



JANAINA AZEVEDO GUIMARÃES

**USO DE SELÊNIO E VITAMINA E NA PROTEÇÃO CONTRA DANOS
OXIDATIVOS SISTÊMICOS EM CAPRINOS INDUZIDOS À INSULAÇÃO
ESCROTAL**

**RECIFE
2010**

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

JANAINA AZEVEDO GUIMARÃES

**USO DE SELÊNIO E VITAMINA E NA PROTEÇÃO CONTRA DANOS
OXIDATIVOS SISTÊMICOS EM CAPRINOS INDUZIDOS À INSULAÇÃO
ESCROTAL**

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

Orientador:
Prof. Dr. Pierre Castro Soares

Co-orientadoras:
Dr^a. Carla Lopes de Mendonça
Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra

**RECIFE
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

G963u

Guimarães, Janaina Azevedo

Uso de selênio e vitamina e na proteção contra danos oxidativos sistêmicos em caprinos induzidos à insulação escrotal / Janaína Azevedo Guimarães. – 2010.

83 f. il.

Orientado por: Pierre Castro Soares.

Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.

Referências.

1. Caprinos 2. Estresse calórico 3. Metabolismo oxidativo 4. Testículo 5. Sangue I. Soares, Pierre Castro, orientador

II. Título

636.390896

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

**USO DE SELÊNIO E VITAMINA E NA PROTEÇÃO CONTRA DANOS
OXIDATIVOS SISTÊMICOS EM CAPRINOS INDUZIDOS À INSULAÇÃO
ESCROTAL**

Dissertação de Mestrado elaborada por
JANAINA AZEVEDO GUIMARÃES

Aprovada em: 26/02/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pierre Castro Soares
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr^a. Carla Lopes de Mendonça
Clínica de Bovinos – Campus Garanhuns – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Érica Christina Santos Oliveira
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

*Dedico esta conquista a Deus.
“Nunca me deixes esquecer que
tudo o que tenho, tudo o que
sou e o que vier a ser, vem de
tí Senhor!” Ana Paula
Valadão Bessa*

*Solange Azevedo, minha mãe, e
Rozenilda Azevedo, minha avó,
corações que batem fora do
meu peito. A vocês dedico!*

*A Alexandre C. Dantas, meu
esposo, obrigada por todo
amor, dedicação e
companheirismo. Agradeço a
Deus por tê-lo ao meu lado.*

*Á Tiara, Tina, Juan e Vida,
obrigada por tornarem esta
jornada mais leve e por
permitirem que eu fizesse parte
da matilha.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu pai e protetor. Obrigada por estar sempre ao meu lado fazendo-se presente em todos os momentos da minha vida. Mesmo nos momentos mais difíceis, Tu, Pai querido, tens me ensinado que “Todas as coisas cooperam para o bem dos que amam a Ti”.

À minha família, aqui representada por Solange Azevedo, Carlos Lago (*in memoriam*) Rozenilda Azevedo, Alexandre Dantas, Tereza Santos, Déborah Santos, Eliel Azevedo, Habythy Azevedo, Ramon Azevedo, Rebeca Azevedo, Maria Alice Dantas, Rinaldo Dantas, Ana Letícia Dantas, Carmem Cruz, Silvia Gonçalves, e Lurdes Gonçalves. Obrigada por serem o meu aconchego, por serem tão compreensivos com tantas ausências e por me fazerem sentir amada.

Aos meus colegas de residência na Clínica de Bovinos de Garanhuns / UFRPE, Alexandre Dantas, Antônio Carlos, José Simonal e Eduardo Guaraná. Começamos juntos o sonho da Pós-Graduação. Obrigada pelo bom convívio, por serem verdadeiros amigos e por me darem a oportunidade de compartilhar momentos inesquecíveis.

Aos amigos Juliana Nunes, Anne Grace Campos, Rogério Adriano, Nazaré Alves e Betânia Alves pela amizade incondicional.

Às minha amigas da CBG/UFRPE, Selma, Jeane e Ciane. Obrigada pela amizade e descontração tão necessárias para enfrentar esta caminhada.

Aos amigos e colegas de trabalho Nivan Antônio e Luiz Teles pelo carinho e companheirismo. A Dr. Nivaldo Costa e Dra. Isabel Souza pelo carinho e Dr. José Augusto pela dedicação e ensinamentos durante minha jornada na CBG.

Ao Prof. Pierre Castro Soares pela oportunidade, confiança e principalmente compreensão quando iniciamos o nosso trabalho na Clínica de Bovinos de Garanhuns / UFRPE.

À Dr^a. Carla Lopes de Mendonça pela amizade, carinho, atenção, dedicação, e ensinamentos desde o primeiro estágio que realizei na CBG /UFRPE até hoje, onde pude contar com sua co-orientação.

Aos novos amigos Allan, Álvaro e Felipe, pelo apoio, amizade e companheirismo.

À Prof^a. Maria Madalena P. Guerra e Guadalupe Xavier pela oportunidade.

À FACEPE pela concessão da bolsa de mestrado e apoio ao projeto aprovado, mediante edital FACEPE / MCT / CNPQ / CT – INFRA - PROGRAMA PRIMEIROS PROJETOS – N^o do Processo: APQ - 0346-5.05/06.

“Sonhos, quem nunca teve um sonho pra sonhar? Eu sei que muitos cansam de esperar e perdem até, a fé em Deus. Sonhos, na vida de quem guarda sua fé, é só uma questão de tempo, nunca aconteceu de Jesus abandonar um filho seu.”

Sérgio Lopes

RESUMO

Para avaliar o efeito da suplementação com Selênio e Vitamina E na dieta de caprinos submetidos à insulação escrotal (IE) sobre o perfil de indicadores bioquímicos do metabolismo oxidativo sistêmico, utilizaram-se 12 animais os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (G1= sem suplementação; G2 = suplementados com Selênio e Vitamina E). A suplementação foi iniciada 60 dias antes da indução da insulação escrotal (IE). Ao término do período de adaptação de 30 dias, iniciou-se a IE com colocação de bolsas plásticas nos testículos durante 18 dias. A suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E para os animais do G2 foi mantida durante 42 dias após o término da IE, correspondendo à fase pós-insulação (PIE). Amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular para análise de glutathiona reduzida (GSH), substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS-MDA) e determinação da habilidade de redução férrica plasmática (FRAP). Verificou-se diminuição significativa da GSH no período da IE e, posteriormente, no período PIE, ocorreu um aumento gradativo desta variável. Não houve diferença estatística entre grupos. Quanto a determinação de TBARS, não houve diferenças significativas entre tratamentos e momentos de coleta. Foram registradas diferenças estatísticas do FRAP para os momentos de coleta. Sendo observadas menores médias no 12º e 18º dia da IE. Não foram observadas diferenças entre os grupos. O uso suplementar dietético de Selênio e Vitamina E não diminuiu a concentração de radicais livres formados em condição de insulação escrotal, no entanto o modelo de indução de estresse térmico testicular foi eficiente em promover estresse oxidativo sistêmico. O método FRAP pode ser recomendado como indicador bioquímico do metabolismo oxidativo em caprinos com insulação escrotal.

Palavras-chave: Testículo, caprino, estresse térmico, enzimas, antioxidantes.

ABSTRACT

To evaluate the effect of supplementation with selenium and vitamin E in the diet of