BEHR, 1998).

Em pacientes inférteis, os antioxidantes reduzem os danos ao DNA (KODMA et al., 1997). A vitamina E inibe significativamente o efeito negativo do aquecimento dos testículos durante 21 dias, enquanto a adição de vitamina C não determinou alteração significativa. Em ratos submetidos ao criptorquidismo unilateral, a adição de vitamina E foi ineficiente em prevenir a redução do peso dos testículos (CUI et al., 2006).

2.5.1 Selênio e Vitamina E

Durante muitos anos o Selênio foi mais considerado pelo ponto de vista de sua toxicidade para os animais. Todavia, hoje este elemento é considerado muito mais importante sob o aspecto de sua essencialidade, sendo necessário para o crescimento e a fertilidade dos animais e para a prevenção de várias condições mórbidas características, algumas das quais respondem também, de certo modo, à terapia com vitamina E, como necrose hepática dos ratos e suína, diátese exsudativa e fibrose pancreática das aves, hepatose dietética e microangiopatia dos suínos, e distrofia muscular (doença do músculo branco) em cordeiros, bezerros, potros e outras espécies animais. Todos estes

distúrbios patológicos são acompanhados de alterações bioquímicas no sangue e nos tecidos, particularmente nas concentrações subnormais de selênio e GPx, enzima de cuja molécula o selênio é parte integrante (ROSA, 1993).

Segundo Noguchi et al. (1973), a vitamina E atua como antioxidante lipossolúvel na membrana celular, enquanto o Selênio age como componente da enzima GPx, que atua reduzindo os peróxidos formados.

Dentre as alterações produzidas pela deficiência dietética de selênio, incluem-se aquelas que afetam a reprodução. Em todas as espécies animais, a deficiência do Se ocasiona algum tipo de desordem reprodutiva em machos e fêmeas (ROSA, 1993).

Em ovinos com deficiência em Se verifica-se elevada mortalidade embrionária entre a 3ª e a 4ª semana após a concepção, correspondendo ao tempo de implantação do embrião, e considerada como causa de infertilidade em regiões da Nova Zelândia (HARTLEY, 1963).

No Brasil, não existem muitos trabalhos sobre a deficiência de Se nas pastagens, mas há indicações de que este pode ser um problema importante para bovinos sob pastejo em regiões de solos mais pobres. Lucci et al. (1984b) realizaram um levantamento dos níveis de selênio em pastagens e alimentos concentrados de várias regiões do Estado de São Paulo nos períodos de seca e chuva. Na maioria das amostras de pasto analisadas, o teor de Se estavam em concentrações baixas ou muito baixas, sendo os valores consistentemente mais elevados no período das chuvas. Lucci et al. (1984a) mostraram níveis reduzidos de selênio em 78% das 1.973 vacas avaliadas, com elevada correlação entre a baixa concentração de Se no sangue dos animais e na pastagem.

Outros trabalhos brasileiros reportaram efeitos positivos da administração de selênio, associado ou não à vitamina E, na redução de placentas retidas e outras patologias ligadas à fertilidade dos rebanhos (ZANETTI et al., 1985; SANTIAGO, 1986a; 1986b).

A função do Se é mediada através de proteínas que contêm o Se como um resíduo da selenocisteína (ZACHARA, 1992). Diversas selenoproteínas são conhecidas, como a selenoproteína P e a glutathiona peroxidase do hidróperóxido de fosfolípido (PHGPx). Nível elevado da expressão da selenoproteína P foi observado nos testículos (BURK et al., 1994), enquanto a PHGPx foi encontrada em quantidades elevadas nas células espermatogênicas dos testículos de ratos. Uma quantidade considerável de Se foi localizada na peça intermediária do espermatozóide (BROWN et al., 1973).

A secreção de testosterona estimulada por LHRH foi mais baixa em ratos com deficiência em Se (BEHNE et al., 1987). Assim, o Se parece estar associado à espermatogênese. A Selenoproteína P é encontrada no plasma e acredita-se ser uma proteína-chave, uma vez que mais de 60% do Se do plasma de rato, segundo Read et al., 1990, foi encontrado incluído nesta proteína. Em ratos, a proteína foi purificada pela cromatografia de imunoafinidade (YANG et al., 1987). A selenoproteína P parece servir de agente extracelular de defesa oxidante, como é o caso da GPx que contém também uma selenocisteína no local ativo (ROTRUCK, 1981; BURK et al., 1995).

Para ruminantes, o selênio é encontrado em diversos alimentos, como forragens, cereais e leguminosas. Seu teor varia amplamente dependendo da espécie de forragem, parte das plantas e período do ano, além do *status* do selênio do solo (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

A forma dominante de selênio nos alimentos é a selenoproteína, juntamente com outras de menor proporção, como a selenocisteína e selenito. Os ruminantes absorvem o selênio menos eficientemente e mais variavelmente do que os monogástricos. A ingestão de selênio afeta dramaticamente a atividade das glutatonas em diferentes componentes corpóreos e também na distribuição destas enzimas pelo corpo. Neste contexto, a atividade da glutatona eritrocitária aumenta em razão logarítmica em relação à ingestão deste nutriente pelos animais (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

O requerimento mínimo de selênio para uma determinada espécie varia de acordo com a forma química do selênio ingerido ou com a composição da dieta, mas particularmente se esta está associada à vitamina E (GRACE et al., 1994). Os requerimentos de selênio para pequenos ruminantes varia de 0,1 a 0,3 mg/Kg/MS (McDOWELL, 1999; UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). No entanto, de acordo com o NRC (1983), os requerimentos de selênio variam entre 0,05 a 0,3 mg/Kg/MS, dependendo da forma química do elemento, da condição prévia do selênio no organismo animal e da presença na dieta de fatores que interferem ou favorecem a atuação do selênio, tais como a vitamina E, enxofre, lipídios, proteínas, aminoácidos e outros nutrientes. Existe uma interrelação nutricional complexa entre o selênio e a vitamina E, uma vez que um pode alterar ou reduzir o requerimento do outro, sem, contudo, ser capaz de substituí-lo completamente (McDOWELL, 1999).

Entretanto, quando ingerido em excesso, o selênio pode desencadear a seleniose resultante da ingestão de forrageiras com teores de selênio superiores a 3 mg/Kg/MS da dieta dos ruminantes (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

3 EXPERIMENTOS

3.1 Efeito da suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos induzidos à insulação escrotal

(Effect of diet supplementation with Selenium and Vitamin E on the seminal parameters of goats induced to scrotal insulation)

G.C. Xavier¹, P.C. Soares², V.A. Silva Junior², A.C.M. Maymone³, M.M.P. Guerra²

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, UFRPE;

²Prof. Dr. do PPGCV, UFRPE; ³Graduanda em Medicina Veterinária, DMV, UFRPE.

Resumo

Objetivando-se avaliar o efeito da suplementação com Selênio e Vitamina E na dieta de caprinos submetidos à insulação escrotal sobre os parâmetros seminais, foram utilizados 12 animais com idade variando entre 7 e 8 meses, os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (G1= sem suplementação; G2 = suplementado com Selênio e Vitamina E). A suplementação foi feita por período de dois meses anterior à indução da insulação escrotal (IE). Ao término do período de adaptação, iniciou-se a IE com colocação de bolsas plásticas nos testículos, que teve duração de 18 dias. Após o término da IE, foi mantida a suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E para os animais do G2 por mais 42 dias, correspondendo à fase de pós-insulação (PIE). Foram efetuadas colheitas de sêmen em seis tempos: antes da IE, após 18 dias de IE e mais quatro colheitas com intervalo de seis dias (PIE), pelo método de eletroejaculação, para análise de concentração, motilidade individual progressiva (MIP), vigor e morfologia espermática, assim como integridade de acrossoma e de DNA. Não foi observado efeito da suplementação dietética com selênio e vitamina E sobre as características quantitativas do sêmen, porém efeito significativo foi observado em relação aos dias de colheita para ambos os grupos, com redução do MIP, vigor, concentração espermática, integridade do acrossoma e de DNA, exceto o volume seminal. Decorridos 42 dias da IE, observou-se normalidade de MIP, vigor espermático, integridade de acrossoma e de DNA. A temperatura elevada nos testículos de reprodutores caprinos submetidos à insulação escrotal altera fortemente os parâmetros seminais; a suplementação na dieta de caprinos com Selênio e Vitamina E, na concentração de 0,1mg/kg P.V., não é suficiente para minimizar os efeitos deletérios da insulação induzida.

Palavras-Chave: Parâmetros espermáticos, antioxidantes, dieta, caprino.

Abstract

Aiming to evaluate the effect of diet supplementation with Selenium and Vitamin E on the seminal parameters of the goats induced to scrotal insulation, there were used 12 animals with age varying between 7 and 8 months, which were distributed randomly in two groups (G1= Control; G2= Selenium and vitamin E). The supplementation was done during two month period before induction of scrotal insulation (SI). At the end of

adaptation period, it was began the SI with plastic bags on the testis during 18 days. After the end of SI, the supplementation with Selenium and vitamin E was maintained on the G2 animals more 42 days, corresponding to post-insulation phase. It was did semen harvests on six times: before SI, after 18 days of SI and 4 harvests with intervals of 6 days by eletroejaculation method to evaluate sperm concentration, progressive motility (PM), vigor and sperm morphology, as well as acrosoma and DNA integrity. There was no effect of the diet supplementation with Selenium and Vitamin E on the quanti-qualitative characteristics of the semen, however significant effect was observed on the harvest days to both groups G1 and G2, with reduction of PM, vigor, sperm concentration, acrosoma and DNA integrity, except to semen volume. After 42 days of SI, it was observed normal values to PM and sperm vigor, besides acrosoma and DNA integrity. The high temperature on the testis of goats submitted to SI alters highly the seminal parameters, and the diet supplementation of goats with Selenium and Vitamin E, on the concentration of 0.1mg/kg P.V., was no sufficient to minimize the deleterious effects of induced insulation.

Keywords: Sperm parameters, antioxidants, diet, goats.

1 Introdução

No Brasil, novas tecnologias têm sido utilizadas visando incrementar o nascimento de cabritos, como inseminação artificial, transferência de embriões, estação de monta programada, assim como importação de animais e embriões, resultando em sérias preocupações de ordem sanitária e genética. No caso de importação de animais, o problema se agrava em virtude das diferentes condições climáticas encontradas por estes animais na região nordeste, podendo comprometer o processo reprodutivo de machos e fêmeas e resultando em baixos índices reprodutivos e produtivos.

As variações estacionais provocam mudanças na atividade sexual dos machos e na produção quanti-qualitativa do sêmen através da interação de fatores como disponibilidade de alimentos, temperatura, fotoperíodo e atividade hipofisária (JENNINGS, 1976). Desta forma, a temperatura é freqüentemente um fator preocupante, uma vez que a intensidade do estresse térmico pode provocar falha nos mecanismos de termorregulação testicular, favorecendo a degeneração do epitélio seminífero e, conseqüentemente, a espermatogênese (SANTOS et al., 1998), produzindo elevação na porcentagem de espermatozoides anormais, reduzindo a motilidade e a concentração espermática, assim como o volume seminal (HULET e SHELTON, 1982).

Diversos fatores de estresse (exposição a calor, metais pesados, ingestão excessiva de ionóforos, análogos de aminoácidos e venenos) determinam alterações

similares na expressão de genes, levando ao acúmulo de proteínas de choque térmico (HSP). Além disso, a função das células é afetada pelo processo de oxidação que determina degeneração causada por espécies reativas de oxigênio (ROS), alterando a atividade biológica dos lipídios e das proteínas essenciais para a função celular. Tais efeitos prejudiciais da oxidação devem ser evitados, sendo essencial a compreensão do funcionamento das ROS envolvidas no processo de homeostase celular, assim como a ocorrência de fatores patológicos (SILVA, 2006). Nos testículos, estresse oxidativo tem sido observado em pacientes portadores de criptorquidismo (PELTOLA et al., 1995) ou varicocele (PASQUALOTTO et al., 2000), condições que provocam aumento da temperatura testicular inibindo os sistemas de defesa antioxidantes, reduzindo a concentração e a porcentagem de espermatozóides móveis no sêmen humano resultante da peroxidação lipídica da membrana celular (AZIZ et al., 2004).

A produção equilibrada de ROS e de enzimas antioxidantes está correlacionada com as funções fisiológicas (AITKEN, 1994; AITKEN e BAKEN, 2004). Todavia, a produção excessiva de ROS provoca redução da motilidade e da viabilidade dos espermatozóides, aumentando os defeitos dos espermatozóides e iniciando uma reação em cadeia de oxidação de proteínas, lipídios e DNA (AITKEN e BAKEN, 2004; SIKKA, 2004).

Na espécie caprina, não existe relatos associando o efeito de temperaturas elevadas à adição de antioxidantes na dieta, como Selênio e Vitamina E, sobre a eficiência reprodutiva dos reprodutores criados na região Nordeste. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos submetidos à insulação escrotal (IE).

2 Material e Métodos

2.1 Animais

Foram selecionados, após exame andrológico, 12 machos da espécie caprina, sem raça definida (SRD), adultos, com idade variando entre 7 e 8 meses. Administrou-se anti-helmíntico (Desofenol – IBASA 20%) para o controle de parasitos internos. Em seguida, os animais foram distribuídos por amostragem probabilística em dois grupos (G1= Controle; e G2= Selênio e Vitamina E) constituídos de seis animais cada. Todos os animais foram mantidos em regime de confinamento, sendo alimentados com feno

Tifton e suplementados com ração balanceada (farelo de milho e farelo de soja), além de ser fornecida água e sal mineral à vontade, no cocho. Durante o período de adaptação de 60 dias, todos os animais foram submetidos à pesagem semanal, objetivando-se manter a linearidade entre ganho de peso e dose recebida de Selênio e Vitamina E aos animais do G2. A quantidade ofertada de Selênio foi de 0,1mg/kg/PV, enquanto a Vitamina E foi de 0,3 UI/Kg/PV (Selevit E[®], INTEGRAL Agroindustrial LTDA). Os animais do G2 iniciaram a dieta com Selênio e Vitamina E dois meses antes da insulação escrotal (IE) e continuamente até o término do experimento. Os animais do G1 receberam apenas a dieta sem a referida suplementação.

2.2 Insulação escrotal

Após o período de adaptação (60 dias), todos os 12 animais foram submetidos à IE, com a colocação de bolsa plástica de polietileno de dupla parede, separadas por uma camada de algodão, de espessura aproximada de 5 mm, conforme modelo utilizado por Florentino et al. (2003). A fase de IE teve duração de 18 dias. No 18º dia, término da fase de IE, três animais de cada grupo também foram distribuídos por amostragem probabilística e submetidos à orquiectomia bilateral. Os três animais restantes de cada grupo tiveram continuidade na oferta das dietas por mais 42 dias, correspondendo ao período pós-insulação escrotal (PIE). O período experimental foi de 120 dias.

2.3 Colheita e análise de sêmen

Durante o período experimental, foram efetivadas seis colheitas de sêmen, sendo uma anterior à IE (0d), uma ao término da IE (18d) e quatro no período PIE (7, 21, 35 e 42d). As amostras de sêmen foram obtidas pelo método de eletroejaculação no período matinal e antes do recebimento das dietas. Em todos os caprinos, o sêmen foi colhido com, no máximo, três estímulos elétricos.

As amostras de sêmen foram acondicionadas em copos coletores devidamente identificados. Em seguida, o material foi encaminhado ao laboratório para análise. As variáveis consideradas foram: volume, concentração, motilidade individual progressiva, vigor e morfologia espermática, volume seminal, além de integridade de acrossoma e do DNA.

- Volume seminal

Medido em tubo coletor graduado em mL.

- Concentração espermática

Foi avaliada em Câmara de Neubauer (em bilhões de espermatozoides/mL), após diluição de uma alíquota de sêmen, na proporção de 1:200, em solução fisiológica formolizada a 1,00% (Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 1998).

- Motilidade Individual Progressiva (MIP) e Vigor Espermático

Avaliou-se a MIP (0,0-100,0%) e o vigor (0-5), de acordo com o Manual de Exame Andrológico do CBRA (1998), onde foram selecionados para este experimento animais cujos ejaculados apresentaram valores mínimos de 80,0% e 3, respectivamente.

- Morfologia Espermática

Utilizou-se o método de Câmara Úmida (MIES FILHO, 1987), onde foram analisadas 200 células espermáticas através de microscópio de contraste de fase (Zeiss, Germany) para determinação do percentual de espermatozoides morfológicamente normais.

- Integridade do Acrossoma

Usou-se a técnica de coloração Fluorescein isothiocyanate-conjugated agglutinin (FITC-PNA), utilizada por Roth et al. (1998). Inicialmente, alíquotas de 10µL de sêmen foram utilizadas para preparação de esfregaços, os quais foram armazenados a 4 °C e protegidos da luz até posterior análise. Um total de 200 espermatozoides/lâmina foi analisado usando microscópio de Fluorescência (Olympus, Germany) e classificado como: acrossoma intacto (AI), se o acrossoma apresentava-se corado em verde; acrossoma reagido ou danificado (AR), quando nenhuma coloração esteve presente ou quando observou-se apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da célula.

- Integridade do DNA

Foi realizada através da técnica de Laranja de Acridina, segundo Evenson et al. (1999). Descongelaram-se as alíquotas de amostra de sêmen (as quais encontrava-se em

tubos de microcentrífuga), em banho-maria a 37° C, da qual utilizou-se 50µL em tubo de microcentrífuga vazio devidamente identificado e conservado em gelo seco. Adicionou-se 100µL da solução ácida-detergente, permanecendo em gelo seco por 30 segundos. Em seguida, acrescentou-se 300µL da solução de Laranja de Acridina e homogeneizou-se. Colocou-se 5µL desta solução em lâmina, cobriu-se com lamínula e observou-se um total de 200 espermatozóide/lâmina, classificando-os como: Danificado (D) quando observado o espermatozóide de coloração laranja ou avermelhado, e Intacto (I), observando-se espermatozóide de coloração verde.

2.4 Análise estatística

O modelo estatístico utilizado para estudar cada uma das variáveis simultaneamente, sob efeito de dois grupos de tratamentos (sem e com suplementação com Selênio e Vitamina E) e intervalos de tempo de colheita de material biológico foi indicado por Sampaio (1998) como um delineamento em blocos casualizados.

A variável morfologia espermática foi avaliada através da análise descritiva dos resultados. Os demais parâmetros foram testados, inicialmente, quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados, que não atenderam a estas premissas, foram submetidos à transformação pela raiz quadrada [RQ (x+1)]. Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) que separou como causa de variação, o efeito de tratamentos e tempos de colheita e interação.

Foi aplicado o nível de significância (p) de 5%, e a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Student – Newman - Keuls foi utilizado para comparações de médias quando na presença de significância. Estatística de associação entre pares de variáveis foi realizada com a determinação do coeficiente de Pearson, segundo Sampaio (1998). Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2000).

3 Resultados

Não foi registrado efeito de tratamento para o conjunto de variáveis (MIP, vigor, concentração, integridade de acrossoma e DNA) do sêmen de caprinos submetidos à insulação escrotal e tratados ou não com Selenium e Vitamina E ($p \geq 0,1800$).

Em relação ao fator tempo de colheita, verificou-se que MIP ($p < 0,0001$), vigor ($p < 0,0001$), concentração ($p < 0,0001$), integridade do DNA ($p < 0,0018$) e integridade do acrossoma ($p < 0,0001$) alteraram no decorrer do período experimental, ou seja, ao término do período de insulação escrotal (IE) e no período pós-insulação escrotal (PIE). Não foi registrado efeito interativo entre tratamentos e tempos de colheita para o conjunto de variáveis ($p \geq 0,1204$).

Durante o período que compreende o término da insulação escrotal (18d IE), os valores médios de MIP, vigor, concentração e integridade do DNA foram menores ($p \leq 0,0138$) em relação ao momento anterior à IE (0d), enquanto que as menores médias de integridade do acrossoma só foram registradas 21 e 35 dias após o término da IE (Figura 1/Gráficos II, III, IV, V e VI). Todavia, o volume seminal dos animais não sofreu efeito de tratamento e tempos de colheita para ambos os grupos (Figura 1/Gráficos I).

No período PIE, aos 7, 21 e 35 dias, as médias de MIP, vigor e integridade do DNA mantiveram-se menores e semelhantes àquelas observadas no final do período de IE, enquanto que a concentração espermática manteve-se com menores médias até o 42 dias PIE em relação ao 0d.

Quarenta e dois dias PIE foram verificadas médias semelhantes ao dia 0, antes do início da IE para MIP, vigor, integridade do DNA e do acrossoma, em ambos os grupos (Figura 1/ Gráficos II, III, V e VI).

Com base na análise de relação entre pares de variáveis, verificou-se alto coeficiente de relação entre vigor x MIP ($r=0,91$), integridade do acrossoma x vigor ($r=0,75$), integridade de acrossoma x MIP ($r=0,65$), assim como entre concentração espermática x vigor ($r=0,72$), concentração espermática x MIP ($r=0,80$) e entre integridade do DNA e vigor ($r=0,60$), integridade do DNA x MIP ($r=0,63$) e integridade do DNA x integridade do acrossoma ($r=0,69$) (Figura 2).

O estudo da morfologia espermática evidenciou que as amostras de sêmen apresentaram 83,41 e 83,58% de células normais antes do período de insulação escrotal, respectivamente, para os animais dos grupos Controle (G1) e Selênio e Vitamina E (G2). Porcentuais pequenos de espermatozoides foram observados com cabeça estreita (4,42 e 5,8%), cabeça destacada (0,75 e 1,08%), gota citoplasmática proximal (0,66 e 0,58%), gota citoplasmática distal (4,83 e 1,50%), cauda dobrada (0,33 e 0,66%) e cauda enrolada (1,08 e 1,25%), respectivamente, para os animais dos grupos Controle e tratado com Selênio e Vitamina E. Após o término da insulação, constataram-se

oligozoospermia severa ou azoospermia em quatro animais do grupo Controle e quatro do grupo tratado com Selênio e Vitamina E. Nos animais em que foi possível avaliar a morfologia espermática, observou-se 26,5 % de células normais nos animais Controle e 65,0% naqueles tratados com Selênio e Vitamina E. As patologias mais observadas foram cabeças destacadas (63,5% e 13,5%) e caudas enroladas (7,00% e 11,50%), respectivamente para G1 e G2. Ao término do período de pós-insulação escrotal (PIE), a maioria dos animais ainda apresentava oligozoospermia, mas um animal de cada grupo (Controle e Tratado) apresentou células morfologicamente normais (81,5% e 78,00%, respectivamente).

4 Discussão

A redução dos valores de MIP, vigor, concentração e integridade de DNA e acrossoma, obtidos após o insulto térmico, considerando os valores observados no 0 dia de IE (início da insulação escrotal), corrobora com os relatos da literatura (WILDEUS e ENTWISTLE, 1983; BARTH, 1993; FONSECA e CHOW, 1995), ao evidenciarem que o aumento artificial de temperatura da bolsa escrotal altera os parâmetros quantitativos do sêmen, afetando a sua qualidade e, conseqüentemente, o poder fecundante dos espermatozóides. Da mesma forma, a oligozoospermia ou azoospermia observadas neste experimento após o término da IE foram relatadas anteriormente como resultado da hipertermia testicular, a qual está associada a redução da espermatogênese de animais domésticos (LÄGERLOF, 1983; BARTH, 1993), em que a espermatogônia A é atingida em estudo com touros zebu (FONSECA e CHOW, 1995), ou resultante da reabsorção de espermatozóides anormais no epidídimo, observado em carneiros Santa Inês (MOREIRA et al., 2001).

Esperava-se que a administração de Selênio e Vitamina E determinasse efeito positivo nos parâmetros seminais dos animais deste experimento, uma vez que esta vitamina age como antioxidante lipossolúvel e o Selênio como componente da enzima glutathione peroxidase, que atua reduzindo os peróxidos formados (NOGUCHI et al., 1973). Importante considerar que o estudo do perfil de indicadores de peróxidos no sêmen devem ser considerados em futuros trabalhos, visando compreender melhor os resultados obtidos após a adição de substâncias antioxidantes, assim como o uso de antioxidantes por um período maior após o término da IE.

Em situações de aumento de temperatura testicular, como realizado neste

experimento através da colocação de bolsa plástica na região escrotal, a proteína do choque térmico HSP 105, específica das células germinativas (ITOH e TASHIMA, 1990; 1991), assim como as HSP 27 e HSP 90, encontradas nas células de Sertoli, em espermatogônias, em espermatócitos e em espermátides, podem ter sido responsáveis por alterações das características quanti-qualitativas do sêmen, uma vez que em células isoladas dos testículos de ratos submetidos à temperatura de 37 a 42 °C, Biggiogera et al. (1996) observaram concentrações elevadas destas últimas proteínas (HSP 27 e 90). Todavia, dosagens de HSP não foram realizadas, devendo ser estudadas com maiores detalhes em futuros trabalhos.

A manutenção do volume do ejaculado durante o período de insulação nos animais de ambos os grupos (Controle e Selevit E[®]), antes e após a IE, corrobora com os achados de Moreira et al. (2001) em ovinos Santa Inês, e pode ser explicado pelo fato de que, neste experimento, foi utilizado o método de eletroejaculação para a colheita seminal, estimulando as glândulas seminais acessórias (PUGH, 2005), de maneira igual para os animais de ambos os grupos.

Ao término do período de pós-insulação (42 d PIE), pode-se observar que os valores de MIP, vigor e integridade de acrossoma apresentaram-se em fase de normalização, próximos àqueles encontrados antes da IE. Lagerlof (1983) e Barth (1993) observaram que, após a IE de quatro dias em *Bos tauros*, os resultados dos parâmetros seminais apresentaram-se normais após 42 dias do insulto térmico. Todavia, em carneiros Santa Inês, Moreira et al. (2001) observaram, após insulto térmico de 7 dias e 12 colheitas pós IE (em 118 dias), que a concentração espermática apresentou-se alterada 8 dias após o término da IE, somente se normalizando após 79 dias do PIE. Além disso, a MIP e o vigor apresentaram-se alterados logo no primeiro dia após o término de IE tendo seus valores próximos aos normais apenas 90 dias após o término de IE. Tendo em vista que a espermatogênese em caprinos apresenta duração média de 60 dias, este relato confirma os achados do presente experimento, demonstrando que o período de recuperação do insulto térmico é maior do que os 42 dias em que foram realizadas as avaliações dos parâmetros seminais dos animais, onde se constatou melhora significativa no MIP, no vigor e na integridade do acrossoma, mas a concentração espermática ainda apresentava valores reduzidos. No entanto, Florentino et al. (2003) concluíram que o desafio térmico escroto-testicular durante 18 a 30 dias em caprinos determina perda da qualidade do ejaculado com poucas possibilidades de recuperação.

Recentemente, demonstrou-se que, em resposta ao estresse térmico, a degeneração das células germinativas ocorre através da morte celular programada (apoptose) caracterizada pela fragmentação de DNA (TAPANAINEM et al., 1993; BILLING et al., 1995; MIEUSSET et al., 1995), por serem células termo-sensíveis em todos os estágios da espermatogênese, com o grau de lesão dependendo da extensão e da duração do insulto térmico. Por outro lado, a regeneração da função espermática, após o dano causado pelo calor, depende do intervalo de tempo do término da injúria à restauração de espermatozóides normais no ejaculado, correspondente ao período de início da diferenciação na espermatogênese até a ejaculação (WAITES e SETCHELL, 1990; SETCHELL, 1998). Neste experimento, observou-se que o percentual de células com DNA íntegros reduziu após o período de IE, mas somente evidenciou diferença estatística ($P < 0,05$) sete dias após o término do insulto térmico, onde apresentaram valores baixos até 35 dias PIE nos animais do grupo Controle e 42d PIE nos tratados com Selênio e Vitamina E, demonstrando que a suplementação alimentar com estes antioxidantes não auxiliaram na recuperação da integridade do material genético. Da mesma forma, os resultados deste experimento corroboram com aqueles obtidos por SUN et al. (1997) e LOPES et al. (1998), ao afirmarem que o sêmen de má qualidade apresenta-se com maior número de espermatozóides com DNA danificado. O estresse oxidativo decorrente da produção excessiva de ROS foi associado com a função defeituosa do espermatozóide e os mecanismos de princípio dos danos de DNA são mediados pelos radicais livres (LOPES et al., 1998).

O processo de degeneração testicular compromete a fertilidade dos reprodutores resultante da ocorrência de alterações na espermatogênese, determinando produção de espermatozóides anormais (NASCIMENTO e SANTOS, 1997), assim como oligozoospermia ou azoospermia que causam diminuição da qualidade do sêmen (FRASER e WILSON, 1966). Fato comprovado ao se avaliar o percentual de células espermáticas morfológicamente normais neste experimento, onde se observou que a injúria térmica afetou os animais de ambos os grupos, independente da suplementação com o Selênio e Vitamina E. Este fato pode ser explicado pelo elevado percentual de animais de ambos os grupos que apresentaram azoospermia ou oligozoospermia.

Conforme esperado, observou-se correlação entre pares de variáveis da qualidade do sêmen (MIP, vigor, concentração espermática, integridade de acrossoma e de DNA), refletindo o efeito quadrático compatível com o grau de injúria causada pela insulação escrotal e, ao longo do tempo, uma evolução satisfatória da função testicular.

5 Conclusões

A temperatura elevada nos testículos de reprodutores caprinos submetidos à insulação escrotal altera fortemente os parâmetros seminais, e que a suplementação na dieta de caprinos com Selênio e Vitamina E, na concentração de 0,1mg/kg P.V., não é suficiente para minimizar os efeitos deletérios da insulação induzida.

6 Referências

- AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. **Reprod. Fert. Dev.**, v. 6, p. 19–23, 1994.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 16, p. 581–588, 2004.
- AZIZ, N.; SALEH, R. A.; SHARMA, R. K., et al. Novel association between sperm reactive species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. **Fertil. Steril.**, v. 81, p. 349-354, 2004.
- BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Rev. Bras. Repr. Anim.**, v. 1, n. 4, p. 1-11, 1993.
- BIGGIOGERA, M.; TANGUAY, R.M.; MARIN, R. et al. Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. **Exp. Cell Res**, v. 229, p. 77-85, 1996.
- BILLING, H.; FURRUTA, I.; RIVIER, C. et al. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stage. **Endocrinology**, v. 136, p. 5-12, 1995.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 1039 – 1049, 1999.
- FLORENTINO, C.M.; REIS, J.C.; GUERRA, M.M.P. Efeito do tempo de insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de caprinos (*Capra hircus*, L.) sem raça definida. **Rev. Ciênc. Vet. Tróp.**, v. 6, n. 1, p. 39-45, 2003.
- FONSECA, V.O.; CHOW, L.A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 47, n. 5, p. 707-16, 1995.

- FRASER, A. F.; WILSON, J. C. Testicular calcinosis in domestic ruminantes. **Nature**, v. 210, n. 5035, p. 547, 1966.
- HULET, C. V.; SHELTON, M. **Ovinos e caprinos**. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed) Reprodução Animal, 4 ed. São Paulo: Manole, p. 397-411, 1982.
- ITOH, H.; TASHIMA, Y. A novel testis-specific 105-kDa protein related to the 90-kDa heat-shock protein. **Eur. J. Biochem.**, v. 193, p. 429–435, 1990.
- ITOH, H.; TASHIMA, Y. Different expression time of the 105-kDa protein and 90-kDa heat-shock protein in rat testis. **FEBS Lett.**, v. 289, p. 110–112, 1991.
- JENNINGS, J. J. Effect of season and meating frequency on semen characteristics in rams. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1, Kracow, **Anais...**, Kracow, p. 998-1001, 1976.
- LÄNGERLOF, N. Infertility in male domestic animals. **Vet. Med.**, v. 33, p. 550-561, 1983.
- LOPES, S.; JURIOSICOVAS, A.; SUN, J.G. et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 896-900, 1998.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), Minas Gerais, 2ª ed., 49 p., 1998.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais**. São Paulo: Ed. Sulina. 6ª edição, 1987, 750p.
- MIEUSSET, R.; BUJAN, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. **Int. J. Androl.**, v. 8, p. 169-184, 1995.
- MOREIRA, P.E.; MOURA, A..A.A.; ARAÚJO, A.A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês Criados no estado do Ceará. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 30, n. 6, 2001.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda. 1997,108 p.
- NOGUGHI, T.; CANTOR, A.H.; SCOTT, M.L. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. **J. Nut.**, v. 103, p. 1502-1511, 1973.
- PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R. et al. Relation between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertil. Steril.**, v. 73, p. 459-464,2000.

- PELTOLA, V.; HUHTANIEMI, I.; AHOTUPA, M. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 1146-1150, 1995.
- PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: ROCA Ltda. 2005, 513 p.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M.; WILT, D.E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998, 221p.
- SANTOS, D. O.; SIMPLICIO, A. A.; MACHADO, R. Características escroto testiculares e do ejaculado em bodes mestiços submetidos a insulação escrotal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 50, n. 3, p. 287-291, 1998.
- SETCHELL, B.P. The parkes lecture heat and the testis. **J. Reprod. Fertil.**, v. 114, p. 179-194, 1998.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **J. Androl.**, v. 25, p. 5-18, 2004.
- SILVA, P.F.N. **Physiology of peroxidation process in mammalian sperm**. 2006. 178 f. (Doutorado em Medicina Veterinária) – Utrecht University, Utrecht.
- SUN, J.G.; JURIOSICOVAS, A.; CASPER, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 6002-607, 1997.
- TAPANAINEM, J.S.; TILLY, J.L.; VIHKO, K.K. et al. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. **Mol. Endoc.**, v. 77, p. 643-650, 1993.
- WAITES, G.W.H.; SETCHELL, B.P. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G.E. **Marshall's physiology of reproduction**. 4ed., Edinburgh: Churchill Livingstone, v. 2, p. 1-105, 1990.
- WILDEUS, S.; ENTWISTLE, K.W. Spermogram and sperm reserves in hybrid *Bos indicus* X *Bos tauros* bulls after scrotal insulation. **J. Reprod. Fertil.**, v. 69, p. 711-6, 1983.

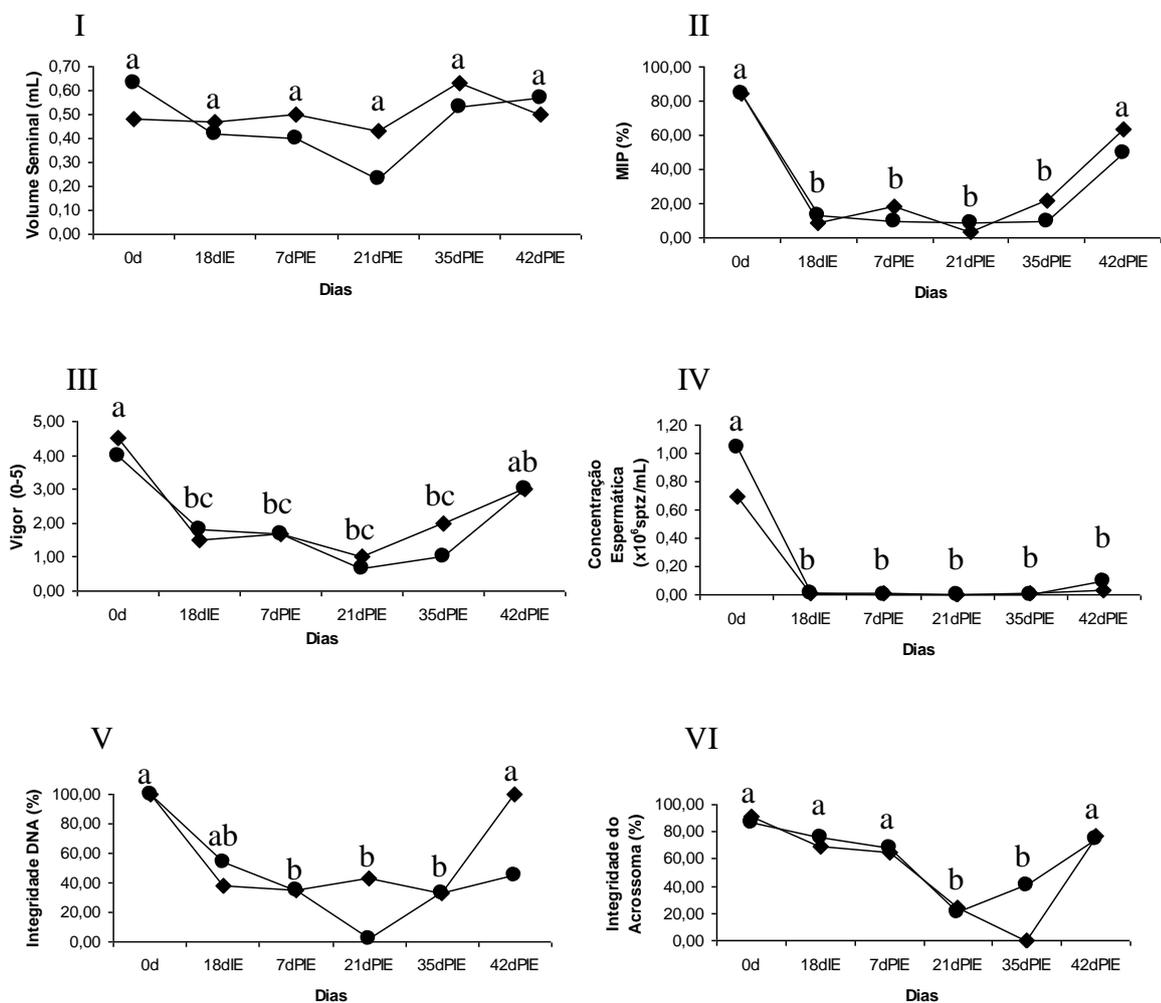


Figura 1 - Médias gerais de volume (I), MIP (II), vigor (III), concentração (IV) seminais e integridade do DNA (V) e integridade do acrossoma (VI) espermático antes e durante o período de insulação escrotal (IE) e no período pós-insulação escrotal (PIE), de caprinos submetidos à IE [sem antioxidante (●) e suplementados com Selênio e Vitamina E na dieta (◆)].

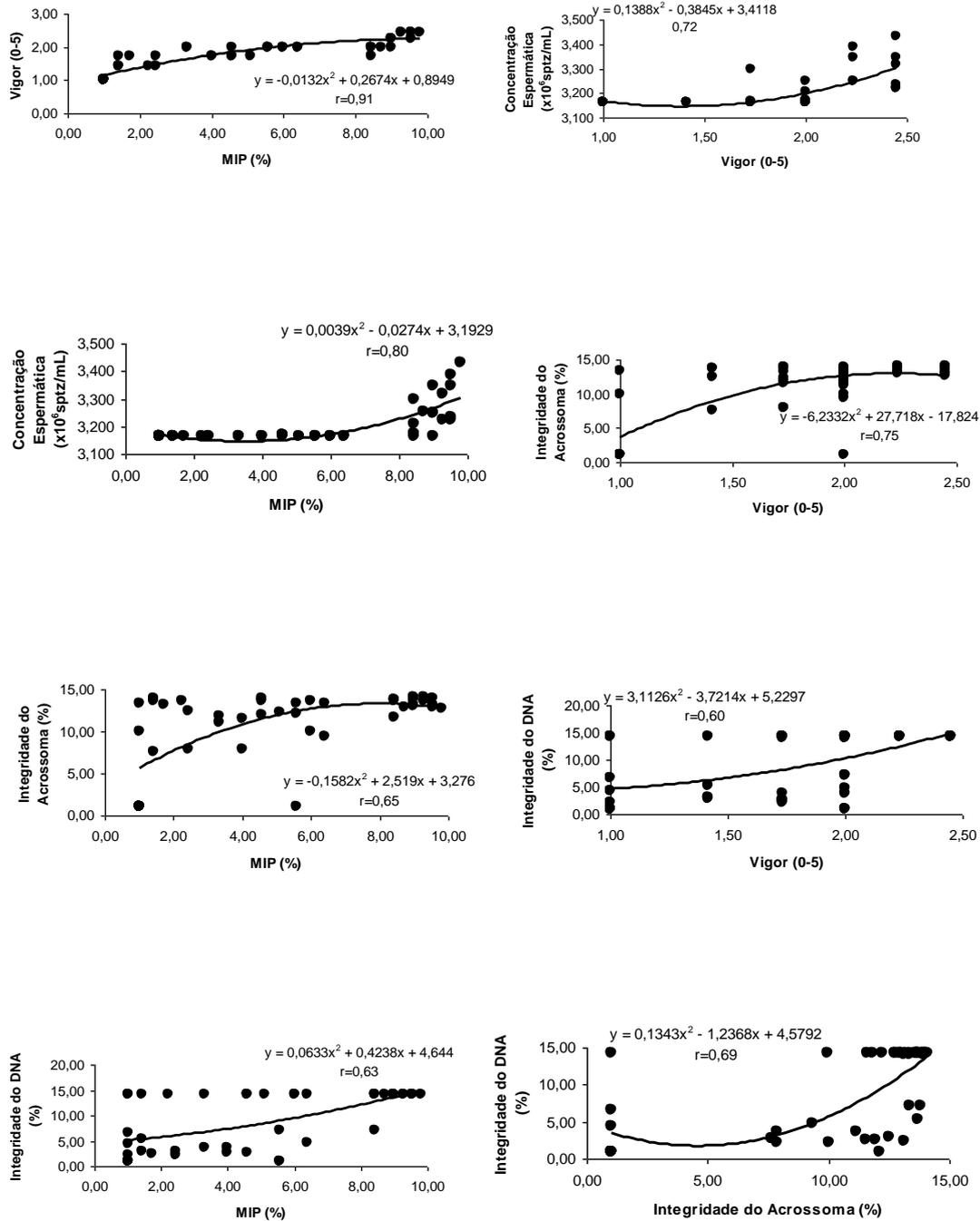


Figura 2 – Correlação entre pares de variáveis do sêmen, antes e durante o período de IE (IE) e no período pós-IE (PIE), de caprinos submetidos à insulação escrotal (IE) e suplementados com Selênio e Vitamina E na dieta ($p < 0,0001$).

3.2. Efeito da suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros testiculares e teor sérico de testosterona de caprinos induzidos à insulação escrotal

(Effect of diet supplementation with Selenium and Vitamin E on the seminal testis parameters and testosterone serum concentration of goats induced to scrotal insulation)

G.C. Xavier¹, P.C. Soares², V.A. Silva Junior², A.C.M. Maymone³, M.M.P. Guerra²

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, UFRPE;

²Prof. Dr. do PPGCV, UFRPE; ³Graduanda em Medicina Veterinária, DMV, UFRPE.

Resumo

Objetivando-se avaliar o efeito da suplementação com Selênio e Vitamina E na dieta de caprinos submetidos à insulação escrotal sobre os parâmetros testiculares, foram utilizados 12 animais com idade variando entre 7 e 8 meses, os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (G1= sem suplementação; G2 = suplementado com Selênio e Vitamina E). A suplementação foi feita por período de dois meses anterior à indução da insulação escrotal (IE). Ao término do período de adaptação, iniciou-se a IE com colocação de bolsas plásticas nos testículos, que teve duração de 18 dias. Após o término da IE, foi mantida a suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E para os animais do G2 por mais 42 dias, correspondendo à fase de pós-insulação (PIE). Ao término do período de IE, foram escolhidos aleatoriamente três animais de cada grupo para serem submetidos à orquiectomia e, ao final do PIE (42dPIE), os demais animais foram submetidos ao mesmo procedimento para registro de parâmetros biométricos e volumétricos do parênquima testicular. Após orquiectomia, os testículos direito e esquerdo, assim como o epidídimo direito e esquerdo, foram pesados e preparados para análise biométrica e histométrica. Amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular para análise sérica de testosterona. O grupo de animais que recebeu Selênio e Vitamina E teve média significativamente maior de circunferência escrotal ao término da IE, enquanto que os não suplementados apresentaram-se mais suscetíveis aos efeitos degenerativos no mesmo período. Houve diferença significativa ao término do período de IE (18d IE) apenas para o volume de vaso sanguíneo. Tanto em G1 quanto em G2, após 18 dias de insulação foram observadas lesões compatíveis com degeneração testicular. Durante o período pós-insulação (42d PIE), não se observou diferença significativa entre os grupos G1 e G2 ($P>0,05$). Enquanto que, ao término do mesmo (42d PIE), observou-se diferença significativa para os parâmetros de volume de túbulo seminífero e de epitélio seminífero, assim como diâmetro tubular e altura de epitélio. A suplementação com Selênio e Vitamina E minimiza os efeitos drásticos causados pela insulação escrotal sobre parâmetros biométricos testiculares e teores séricos de testosterona em caprinos, além de acelerar a recuperação do processo espermatogênico com a continuidade da suplementação dietética após suspensa a insulação escrotal.

Palavras-chave: Parâmetros biométricos, histomorfometria, testículos, caprino.

Abstract

Aiming to evaluate the effect of diet supplementation with Selenium and Vitamin E of goats induced to scrotal insulation on the testis parameters, it were used 12 animals with age varying between 7 and 8 months, distributed randomly in two groups (G1= Control; G2= Selenium and Vitamin E). The supplementation was done by period of 2 months before scrotal insulation (SI). At the end of adaptation period, it was began SI with plastic bags on the testis during 18 days. After the end of SI, the diet supplementation with Selenium and Vitamin E was maintained on the G2 animals during 42 days, corresponding to post-insulation phase (PIE). At the end of SI period, three animals of each group were randomly chosen to be submitted to bilateral orchiectomy and, at the end of PIE (42dPSI), the other animals were submitted to the same procedure to register biometric and volumetric parameters of testis parenchyma. After orchiectomy, the left and right testis, as well as left and right epididymis, were weighted and prepared to biometric and histometric analyses. Blood samples were obtained from jugular puncture to serum testosterone analyses. The Selenium and Vitamin E group had values significantly higher of scrotal circumference at the end of SI, whereas the Control animals were more sensitive to degenerative effects on the same period. There was significant difference on the end of SI period (18d SI) only to blood vessel volume. Not only G1 but also G2, after 18 days after SI, have damages compatibles with testis degeneration. During post-insulation period (42d PSI), it was observed no significant difference between G1 and G2 groups ($P>0.05$). Whereas, at the same period (42dPSI), it was observed significant difference on the seminiferous tubules volume and seminiferous epithelium, as well as on the tubular diameter and ephitelium height of goats induced to scrotal insulation. The supplementation with Selenium and Vitamin E prevent drastic alterations caused by scrotal insulation on the testis biometric parameters and serum testosterone concentration on goats, besides accelerate the spermatogenic recuperation process with continuous diet after scrotal insulation.

Keywords: Biometric parameters, histomorfometry, testis, goat.

1 Introdução

Em regiões tropicais próximas à linha do Equador, onde não há variação da luminosidade diária, as variações quanti-qualitativas do ejaculado de caprinos parecem estar condicionadas a outros fatores mais importantes do que o fotoperíodo, tais como a temperatura ambiente (NUNES, 1988; MACHADO et al., 2000).

Apesar do efeito do calor nos testículos ser reversível, alguns estudos recentes sugerem que pode não haver regeneração total do parênquima testicular, até 60 dias após o término da injúria (SETCHELL, 1998). Assim, o processo de degeneração testicular, devido a alterações na espermatogênese, reduz a qualidade do sêmen através do aumento da produção de espermatozoides anormais (NASCIMENTO e SANTOS, 1997) e da redução do número de células, determinando oligozoospermia ou

azoospermia, dependendo da intensidade e duração da injúria (FRASER e WILSON, 1966).

A insulação escrotal é um bom método para o estudo experimental de alterações testiculares induzidas pelo aumento da temperatura, uma vez que esta determina mudanças na tensão intratesticular, na circulação do sangue e linfa, além de fluidos extras e intratesticulares (FONSECA e CHOW, 1995). Segundo Florentino et al. (2003ab), a insulação escrotal durante 12 dias reduz a quantidade de células de Sertoli, espermatogônias e espermátides. Após 18 dias da retirada da insulação escrotal, os autores citados anteriormente observaram destruição de grande parte das células espermatogênicas e, a partir desta fase, diminuição do número de células gigantes multinucleadas, com grande quantidade de corpos residuais no lume dos túbulos seminíferos.

As proteínas do choque térmico (HSPs) estão envolvidas em muitas funções celulares convencionais sob temperatura normal e são classificadas de acordo com seu peso molecular (MORIMOTO et al., 1992). Todavia, sob temperatura de 5 a 10 °C acima da homeotermia, estas proteínas sofrem transcrição e translação (MARESCA e LINDQUIST, 1991), sendo produzidas na forma induzível (JU, 2005). Muitos fatores, além do choque térmico, podem determinar aumento na produção de HSPs, incluindo fatores de crescimento, hormônios, ROS, hipóxia, metais pesados, doenças e infecções virais (MORIMOTO et al., 1992).

As HSPs 27 e 90, encontradas nas células de Sertoli, em espermatogônias, espermatócitos e espermátides, apresentam-se em concentrações elevadas e movem-se do citoplasma ao núcleo de células isoladas dos testículos de ratos submetidos à temperatura de 37 a 42 °C (BIGGIOGERA et al., 1996). Da mesma forma, a proteína p53 parece também estar envolvida em processos reprodutivos, uma vez que ratos com reduzida quantidade desta proteína apresentaram resposta diminuída ao criptorquidismo induzido, com conseqüente menor redução do peso dos testículos (YIN et al., 1997)

O Selênio é necessário para o crescimento e a fertilidade dos animais e para a prevenção de várias condições mórbidas, algumas das quais respondem também, de certo modo, à terapia com Vitamina E (ROSA, 1993). Noguchi et al. (1973) relataram que a vitamina E atua como antioxidante lipossolúvel na membrana celular, prevenindo a reação em cadeia de auto-oxidação dos lipídios, enquanto de acordo com Rosa (1993), o Selênio age como componente da enzima glutathione peroxidase (GPx), destruindo os peróxidos formados antes que eles ataquem a membrana celular.

Por conseguinte, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E nos parâmetros testiculares de caprinos submetidos à insulação escrotal.

2 Material e Métodos

2.1 Animais

Foram selecionados, após exame andrológico, 12 machos da espécie caprina, sem raça definida (SRD), adultos, com idade variando entre 7 e 8 meses. Administrou-se anti-helmíntico (Desofenol – IBASA 20%) para o controle de parasitos internos. Em seguida, os animais foram distribuídos por amostragem probabilística em dois grupos (G1= Controle; G2= Selênio e Vitamina E) constituídos de seis animais cada. Todos os animais foram mantidos em regime de confinamento, sendo alimentados com feno Tifton e suplementados com ração balanceada (farelo de milho e farelo de soja), além de ser fornecida água e sal mineral à vontade, no cocho. Durante o período de adaptação de 60 dias, todos os animais foram submetidos à pesagem semanal, objetivando-se manter a linearidade entre ganho de peso e dose recebida de Selênio e Vitamina E aos animais do G2. A quantidade ofertada de Selênio foi de 0,1mg/kg/PV, enquanto a Vitamina E foi de 0,3 UI/Kg/PV (Selevit E[®], INTEGRAL Agroindustrial LTDA). Os animais do G2 passaram a receber o Selênio e Vitamina E dois meses antes da insulação escrotal (IE) e continuamente até o término do experimento. Os animais do G1 apenas receberam as dietas sem a referida suplementação.

2.2 Insulação escrotal

Após o período de adaptação (60 dias), todos os 12 animais foram submetidos à IE, com a colocação de bolsa plástica de polietileno de dupla parede, separadas por uma camada de algodão, de espessura aproximada de 5 mm, conforme modelo utilizado por Florentino et al. (2003ab). A fase de IE teve duração de 18 dias. No 18º dia, término da fase de IE, três animais de cada grupo também foram escolhidos por amostragem probabilística e submetidos à orquiectomia bilateral. Os três animais restantes de cada grupo tiveram continuidade na oferta das dietas por mais 42 dias, correspondendo ao período pós-insulação escrotal (PIE). O período experimental foi de 120 dias.

2.3 Avaliação biométrica e volumétrica dos testículos e epidídimos e Índice gonadossomático

Os testículos foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura, os quais foram submetidos à fixação em solução fixadora de glutaraldeído (VETEC, Brasil) a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, para posterior análise. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA, Germany). Cortes histológicos de 4 μ m de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados.

O diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidas em aumento de 100X usando retículo micrométrico linear (10mm/100, Olympus, Japan), calibrado com um micrômetro padrão. O diâmetro tubular médio para cada caprino foi obtido a partir da mensuração de 15 túbulos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, separados aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. A altura do epitélio foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para tal, tomaram-se duas medidas diametralmente opostas, tendo como referência a túnica própria e o limite entre o lume e o epitélio germinativo, determinando-se, desta forma, a altura média do epitélio seminífero.

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

O testículo é dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do compartimento tubular, foram avaliados o volume ocupado pela túnica própria, epitélio seminífero e lume; enquanto, no compartimentos intertubular, foram investigados o volume ocupado pelas células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sangüíneos e linfáticos. Como a densidade do testículo é em torno de 1,03 a 1,04 (FRANÇA, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada componente do testículo (expresso em μ L) foi estabelecido a partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o peso líquido do testículo (g). O valor deste último foi obtido pela subtração dos pesos da

albugínea e do mediastino testicular do peso bruto do testículo (RUSSELL e FRANÇA, 1995).

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (ATTAL e COUROT, 1963; DORST e SAJONSKI 1974): $CT = VTS / \pi R^2$, onde VTS = Volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

2.4 Dosagem de testosterona

Amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular, em recipiente sem anticoagulante e a vácuo. Após colheita, as amostras de sangue foram centrifugadas e separado o soro sanguíneo para armazenamento (-20 °C) e posterior análise da concentração de testosterona. Após descongelação, as amostras foram analisadas em duplicata através do teste de Elisa (PETER et al., 2003) e o resultado expresso em ng/mL.

2.5 Análise estatística

O modelo estatístico utilizado para estudar cada uma das variáveis simultaneamente, sob efeito de dois grupos de tratamentos (sem e com suplementação com Selênio e Vitamina E) e intervalos de tempo de colheita de material biológico foi indicado por Sampaio (1998) como um delineamento em blocos casualizados.

Os dados biométricos e histomorfométricos foram testados, inicialmente, quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) que separou, como causa de variação, o efeito de tratamentos e tempos de colheita e interação.

Foi aplicado o nível de significância (p) de 5%, e a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Student – Newman - Keuls foi utilizado para comparações de médias quando na presença de significância. Estatística de associação entre pares de variáveis foi realizada com a determinação do coeficiente de Pearson, segundo Sampaio (1998). Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2000).

3 Resultados

3.1 Consistência testicular

O exame andrológico dos reprodutores caprinos (G1 e G2) realizado no período pré-IE (0d) evidenciou consistência tenso-elástica nos testículos. Todavia, ao término do período de IE (18d), dos três animais orquiectomizados do G1, dois apresentaram flacidez intensa do parênquima testicular, enquanto um animal deste grupo e três animais do G2 (Selênio e Vitamina E) apresentaram flacidez moderada deste parênquima. Quarenta e dois dias após o término da insulação escrotal (42d PIE), todos os animais apresentaram testículos com consistência normal (tenso-elástica).

3.2 Medidas biométricas

Na Tabela 1, evidenciou-se que na avaliação pré-insulação (0d) não houve variação significativa ($p = 0,773$) entre os valores médios e desvio-padrão da circunferência escrotal (CE) nos animais do grupo Selênio e Vitamina E ($23,00 \pm 1,82$) e os do grupo Controle ($22,80 \pm 0,99$). Todavia, ao término do período de IE (18d IE) observou-se diferença significativa ($p = 0,021$) entre o grupo Selênio e Vitamina E ($23,00 \pm 1,00$) e o grupo Controle ($20,00 \pm 1,00$), indicando que o grupo Tratado (Selênio e Vitamina E) apresentou menor variação de CE do que o grupo Controle. Em contrapartida, aos 42d PIE não se verificou diferença significativa ($p = 0,874$) entre os animais dos grupos Selênio e Vitamina E ($22,17 \pm 0,76$) e Controle ($22,33 \pm 1,53$). No entanto, apesar de não se ter constatado diferença significativa ($p = 0,709$) de CE nos animais do grupo Selênio e Vitamina E (G1) quanto ao dia de avaliação, nos animais do grupo Controle verificou-se diferença significativa ($p = 0,020$) entre os momentos estudados (0d, 18d IE e 42d PIE).

Na Tabela 2 constatou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos G1 e G2, no que se refere aos valores médios do peso corporal (PC), peso testicular (PT), peso do epidídimo (PE) e índice gonadossomático (IGS), tanto ao término do período de IE (18d IE) quanto do período pós-insulação (42d PIE).

Quanto aos pesos dos testículos direito (PTD) e esquerdo (PTE), observa-se na Tabela 1 (em anexo) que houve diferença significativa ($p = 0,045$) no PTD entre os animais do grupo Selênio e Vitamina E ($60,51 \pm 5,00$) e os do grupo Controle ($42,92 \pm 9,36$) ao término do período de IE (18d IE). Da mesma forma, observou-se

diferença significativa ($p = 0,043$) entre PTE do grupo Selênio e Vitamina E ($65,47 \pm 1,64$) e do grupo Controle ($46,32 \pm 11,24$) ao término do período pós-IE (42d PIE). Durante o período pós-IE (42d PIE) não se observou diferença significativa entre os grupos Selênio e Vitamina e o Controle ($P > 0,05$), apesar de se ter observado que houve recuperação dos PTD e PTE de ambos os grupos. Da mesma forma, os pesos do epidídimo direito (PED) e esquerdo (PEE) evidenciaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos e os momentos de avaliação no 18º dia de IE.

No que se refere ao peso líquido dos testículos e aos parâmetros volumétricos e biométricos do parênquima testicular, constata-se na Tabela 3 que houve diferença significativa ao término do período de IE (18d IE) apenas para o volume de vaso sanguíneo ($p = 0,0289$). Enquanto que 42 dias pós-término de IE (42d PIE) observou-se diferença significativa para volume de túbulo seminífero ($p = 0,0310$), volume de epitélio seminífero ($p = 0,0350$), diâmetro tubular ($p = 0,0120$) e altura de epitélio ($p = 0,0141$).

Nos gráficos de relação entre pares de variáveis dos testículos dos animais experimentais submetidos à IE e suplementação com Selênio e Vitamina E (Figura 1 em anexo), verifica-se correlação elevada ($r = 0,80$) entre as variáveis de PE e PT. Quanto a correlação entre CE e PE encontrou-se correlação moderada entre as variáveis analisadas ($r = 0,44$), havendo correlação ainda mais baixa ($r = 0,19$) entre as variáveis de PT em relação ao PE.

3.3 Achados histopatológicos

Nos animais do grupo Controle, após 18 dias de insulação, foram observadas lesões compatíveis com degeneração testicular ocasionadas pelo aumento da temperatura induzida por insulação escrotal. Nos túbulos seminíferos observou-se redução do epitélio em decorrência da degeneração causada por apoptose e descamação de células germinativas. Constatou-se, ainda, obliteração luminal nos túbulos seminíferos por células germinativas descamadas, células gigantes sinciciais apoptóticas e macrófagos. Também se observou vacuolização das células de Sertoli e espessamento da membrana basal (Figura 1b). Nos animais do grupo controle evidenciou-se aglomerados de células de Leydig em processo de degeneração por esteatose (acúmulo de gordura intracitoplasmática) e células com características típicas de necrose (Figura 1d). No grupo tratado com Selênio e Vitamina E, os achados foram bastante

semelhantes aos descritos anteriormente (Figura 1g; Figura 1f; Figura 1h), entretanto foi possível identificar túbulos seminíferos com associações celulares características de alguns estágios do ciclo do epitélio seminífero (Figura 1e; Figura 1f).

Nos animais do grupo Controle, após 42 dias da retirada do insulto térmico (Figura 2), observou-se recuperação parcial do processo espermatogênico. Isto se justificou pela presença de túbulos seminíferos atrofiados, com diâmetro tubular e altura de epitélio germinativo reduzidos (Figura 2a). Além disso, em alguns túbulos, constatou-se obliteração do lume por células germinativas descamadas e degeneradas, epitélio germinativo com espessura reduzida e abundante células descamadas no lume (Figura 2g). Em alguns túbulos foi possível verificar células descamadas em apoptose, vacuolização de células de Sertoli e espessamento de membrana basal (Figura 2b; Figura 2h). Por outro lado, no grupo suplementado com Selênio e Vitamina E identificou-se túbulos seminíferos com espermatídes arredondadas e em alongamento, e túbulos seminíferos entre os estágios I e VIII do ciclo do epitélio seminífero (CES) (Figura 2c; Figura 2d; Figura 2e e Figura 2f).

3.4 Concentração sérica de testosterona

Quanto às concentrações séricas de testosterona (Tabela 4), foram registrados efeitos de tratamentos ($p < 0,0001$), tempos de colheita ($p < 0,0001$) e interação tratamento x tempos de colheita ($p < 0,0064$). Neste caso, maiores médias foram observadas no período final da IE (18d IE), principalmente nos animais do grupo Controle em relação ao grupo de animais que recebeu Selênio e Vitamina E, com média geral de 6,29 ng/mL para o grupo Controle e 3,58 ng/mL para o grupo Selênio e Vitamina E.

Com relação ao período PIE, observou-se decréscimo significativo das concentrações séricas de testosterona no período compreendido entre os dias 7 e 42 PIE, quando comparados ao período final da IE (18d IE), além de que estes valores mantiveram-se próximos àqueles encontrados no momento inicial do experimento (0d IE).

4 Discussão

A consistência testicular mais flácida observada nos animais, a partir do primeiro dia de retirada das bolsas de IE, foi menos freqüente naqueles suplementados

com Selênio e Vitamina E, evidenciando que o estresse térmico induzido artificialmente durante 18 dias de IE afetou em menores proporções a constituição testicular dos animais suplementados. Estes resultados corroboram com os relatos de Galbadi et al. (1999) em touros Nelore submetidos à IE por 96 horas, onde ressaltaram que na primeira semana de IE a consistência do parênquima testicular apresentou-se flácida em animais do grupo insulado. Uma vez que a diminuição da consistência testicular é uma variável associada à redução na produção espermática e ao maior número de espermátocitos e espermátides degeneradas em todos os estágios do ciclo da espermatogênese (MULLER et al., 1992; COULTER e FOOTE 1997; MOREIRA et al., 2001), acredita-se que neste experimento tenha havido maior redução da produção espermática nos animais do grupo Controle.

Os resultados de peso testicular, epididimário e corporal dos animais deste experimento indicam que não houve diferença entre os grupos Controle e Selênio e Vitamina E, evidenciando que a suplementação alimentar não interferiu nestas características dos animais submetidos ao estresse térmico induzido por IE (18d IE). Todavia, acredita-se que o fato dos animais deste experimento serem mais rústicos (SRD) e, conseqüentemente, menos susceptíveis a variação de temperatura causada pela IE, não se observou efeito positivo da suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E, uma vez que, segundo Morais e Oliveira (1991) e Martins et al. (2003), estes resultados podem indicar variação genética e que qualquer seleção relacionada a parâmetros biométricos testiculares (peso testicular e volume) deve ser efetuada em grupos homogêneos quanto a idade e raça. Moraes et al. (2003) observaram que caprinos das raças Saanen, Anglo-nubiana e Moxotó apresentaram 28,5; 32,0 e 23,5 cm, respectivamente, de circunferência escrotal, evidenciando variação na CE de caprinos de acordo com a característica racial. Assim, considerando que neste experimento foram utilizados animais sem raça definida (SRD), mais rústicos e adaptados às condições ambientais, os resultados de CE são compatíveis com os da raça Moxotó relatada anteriormente. Além disso, segundo De La Vega et al. (2006), existem variações anuais da circunferência escrotal em caprinos criollos serranos, porém estas não são influenciadas pelo fotoperíodo, uma vez que os maiores valores de CE corresponderam aos meses de contraciclo.

A condição nutricional é um fator que pode influenciar a correlação linear e positiva do peso corporal com a circunferência escrotal (GARCIA-DERAGON et al., 1985; VILAR-FILHO et al., 1993; MORAIS e OLIVEIRA, 1996). De acordo com os

resultados obtidos neste experimento, o peso testicular apresentou correlação linear positiva com o peso corporal nos animais dos dois grupos. Por conseguinte, não deve estar relacionado à suplementação com Selênio e Vitamina E.

As medidas testiculares estão associadas com a produção espermática em carneiros (OSINOWO et al., 1992; SOUZA e COSTA, 1992), enquanto o número de espermátides por células de Sertoli e a área de túbulos seminíferos possuem relação inversa com a taxa de degeneração de células germinativas em touros (BERNDTSON et al., 1987; PALASZ et al., 1994; MOURA e ERICKSON, 1997). Estas afirmativas corroboram com os achados deste experimento, onde se observou correlações entre as medidas testiculares e os achados histopatológicos, ao se constatar que, apesar de não diferirem estatisticamente, o peso testicular ao final de 18d IE foi maior nos animais do grupo G2 (Selênio e Vitamina E), associado ao fato de que os túbulos seminíferos destes animais possuíam associações celulares características de alguns estágios do ciclo do epitélio seminífero, o que não se observou no grupo Controle.

De acordo com os resultados morfométricos e histopatológicos deste estudo, a associação de Selênio e Vitamina E na suplementação alimentar não foi capaz de reduzir os efeitos deletérios do aumento de temperatura induzido por insulação durante 18 dias, conforme pode ser observado através da ausência de diferença significativa no diâmetro tubular e na altura de epitélio seminífero entre os grupos experimentais neste período e a semelhança das lesões encontradas nos animais dos grupos experimentais. O que pode ser explicado pelo fato do diâmetro tubular e da altura do epitélio refletirem diferentes graus da atividade do epitélio seminífero por influência sazonal (ABDEL-RAOUF et al., 1975; PARREIRA, 1990; SINHA HIKIN et al., 1991; RUSSELL et al., 1994; MUÑOZ et al., 1998), estabelecimento da puberdade (FRANÇA e CARDOSO, 1998; JONES, 1997), efeitos deletérios da idade avançada (WANG et al., 1993; PAULA e CARDOSO, 1994; NIPKEN e WRÖBEL, 1997), efeitos de drogas bociogênicas (VAN HAASTER et al., 1992; HESS et al., 1993; COOKE et al., 1994; MEISAMI et al., 1994; KIRBY et al., 1996), efeito de hormônios gonadotróficos endógenos e exógenos (PUTRA e BLACKSHAW, 1985; KOSCO et al., 1989ab, SWANLUND et al., 1995), assim como consequência do aumento de temperatura (ROCKETT et al., 2001; KHAN e BROWN, 2002). No entanto, neste experimento, a correlação elevada entre PT e CE, moderada entre PE e CE e baixa entre PE e PT é um bom parâmetro para avaliação reprodutiva de machos caprinos, podendo-se observar

que o PE apresenta influência pequena na avaliação reprodutiva destes animais submetidos à IE nas condições experimentais avaliadas.

Os parâmetros biométricos são importantes na avaliação quantitativa da espermatogênese, uma vez que existe correlação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica do testículo (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Histologicamente, o processo degenerativo testicular causado por aumento de temperatura se caracterizou inicialmente pelo aparecimento de células germinativas descamadas e com condensação nuclear no lume tubular. As lesões mais freqüentes, pelo menos nos estágios iniciais, foram espermátócitos, espermátides e células gigantes multinucleadas provenientes da fusão de espermátides arredondadas. O avanço do processo degenerativo culminou com a redução de epitélio seminífero, assim como de diâmetro tubular, ocorrência de vacuolização e depósito de lipídeos nas células de Sertoli, corroborando com Rockett et al. (2001), os quais observaram que a elevação da temperatura testicular promoveu interrupção do processo espermatogênico e causou infertilidade. O processo degenerativo no epitélio germinativo ocorreu em conseqüência de necrose e apoptose celular, ratificando os achados de Ito et al. (1997), Zini et al. (1999), Pinart et al. (2001) e Rockett et al. (2001), que observaram o processo degenerativo decorrente de mudanças do epitélio germinativo associadas à maturação desordenada das células e ao aumento da morte celular programada.

No intertúbulo testicular, o aumento de temperatura promoveu degeneração nas células de Leydig com 18 dias de IE, caracterizada principalmente por células com vacúolos intracelulares (esteatose), núcleo picnótico, cariólise e cariorrexe. Estes achados estão de acordo com os de Pinart et al. (2001) que, ao submeter suínos a orquipexia unilateral, descreveu estes achados no intertúbulo, acompanhado por fibrose e aparecimento de células de Leydig anômalas e degeneradas.

Segundo Rockett et al. (2001), o processo de degeneração testicular pelo aumento de temperatura está relacionado à expressão de um grupo de proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico (HSP), as quais desencadeiam danos ao DNA, expressão de p53, ativação do citocromo C e, conseqüentemente, apoptose. Além deste mecanismo, Gupta et al. (2004) e Jedlinska-krakowska et al. (2006) verificaram que o dano celular inicial determinado pelo aumento da temperatura resulta em aumento na produção de ROS e apoptose celular. Por conseguinte, era de se esperar que a suplementação com antioxidantes Selênio e Vitamina E tivesse evitado a apoptose

celular, uma vez que estas substâncias são utilizadas como protetores contra o efeito deletério dos ROS sobre as membranas celulares (BENSOUSSAN et al., 1998).

Redução das secreções hormonais apresenta efeito negativo na produção e na maturação de células germinativas normais (HUTSON et al., 1997). Neste experimento, a concentração sérica de testosterona aumentou ao término da insulação escrotal, com resultados maiores para os animais do grupo Controle. Todavia, sete dias após o término da IE, as concentrações de testosterona já haviam reduzido aos valores observados antes do início da IE, sem diferirem entre os grupos, discordando dos relatos de Setchell (1998) e Gabaldi (2000), ao evidenciarem que a exposição do animal a elevadas temperaturas por período prolongado causou redução nas concentrações plasmáticas de testosterona, ocorrendo aumento desta concentração após um período curto de adaptação. Além disso, nos animais Controle foram observadas concentrações mais elevadas de testosterona do que naqueles tratados com Selênio e Vitamina E, contrariando os relatos de Behne et al. (1987), ao observarem que a secreção deste hormônio é menor em animais com deficiência de Selênio. A vitamina E é um antioxidante eficaz que protege os testículos do coelho de peroxidação lipídica (AYDILEK et al., 2004), assim a peroxidação lipídica induzida pela testosterona poderia ter sido melhorada pelo tratamento adicional da Vitamina E.

Os efeitos da dieta sobre a CE de carneiros são causados parcialmente por mudanças na atividade do sistema hipotalâmico e na secreção de gonadotrofinas (MARTIN et al., 1994). Assim, esperava-se que os animais suplementados com Selênio e Vitamina E apresentassem maior concentração sérica de testosterona durante o período experimental, principalmente após a insulação escrotal.

Aos 42d PIE verificou-se aumento do diâmetro de túbulo seminífero e de altura de epitélio, o que pode estar relacionado com conseqüente recuperação da atividade espermática, tendo o grupo G2 (Selênio e Vitamina E) apresentado maiores volumes de túbulo e epitélio seminíferos, maiores diâmetro tubular e altura de epitélio com espermátides arredondadas e em alongamento, e túbulos seminíferos entre os estágios I e VIII do ciclo do epitélio seminífero (CES) em relação ao grupo G1 (Controle). Sendo conveniente salientar que, na espécie estudada, a avaliação do CES é realizada pelo método da morfologia tubular, na qual se caracterizam oito tipos de associações celulares compatíveis com diferentes estágios. Neste caso, os animais tratados com Selênio e Vitamina E possuíam espermatogênese, pelo menos qualitativamente, com característica de normalidade após o 42º dia de retirada da insulação escrotal.

A utilização de antioxidantes na suplementação alimentar dos animais deste experimento, apesar de não reverter ou prevenir os efeitos deletérios decorrentes do aumento de temperatura nos testículos durante 18 dias de IE, acelerou o processo de recuperação da espermatogênese 42 dias PIE, o que se confirmou pelo aumento de volume tubular e de epitélio seminífero, diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e redução dos achados histopatológicos compatíveis com o processo de degeneração testicular em face do aumento de temperatura causada pela insulação escrotal.

5 Conclusões

A suplementação com Selênio e Vitamina E minimiza os efeitos drásticos causados pela insulação escrotal sobre os parâmetros biométricos testiculares e os teores séricos de testosterona em caprinos, além de que acelera a recuperação do processo espermatogênico com a continuidade da suplementação dietética após suspensa a insulação escrotal.

6 Referências

- ABEL-RAOUF, M.; EL-BAB, M. R.; OWAIDA, M. M. Studies on reproduction in the camel (*Camelus dromedarius*) V. Morphology of the testis in relation to age and season. **J. Reprod. Fertil.**, v. 43, p. 109-116, 1975.
- ATTAL, J.; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v. 3, p. 219-241, 1963.
- AYDILEK, N.; AKSAKAL, M.; KARAKILC A. Z. Effects of testosterone and vitamin E on the antioxidant stem in rabbit testis. Testosterone and testicular antioxidant system, 281. **Andrologia** v. 36, p. 277–281, 2004.
- BEHNE, D.; BOSSE, T.; ELGER, D. Selenium and hormones in the male reproductive system. In: **Combs JG Jr (eds.), Selenium in Biology and Medicine**, Part B. New York: AVI. p. 733-739, 1987.
- BENSOUSSAN, K.; MORALES, C.R.; HERMO, L. Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial the epididymis in the rat. **J. Androl**, v. 19, n. 3, p. 266-288, 1998.

BERNDTSON, W.E.; IGBOELI, G.; PARKER, W.G. The numbers of Sertoli cells in mature Hostein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biol. Reprod.**, v. 37, p. 60-74, 1987.

BIGGIOGERA, M.; TANGUAY, R.M.; MARIN, R. et al. Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. **Exp. Cell Res.**, v. 229, p. 77-85, 1996.

COOKE, P.S.; HESS, R.A.; KIRBY, J.D.; BUNICK, D.; HARDY, M.P. Neonatal propylthiouracil treatment as a model system for studying factors controlling testis growth and sperm production. In: ANDRZEJ BARTKE. **Function of somatic cells in the testis**. Norwell: Springer-Verlag., Cap.26, p.400-406, 1994.

COULTER, G. H.; FOOTE, R. H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. **Theriogenology**, v. 11, p. 297-310, 1997.

DE LA VEGA, A.C.; MORALES, P.; ZIMERMAN, M. et al. Annual variation of scrotal circumference in male creole goats. **Arch. Zootec.**, v. 55, p. 113-116, 2006.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monotsh. Vet. Med.**, v. 29, p. 650-652, 1974.

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

FLORENTINO, C. M.; REIS, J. C.; GUERRA, M. M. P. *et al.* Efeito do tempo de insulação sobre os constituintes do plasma seminal de caprinos (*Capra hircus*, L) sem raça definida. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v. 6, n. 1, p. 39-45, 2003b.

FONSECA, V.; CHOW, L. A. Características seminais de touros Zebus com degeneração testicular transitória. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v. 47, n. 5, p. 707-716, 1995.

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Belo Horizonte: UFMG, ICB, 180p, 1991. (tese, doutorado)

FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. **Tissue & Cell**, v. 30, p.573-582, 1998.

- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.) **Male Reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill communications, cap. 16, p. 198-219, 1998.
- FRASER, A. F.; WILSON, J. C. Testicular calcinosis in domestic ruminants. **Nature**, v. 210, n. 5035, p. 547, 1966.
- GALBADI, S.H.; DEFINE, R.M. Efeitos da elevação de temperatura nas características espermáticas em Touros Nelore. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p. 222-224, 1999.
- GABALDI, S.H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal**. 85p, 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), FMVZ - Universidade Estadual Paulista. Botucatu.
- GARCIA-DEGRADON, L.A.; PIMENTEL, C.A.; MORAES, J.C.F. Variação estacional de características reprodutivas em carneiros com e sem lã no escroto. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 9, n. 3, p. 119-132, 1985.
- GUPTA, R.S.; KIM, J.; GOMES, C. et al. Effects of ascorbic acid supplementation on testicular steroidogenesis and germ cell death in cadmium-treated male rats. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 221, p. 57-66, 2004.
- HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D.; KIRBY, J.D. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. **Endocrinology**, v. 132, p. 2607 - 2613, 1993.
- HUTSON, J.M.; HASTHORPE, S.; HEYN, C.F. Anatomical and functional aspect of testicular descent and cryptorchidism. **Endocr. Rev.**, v. 18, p. 259-280, 1997.
- ITO, K.; TENEMURA, K.; GOTOH, H. Apoptosis like cell death in experimentally-induced cryptorchidism in adult mice. **J. Med. Vet. Sci.**, v. 59, n. 5, p. 353-359, 1997.
- JEDLINSKA-KRAKOWSKA, M; BOMBA, G.; JUKUBOWSKY, K. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testis morphology in rats. **J. Reprod. Dev.**, v. 52, p. 203-209, 2006.
- JONES, D. N. **Desenvolvimento testicular do cavalo brasileiro de hipismo de 1 aos 30 meses de idade**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária-UFMG, 1997. Tese (Mestrado em Ciência Animal).
- JU, J.C. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. **Anim. Reprod.**, v. 2, p. 79-90, 2005.

KHAN, V.R.; BROWN, I.R. The effect as hyperthermia on the induction of cell feath in brain, testis, and thymus of the adult and developing art. **Cell. Stress Chaperones**, v. 7, n. 1, p. 73-90, 2002.

KIRBY, J.D.; MANKAR, M.V.; HARDESTY, D.; KREIDER, D.L. Effects of transient prepubertal 6-N- propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in domestic fowls. **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 910-916, 1996.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, G.B. Developmental of the seminiferous tubules after neonatal hemicastration in boar. **J. Reprod. Fertil.**, v. 87, p. 1-11, 1989a.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, G.B. Developmental of the testicular interstitium after neonatal hemicastration in boar. **J. Reprod. Fertil.**, v. 87, p.13-21, 1989b.

MACHADO, R; FREITAS, A. R.; SIMPLÍCIO, A. A. et al. Flutuações sazonais e efeitos de raça no sêmen caprino. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 27. Viçosa, 2000. **Anais...**, Viçosa: SBZ, 2000. CDROM.

MARESCA, B.; LINDQUIST, S. **Heat shock response**. Boca Raton: CRC Press. 1991. 320 p.

MARTIN, G.B.; TJONDRONEGORO, S.; BLACKBERRY, M.A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v. 101, p. 121-128, 1994.

MARTINS, R.D.; McMANUS, C; CARVALHÊDO, A. S. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criado no Distrito Federal. *Rev. Bras. Zootec.* V. 32, n. 6, suppl. 1. Viçosa, 2003;

MEISAMI, E., NAJAFI, A., TIMIRAS, P.S. Enhancement of seminiferous tubular growth and spermatogenesis in testes of rats recovering from early hypothyroidism: a quantitative study. **Cell Tissue Res.**, v. 275, p. 503-511, 1994.

MORAES, E.P.B.X.; ELOY, A.M.X.; GUERRA, M.M.P. et al. Avaliação da libido e qualidade de sêmen de reprodutores caprinos submetidos a colheitas sucessivas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 2, p. 205-207, 2003.

MORAES, J.C.F.; OLIVEIRA, N.R.M. Componentes da variância de medidas do perímetro escrotal e sua relevância na seleção de carneiros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 3, p. 257-264, 1991.

- MORAES, J.C.F.; OLIVEIRA, N.R.M. Componentes da variação andrológica e seu emprego na seleção de carneiros Romney Mars. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 30, n. 1, p. 23-29, 1996.
- MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; ARAUJO, A. A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 30, n. 6, 2001.
- MORIMOTO, R.I.; SARGE, K.D.; ABRAYAYA, K. Transcriptional regulation of heat shock genes. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 21987-21990, 1992.
- MOURA, A.; ERICKSON, B.H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationships with testis size and number of Sertoli and germ cells in beef bulls. **J. Reprod. Fert.**, v. 111, p. 183-190, 1997.
- MULLER, E.; RODRÍGUEZ, M. H.; BRADEN, S. et al., Australia Bul. N° 148, 1992.
- MUÑOZ, E. M., FOGAL, T., DOMINGUEZ, S., SCARDAPANE, L., GUZMAN, J., CAVICCHIA, J.C., PIEZZI, R. S. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). **Anat. Rec.**, v. 252, p. 8-16, 1998.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 1ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 108 p.
- NIPKEN, C.; WRÖBEL, K. H. A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium. **Andrologia**, v. 29, p. 149-161, 1997.
- NOGUCHI, T.; CANTOR, A.H.; SCOTT, M.L. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. **J. Nut.**, v. 103, p. 1502-1511, 1973.
- NUNES, J.F. fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 12, p. 77-83, 1988.
- OSINOWO, O. A.; MARRIE, B.N.; EKPE, G. A. Preliminary study of postnatal growth and reproductive tract development in Yankasa rams. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 27, p. 49-54, 1992.
- PALASZ, A. T.; CATES, W.F.; BARTH, A .D. et al. The relationship between scrotal circumference and quatitative testicular traits in yearling beef bulls. **Theriogenology**, v. 42. p. 715-729, 1994.

- PARREIRA, G. G. **Morfologia e variação sazonal da atividade dos testículos e órgãos genitais acessórios de *Bolomys lasiurus* Lund, 1841 (Rodentia, Cricetidae)**. Belo Horizonte: UFMG, 97p, 1990. Tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PAULA, T. A. R.; CARDOSO, F. M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. Análise histométrica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 46, p. 19-30, 1994.
- PETER, J. P.; JONES, T.H.; CHANNER, K.S. Actual hemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure. **Eur. Heart J.**, v. 24, p. 909-915, 2003
- PINART, E.; BONET, S.; BRIZ, M. Cytology of the interstitial in scrotal and abdominal testes of post-puberal boars. **Tiss. Cell**, v. 3, n. 1, p. 8-24, 2001.
- PUTRA, D.K.H., BLACKSHAW, A.W. Quantitative studies of compensatory testicular hypertrophy following unilateral castration in the boar. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 38, p. 429-434, 1985.
- ROCKETT, J.C.; MAPP, F.L.; GARGES, J.B. et al. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression and fertility in adult male mice. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 229-239, 2001.
- ROSA, I.V. Deficiências minerais e desempenho reprodutivo de ruminantes. **Circular técnica**, n. 23, Embrapa Gado de Corte, 1993.
- RUSSELL, L.D.; SINHA-HIKIM, A.P.; GHOSH, S.; BARTKE, A. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: Bartke. **A Function of somatic cells in the testis**; ed. New York: Springer-Verlag, cap. 3, p. 55-84, 1994.
- RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L.R.; HESS, R.; COOKE, P. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. **Tissue & Cell**, v. 27, p. 105-128, 1995.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 221 p, 1998.
- SETCHELL, B.P. The parkes lecture heat and the testis. **J. Reprod. Fertil.**, v. 114, p. 179-194, 1998.
- SINHA-HIKIM, A.P.; SINHA-HIKIM, I.S.; AMADOR, A.G.; BARTKE, A.; WOOLF, A.; RUSSELL, L.D. Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotrophins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. **Am. J. Anat.**, v. 192, p. 194-213, 1991.
- SOUZA, J.A.A.T.; COSTA, F.A.L. Características do sêmen e correlação com outros

- parâmetros reprodutivos em ovinos deslanados. In: Simpósio em ciências agrárias – pesquisa com caprinos e ovino no CCA, 1, Teresina. **Anais...** Teresina, p. 80-86, 1992.
- SWALUND, D.J.; N'DIAYE, M.R.; LOSETH, K.J.; PRYOR, J.L.; CRABO, B.G. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepuberal boars. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 749-757, 1995.
- VAN HASTER, H.L.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R.; DE ROOIJ, D.G. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. **Endocrinology**, v. 131, p. 1574-1576, 1992.
- VILAR-FILHO, A.C.; BARNABE, V.H.; BIRGEL, E.H. Características testiculares e seminais de caprino criados na região semi-árida do estado da Paraíba. I características testiculares. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 17, n. 1-2, p. 17-22, 1993.
- WANG, C.; LEUNG, A.; SINHA-HIKIM A. P. Reproductive aging in the male brown-norway rat: a model for human. **Endocrinology**, v. 133, p. 2773-2781, 1993.
- YIN, Y.; DEWOLF, W.C.; MORGENTALER, A. Heat stress caused testicular germ cell apoptosis in adult mice. **J. Androl.**, v. 18, p. 159-165, 1997.
- ZINI, A.; ABITOBO, J.; SCHULSINGER, D. et al. Restoration of spermatogenesis after scrotal replacement of experimentally cryptorchid rat testis: Assessment of germ cell apoptosis and NOS expression. **Urology**, v. 53, p. 223-227, 1999.

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão da circunferência escrotal, antes (0d), no período de insulação escrotal (IE) e no período pós-IE (PIE), de caprinos submetidos à insulação escrotal (IE) e suplementados com Selênio e Vitamina E na dieta

Grupos	Dias			P
	0 d	18 d IE	42 d PIE	
Selevit E	23,00±1,82 ^A	23,00±1,00 ^A	22,17±0,76 ^A	0,709
Controle	22,80±0,99 ^{Aa}	20,00±1,00 ^{Bb}	22,33±1,53 ^{Aab}	0,020
P	0,773	0,021	0,874	

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem a nível de 5%; Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ao nível de 5%

Tabela 2 - Valores médios, desvios-padrão e nível de significância dos parâmetros biométricos dos testículos e epidídimo de caprinos submetidos à insulação escrotal (IE) e recebendo dieta suplementada com Selênio e Vitamina E, ao término da IE e no período pós-insulação (PIE)

Parâmetros	Término da Insulação Escrotal (18 d IE)			Término do período de recuperação (42 d PIE)		
	Grupos Experimentais			Grupos Experimentais		
	Controle (n=3)	Selevit E (n=3)	p	Controle (n=3)	Selevit E (n=3)	p
Peso corporal (g)	27180 ± 4,74	23750 ± 2,08	0,1616	25290 ± 2,17	23070 ± 1,50	0,3239
Peso testicular (g)	44,63 ± 10,25	63,00 ± 3,24	0,0911	55,10 ± 5,56	55,60 ± 10,87	0,2072
Peso do epidídimo (g)	8,47 ± 0,84	9,90 ± 1,28	0,3014	8,47 ± 2,08	7,83 ± 1,27	0,2701
IGS (%)	0,16 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,4286	0,22 ± 0,36	0,25 ± 0,06	0,2868

IGS = Índice Gonadossomático.

Tabela 3 - Valores médios, desvios-padrão e nível de significância do peso líquido do testículo e parâmetros volumétricos e biométricos do parênquima testicular de caprinos submetidos a insulação escrotal (IE) e recebendo dieta suplementada com Selênio e Vitamina E, ao término da IE (18 d IE) e no período pós-insulação (42d PIE)

Parâmetros	Término da Insulação Escrotal (18 d IE)			Término do período Pós-insulação (42 d PIE)		
	Grupos Experimentais			Grupos Experimentais		
	Controle (n=3)	Selevit E (n=3)	<i>p</i>	Controle (n=3)	Selevit E (n=3)	<i>p</i>
Peso líquido testículo (g)	38,23 ± 9,38	55,76 ± 3,26	0,1076	49,07 ± 4,72	50,43 ± 10,42	0,1709
Túbulo seminífero (mL)	29,87 ± 7,01	42,20 ± 2,76	0,1338	38,85 ± 1,47	40,13 ± 8,23	0,0310*
Epitélio seminífero (mL)	24,04 ± 6,29	33,30 ± 3,40	0,2262	29,75 ± 1,19	30,78 ± 6,24	0,0350*
Lúmen do túbulo (mL)	3,01 ± 0,66	5,62 ± 0,96	0,3207	6,71 ± 2,55	7,68 ± 2,90	0,4367
Túnica própria (mL)	2,80 ± 0,47	3,28 ± 1,05	0,1651	2,39 ± 0,37	1,67 ± 0,17	0,1762
Células de Leydig (mL)	1,49 ± 0,48	2,29 ± 0,13	0,0696	1,70 ± 0,24	1,75 ± 0,24	0,4932
Célula do conjuntivo (mL)	0,10 ± 0,07	0,30 ± 0,07	0,4801	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,3684
Vaso sanguíneo (mL)	0,63 ± 0,43	0,65 ± 0,07	0,0289*	0,30 ± 0,12	0,48 ± 0,13	0,4625
Espaço linfático (mL)	6,17 ± 1,88	10,33 ± 1,96	0,4799	8,15 ± 3,32	7,94 ± 2,10	0,2867
Diâmetro tubular (µm)	295,52 ± 22,01	305,01 ± 22,68	0,4850	330,52 ± 30,43	339,34 ± 3,35	0,0120*
Altura do epitélio (µm)	103,00 ± 15,87	101,00 ± 14,42	0,4522	82,13 ± 61,85	112,23 ± 7,41	0,0141*
CTTS (m)	430,43 ± 45,85	581,90 ± 71,01	0,2943	460,13 ± 80,74	444,30 ± 95,52	0,4167

* $p < 0,05$; CTTS = Comprimento Total do Túbulo Seminífero.

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão da concentração sérica de testosterona (ng/mL) antes, ao término do período de insulação escrotal (IE) e no período de pós-insulação escrotal (PIE), de caprinos submetidos à insulação escrotal e suplementados com Selênio e Vitamina E na dieta

Grupos	Dias						Média Geral
	0d	18d IE	7d PIE	21dPIE	35dPIE	42dPIE	
Selevit E	0,60±0,26 ^{Ba}	17,35±3,47 ^{Ab}	1,49±1,49 ^{Ba}	0,85±0,26 ^{Ba}	0,33±0,06 ^{Ba}	0,87±0,33 ^{Ba}	3,58 ^b
Controle	0,84±0,76 ^{Ba}	31,23±6,34 ^{Aa}	1,86±1,44 ^{Ba}	1,24±0,95 ^{Ba}	1,74±0,30 ^{Ba}	0,83±0,47 ^{Ba}	6,29 ^a
Média Geral	0,72 ^B	24,29 ^A	1,68 ^B	1,04 ^B	1,03 ^B	0,85 ^B	

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem ao nível de 5%; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem ao nível de 5 %

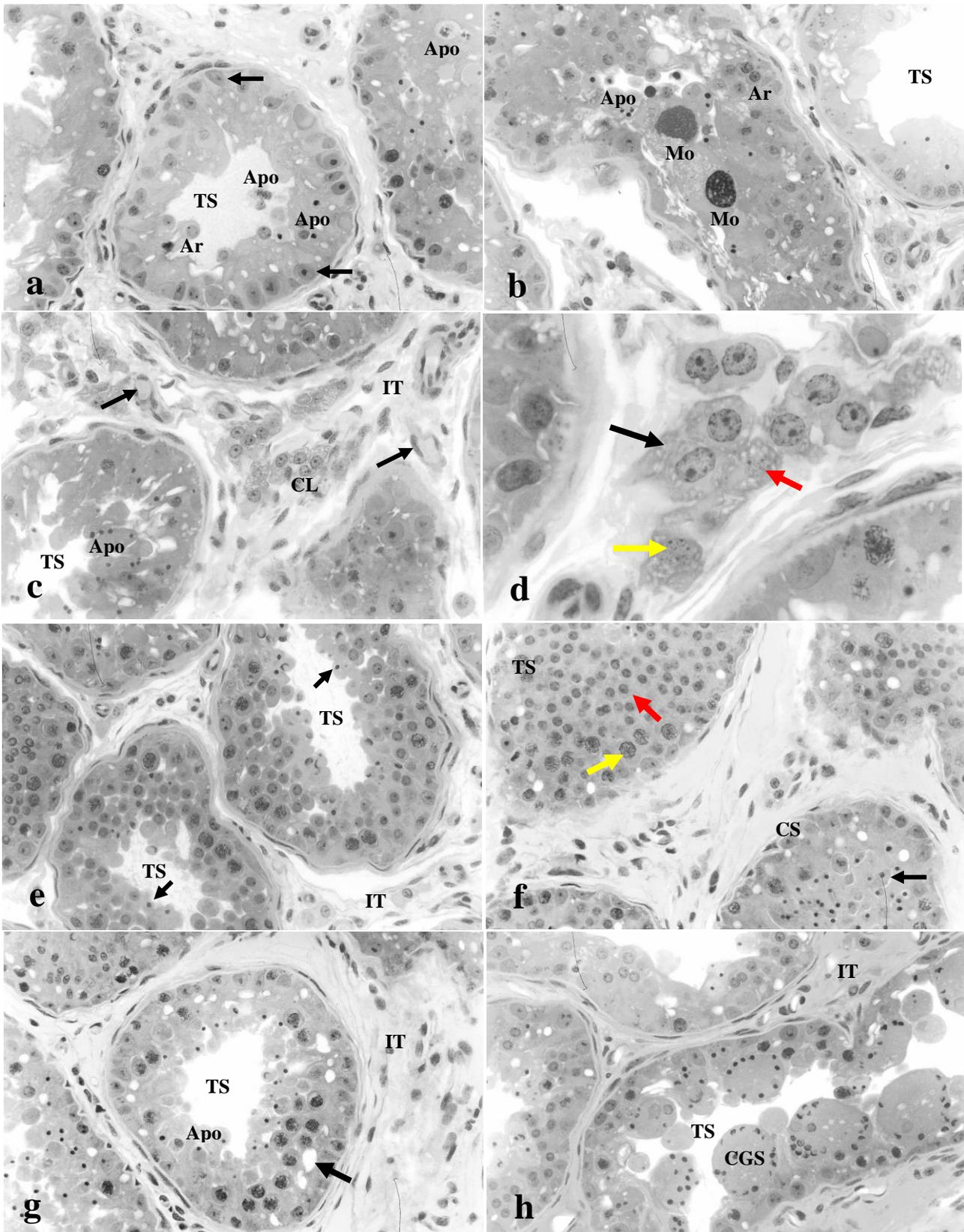


Figura 1 - Fotomicrografias de testículo de caprinos SRD controle e tratado com Selênio e Vitamina E no 18º dia de insulação escrotal.

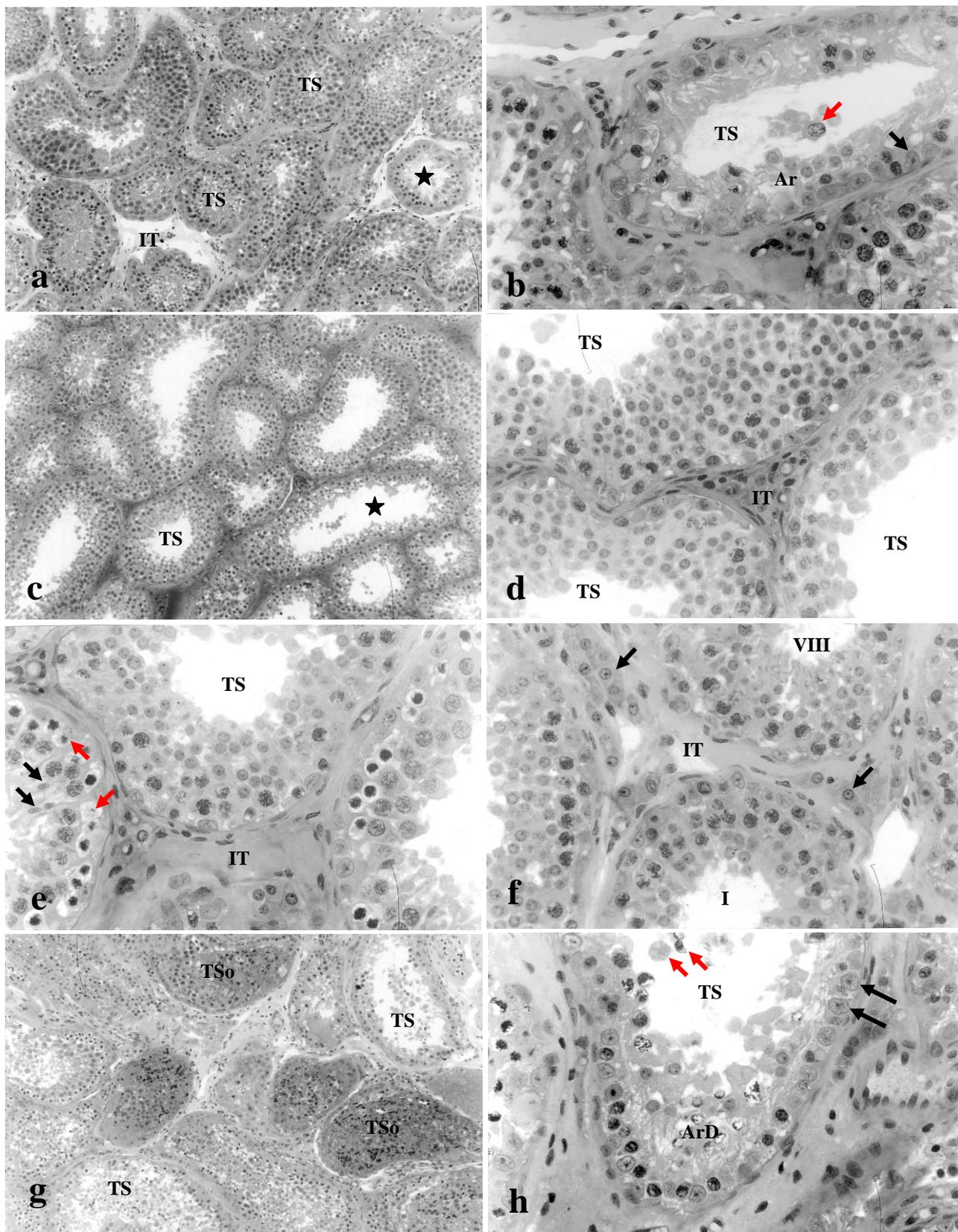


Figura 2 - Fotomicrografias de testículo de caprinos SRD controle e tratado com Selênio e Vitamina E no 42º dia pós insulação escrotal.

4 REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biol. Reprod.** v. 59, p. 1037-1046, 1998.
- AL-ABDULLA, A.N.; LEE, J.M. Apoptosis of retrogradely degenerating neurons occurs in association with the accumulation of perikaryal mitochondria and oxidative damage to the nucleus. **Am. J. Pathol.**, v. 153, p. 447-456, 1998.
- ARAÚJO FILHO, J. A. Manipulação da vegetação lenhosa para fins pastoris. Sobral, CE: **EMBRAPA-CNPQ**, CT n.11, 18p., 1992.
- AZZI, A.; BREYER, I.; FEHER, M. et al. Specific cellular responses to alpha-tocopherol. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1649-1652, 2000.
- BALL, B.A.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 508-515, 2001a.
- BALL, B.A.; BAUMBER, J.; SABEUR, K. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, p. 299-300, 2002.
- BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Rev. Bras. Repr. Anim.**, v. 1, n. 4, p. 1-11, 1993.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J. et al. Advances in cooled semen technology. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 68, p. 181-190, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **J. Androl.**, v. 21, p. 895-902, 2000.
- BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K. et al. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1025-1033, 2002b.
- BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 547-581, 1998.
- BEHNE, D.; BOSSE, T.; ELGER, D. Selenium and hormones in the male reproductive system. In: Combs JG Jr (eds.). **Selenium in Biology and Medicine**, Part B. New York: AVI; p. 733-739, 1987.
- BERNDTSON, W.E.; IGBOELI, G.; PARKER, W.G. The numbers of Sertoli cells in

mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biol. Reprod.**, v. 37, p. 60-74, 1987.

BIGGIOGERA, M.; TANGUAY, R.M.; MARIN, R. et al. Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. **Exp. Cell Res**, v. 229, p. 77-85, 1996.

BILLING, H.; FURRUTA, I.; RIVIER, C. et al. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stage. **Endocrinology**, v. 136, p. 5-12, 1995.

BOREK, C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1010S-1015S, 2001.

BUB, A.; WATZL, B.; ABRAHAMSE, L.; et al. Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men. **J. Nutr.** v. 130, p. 2200-2206, 2000.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **Faseb J.**, n.13, p. 1145–1155, 1999.

BROWN, D.G.; BURK, R.E. Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a Torula yeast diet. **J. Nutr.**, v. 103, p. 102-108, 1973.

BRUEY, J.M.; PAUL, C.; FROMENTIN, A. Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2200-2206, 2000a.

BURK, R.E.; HILL, K.E. Selenoprotein-P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. **J Nutr** , v. 124, p. 1891-1897, 1994.

BURK, R.F.; HILL, K.E.; AWAD, J.A.; MORROW, J.D.; KATO, T.; COCKELL, K.A.; LYONS, P.R. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein-P. **Hepatology**, v. 21, p. 561-569, 1995.

BURK, R.F.; HILL, K.E.; AWAD, J.A.; MORROW, J.D.; LYONS, P.R. Liver and kidney necrosis in selenium-deficient rats depleted of glutathione. **Lab Invest**, v. 72, p. 723-730, 1995.

CARR, A.C.; MCCALL, M.R.; FREI B Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** n. 20, p. 1716-1723, 2000a.

CARR, A.C.; ZHU, B.Z.; FREI, B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). **Circ. Res.** n. 87, p. 349-354, 2000b.

CHEMINEAU, P. Meio ambiente e reprodução animal 29/06/2004.
<http://www.fao.org/ag/Aga/AGAP/WAR/warall/v11650b/v1650b04.htm>.

CHEMINEAU, P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. **Reprod. Nutr. Develop.**, v. 26, p. 453-460, 1986.

COULTER, G.H.; FOOTE, R.H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. **Theriogenology**. v. 11, p. 297-310, 1979.

CUI, Z.G.; KONDO, T.; MATSUMOTO, H. Enhancement of apoptosis by nitric oxide release from phenyl-tertbutyl nitron under hyperthermic conditions. **J. Cell. Physiol.**, v. 205, p. 458-476, 2006.

DADOUNE, J.P.; DEMOULIN, A. Structure and functions of the testis. In: **Reproduction in mammals and man**. Ed. By C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Paris: Ellipses. 1993.

DE KRETZER, D.M.; KERR, J.B. The cytology of testis. In: Knobil, E., Neill, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, p. 837-932, 1988.

DUGAS, T.R.; MOREL, D.W.; HARRISON, E.H. Impact of LDL carotenoid and a-tocopherol content on LDL oxidation by endothelial cells in culture. **J. Lipid Res.**, v. 39, p. 999-1007, 1998.

EASTWOOD, M.A. Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? **Quart. J. Med.** v. 92, p. 527-530, 1999.

EL-SOKKARY, G.H.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; et al. Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. **Alcohol & Alcoholism**. n. 34, p. 842-850, 1999.

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

FREI, B. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. **Faseb J.** v. 13, p. 963-964, 1999.

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

- GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 68, p. 249-265, 2001.
- GARRIDO, C.; GURBUXANI, S.; RAVAGNAN, L. et al. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochem. Biophys. Res.**, v. 286, p. 433-442, 2001.
- GENDREL, D.; ROGER, M.; JOB, J.C. Plasma gonadotropin and testosterone values in infants with cryptorchidismo. **J. Pediatr.**, v. 97, p. 217-220, 1980.
- GIROTTI, A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **J. Lipid Res.**, v. 39, p. 1529-1542, 1998.
- GRACE, N.D.; VENNING, M.; VICENTE, G. An evaluation of a controlled release system for Selenium in lambs. **New Zeal. Vet. J.**, n. 42, p. 63-65, 1994.
- GUZMÁN-GRENFELL, A.M.; HERNÁNDEZ, S.R.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.T. et al. Effect of nitric oxide releasers on some metabolic process of rabbit spermatozoa. **Arch. Androl.**, v. 42, p. 119-123, 1999.
- HARTLEY, W.J. Selenium and ewe fertility. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 23, p. 20-27, 1963. Hernández-Alvarado S, Guzmán-Grenfell
- HERNÁNDEZ-ALVARADO, S.; GUZMÁN-GRENFELL, A.M.; HICKS, J.J. Especies reactivas de oxígeno en el espermatozoide. **Rev. Ginecol. Obstet. México**, v. 63, p. 50-54, 1995.
- HIBBERT, L.M.; RODRIGUES, H.G.D.; NOBLE, R.C. et al. Effects of age and season on sperm abnormalities in Nubian goats. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 15, p. 173, 1986.
- HICKS, J.J.; MEDINA-NAVARRO, R. Inhibitory capacity of human serum on induced microsomal lipoperoxidation. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p. 169-172, 1995.
- HICKS, J.J. **Bioquímica**. México: McGraw-Hill. 2001, 900 p.
- HINTON, B.T.; PALLADINO, M.A.; RUDOLPH, D. et al. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 731-745, 1995.
- HUTSON, J.M.; HASTHORPE, S.; HEYN, C.F. Anatomical and functional aspect of testicular descent and cryptorchidism. **Endocr. Rev.**, v. 18, p. 259-280, 1997.
- IMAI, H.; SUZUKI, K.; ISHIZAKA, K. et al. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 674-683, 2001.
- ITOH, H.; TASHIMA, Y. A novel testis-specific 105-kDa protein related to the 90-kDa heat-shock protein. **Eur. J. Biochem.**, v. 193, p. 429-435, 1990.
- ITOH, H.; TASHIMA, Y. Different expression time of the 105-kDa protein and 90-kDa

- heat-shock protein in rat testis. **FEBS Lett.**, v. 289, p. 110–112, 1991.
- JOLLY, C.; MORIMOTO, R.I. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. **J. Nat. Canc. Inst.**, v. 92, p. 1564-1572, 2000.
- KATO, H.; KOGURE, K.; LIU, X.H. et al. Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Res.**, v. 679, p. 1-7, 1995.
- KATO, K.; ITO, H.; IWAMOTO, I. et al. Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27. **Cell Stress Chap.**, v. 6, p. 16-20, 2001.
- KODAMA, H.; *et al.* Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertili. Steril.**, v. 68, n. 3, p. 519-524, 1997.
- KRAEMER, T. The influence of high ambient temperature on different parameters of semen, biochemical and endocrine parameters in bulls in a climatic chamber and in subtropical climate. Disponível em < <http://www.diss.fulberlin.de/2000/83/index.html>. Acesso em 03 fev. 2007.
- KUMAGAI, A.; KODMA, H.; KUMAGAI, J. et al. Xanthine oxidase inhibitors uppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 8, p. 118-123, 2002.
- LIU, L.; TRIMARCHI, J.R.; KEEFE, D.L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1745-1753, 2000.
- LUCCI, C.S.; MOXON, A.L.; ZANETTI, M.A.; FUKUSHIMA, R.S.; SCHALCH, E.; PETTINATI, R.L. Selênio em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. I. Níveis de selênio em soros sanguíneos. **Rev. Fac. Méd. Vet. Zoot.**, v. 21, p. 65-70, 1984a.
- LUCCI, C.S.; MOXON, A.L.; ZANETTI, M.A.; NETO, R.F.; MARCOMINI, D.G. Selênio em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. II. Níveis de selênio nas forragens e concentrados. **Rev. Fac. Méd. Vet. Zoot.**, v. 21, p. 71-76, 1984b.
- MACHADO, R.; FREITAS, A.R.; SIMPLÍCIO, A.A. et al. Flutuações sazonais e efeitos de raça no sêmen caprino. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 27., Viçosa, 2000. **Anais...**, Viçosa: SBZ, 2000.
- MARTINS, R.D.; McMANUS, C.; CARVALHEDO, A.S. et al. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 32, n. 6, suppl. 1, 2003.
- MAXWELL, W.M.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, p. 1013-1020, 1996.

- MEDINA-NAVARRO, R.; LIFSHITZ, A.; WACHER, N. et al Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. **Arch. Med.**, v. 28, p. 205-208, 1997.
- MEHLEN, P.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; ARRIGO, A. P. Small Stress Proteins as Novel Regulators Of Apoptosis Heat Shock Protein 27 Blocks Fas/Apo-1- And Staurosporine-Induced Cell Death. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 16510-16514, 1996.
- MEHLEN, P.; MEHLEN, A.; GODET, J. et al. Hsp27 as a Switch between differentiation and apoptosis in murine embryonic stem cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 31657-31665, 1997.
- MIEUSSET, R.; BUJAN, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. **Int. J. Androl.**, v. 8, p. 169-184, 1995.
- MOREIRA, P.E.; MOURA, A..A.A.; ARAÚJO, A.A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês Criados no estado do Ceará. **Rev. Bras. Zootc.**, v. 30, n. 6, 2001.
- MOURA, A.; ERICKSON, B.H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationship with testis size and number of Sertoli and germ cells in beef bulls. **J. Reprod. Fert.**, v. 111, p. 183-190, 1997.
- MÜLLER, K.; POMORSKI, T.; MÜLLER, P. et al. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 11-20, 1999.
- MULLER, E.; RODRÍGUEZ, H.M.; BRADEN, S. Testicular structure of Zebu bull in Costa Rica. **J. Vet. Med.**, v. 39, p. 382-391, 1992.
- McENTEE, K. **Reproduction pathology of domestic mammals**. 1ed., California: Academic Press, 1990, 401 p.
- McDOWELL, L.R. **Vitamins in Animal Nutrition**. New York: Academic Press, 1999, 486 p.
- NAKAI, A.; SUZUKI, M.; TANABE, M. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. **EMBO J.**, v. 19, p. 1545-1554, 2000.
- NOGUEIRA FILHO, A.; KASPRZYKOWSKI, J.W.A. **O agronegócio da caprino-ovinocultura Nordeste Brasileiro**. Série Documentos do ETENE BNB; n. 9, 56 p., 2006.
- NOGUGHI, T.; CANTOR, A.H.; SCOTT, M.L. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. **J. Nut.**, v. 103, p. 1502-1511, 1973.

- NUNES, J.F. fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 12, p. 77-83, 1988.
- OLLERO, M.; GIL-GUZMÁN, E.; LÓPEZ, M.C. et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 1912-192, 2001.
- OSINOWO, O. A.; MARRIE, B.N.; EKPE, G. A. Preliminary study of postnatal growth and reproductive tract development in Yankasa rams. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 27, p. 49-54, 1992.
- PALASZ, A. T.; CATES, W.F.; BARTH, A .D. et al. The relationship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. **Theriogenology**, n. 42. p. 715-729, 1994;
- ROSA, I.V. Deficiências minerais e desempenho reprodutivo de ruminantes. Circular técnica, n. 23, **Embrapa Gado de Corte**, 1993.
- READ, R.; BELLEW, T.; YANG, J.G.; HILL, K.E.; PALMER, I.S.; BURK, R.E. Selenium and amino acid composition of selenoprotein-P, the major selenoprotein in rat serum. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 17899-17905, 1990.
- REITER, R.J. Melatonin: Lowering the high prince of free radicals. **News. Physiol. Sci.** n. 15, p. 246- 250, 2000.
- ROTRUCK, J.T. **Discovery of the role selenium in glutathione peroxidase**. In: Spallholz JE, Martin JL, Ganther HE (eds.), *Selenium in Biology and Medicine*. Westport: AVI; p. 10-16,1981.
- SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros escroto testiculares de sêmen em caprinos adultos submetidos a insulação escrotal. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, p. 135-141, 2000.
- SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress Chap.**, v. 3, p. 228-236, 1998.
- SANTIAGO, C.M. Estudo da influência do uso de emulsão de selênio - torofenol nas vacas de corte em gestação no Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 6, n. 31, p. 23-25, 1986a.
- SANTIAGO, C.M. Estudo do efeito do uso da emulsão de selênio - torofenol na fecundidade de vacas de corte no Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 6, n. 32, p. 13-15, 1986b.
- SETCHELL, B.P. The parkes lecture heat and the testis. **J. Reprod. Fertil.**, v. 114, p. 179-194,1998.

SHARP, F.R.; MASSA, S.M.; SWANSON, R.A. Heat shock protein protection. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 97-99, 1999.

SICILIANO, L.; TARANTINO, P.; LONGOBARDI, F. et al. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. **J. Androl.**, v. 22, p. 798-803, 2001.

SILVA, P.F.N. **Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm.** 2006.178 f. (Doutorado em Medicina Veterinária) – Utrecht University, Utrecht.

SOUZA, J.A.A.T.; COSTA, F.A.L. Características do sêmen e correlação com outros parâmetros reprodutivos em ovinos deslanados. In: Simpósio em ciências agrárias – pesquisa com caprinos e ovino no CCA, 1, Teresina. **Anais...** Teresina, p. 80-86, 1992.

SCHUNEMANN, H.J.; GRANT, B.J.; FREUDENHEIM, J.L. et al. The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, v. 163, p. 1246-1255, 2001.

SCHWENKE, D.C.; BEHR, S.R. Vitamin E combined with selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations. **Circ. Res.**, v. 83, p. 366-377, 1998.

SWIERSTRA, E.E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous of the boar. Duration of spermatozoan transit through the epididymis. **Anat. Rec.**, v. 161, p. 171-185, 1968.

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

THANNICKAL, V.J.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. L1005-L1028, 2000.

THOMSON, R.G. **Patologia veterinária especial.** São Paulo: Ed. Manole, p. 695-740, 1990.

TRAMER, F.; ROCCO, F.; MICALI, F. et al. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 753-758, 1998.

TRIBBLE, D.L. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and b-carotene: A statement for healthcare professionals. **Am. Heart Assoc. Circ.**, v. 99, p. 591-595, 1999.

- TROIANO, L.; FUSTINI, M.F.; LOVAT, E. Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 97, p. 217-220, 1994.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 3 ed. London: Cab Publishing. 1999, 613 p.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 48, p. 269-278, 1997.
- UPSTON, J.M.; TARENTIS, A.C.; STOCKER, R. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. **Faseb J.** v. 13, p 977-994, 1999.
- VALLE, A.; FUENTES, A.; PUERTA, M. Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo Suizo nacidos en el trópico. **Rev. Fac. Agron.**, v. 22, p. 52-61, 2005.
- VALENTIM, L.M.; GEYER, A.B.; TAVARES, A. et al. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunoccontent and phosphorylation in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 107, p. 43-49, 2001.
- VALENTIM, L.M.; RODNIGHT, R.; GEYER, A.B. et al. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p. 379-386, 2003.
- VILAR-ROJAS, C.; GUZMÁN-GRENFELL, A.M.; HICKS, J.J. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. **Arch. Med. Res.**, v. 27, p. 1-6, 1996.
- WAITES, G.W.H.; SETCHELL, B.P. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G.E. **Marshall's physiology of reproduction**. 4 ed., Edinburgh: Churchill Livingstone, v. 2, p. 1-105, 1990.
- WANG, X.L.; RAINWATER, D.L.; VANDEBERG, J.F. Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 1190-1195, 2001.
- WINTER, J. Inhibin is released together with testosterone by humans testis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 70, p. 548-550, 1990.
- WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R. et al. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1506-1514,

1998.

YANG, J.G.; MORRISON, P.J.; BURK, R.E. Purification and quantitation of a rat plasma selenoprotein distinct from glutathione peroxidase using monoclonal antibodies.

J Biol Chem, v. 262, p. 13372-13375, 1987.

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

YVES, C. Free radicals are in fact potent oxidative stress and Alzheimer disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 621S–629S, 2000.

ZACHARA, B.A. Mammalian selenoproteins. **J Trace Elem Electrolytes Health Dis**, v. 6, p. 137-151, 1992.

ZANETTI, M.A.; LUCCI, C.S.; MEIRELLES, G.J.R. Suplementação de selênio para vacas em final de gestação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 22., 1985, Balneário Camboriú. **Anais.....Balneário Camboriú : SBZ**, 1985. p.135.

ANEXOS

Tabela 1 - Valores médios, desvios-padrão e nível de significância dos pesos dos testículos e epidídimos direito e esquerdo, durante o período de insulação escrotal (IE) e no período de recuperação da IE (PIE), de caprinos submetidos à insulação escrotal (IE) e suplementados com Selênio e Vitamina E na dieta

Grupos	Testículo Direito (g)		“p”	Grupos	Testículo Esquerdo (g)		“p”
	Dias				Dias		
	18 d IE	42 d PIE			18 d IE	42 d PIE	
	60,51 ^A	55,65			65,47 ^A	55,60	
Selevit E	±5,00	±8,35	0,839	Selevit E	±1,64	±11,97	0,217
	42,92 ^B	54,52			46,32 ^B	55,64	
Controle	±9,36	±1,19	0,100	Controle	±11,24	±10,77	0,359
“p”	0,045	0,382		“p”	0,043	0,970	

Grupos	Epidídimo Direito (g)		“p”	Grupos	Epidídimo Esquerdo (g)		“p”
	Dias				Dias		
	18 d IE	42 d PIE			18 d IE	42 d PIE	
	10,10	7,83			9,66	7,84	
Selevit E	±0,95	±1,58	0,100	Selevit E	±1,65	±1,05	0,183
	8,98	8,49			7,93	8,44	
Controle	±0,17	±1,85	0,677	Controle	±1,84	±2,38	0,785
“p”	0,115	0,658		“p”	0,292	0,712	

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem a nível de 5%;

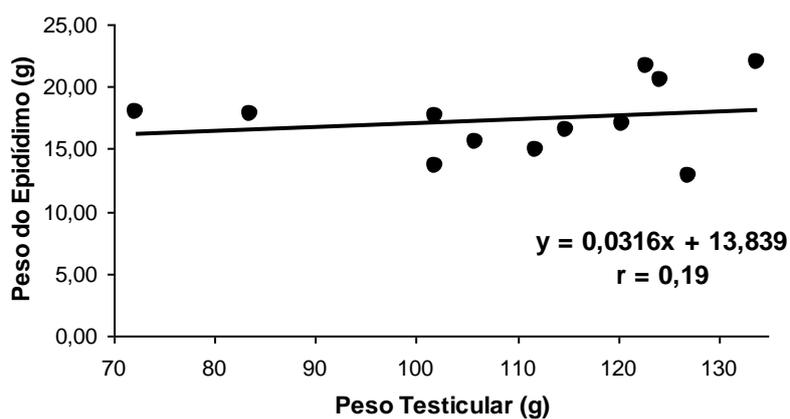
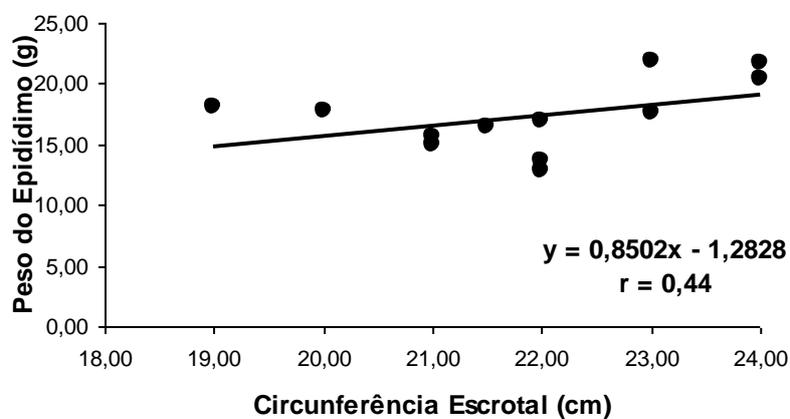
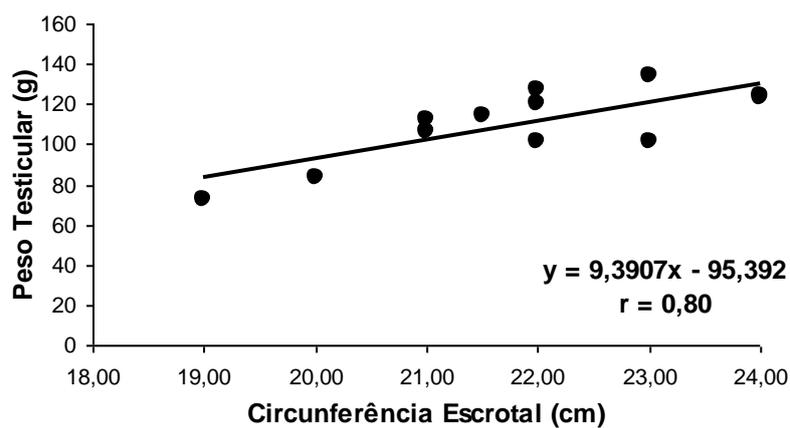


Figura 1 – Relação entre pares de variáveis do testículo de caprinos, submetidos a insulação escrotal (IE) e suplementados ou não com Selênio e Vitamina E na dieta.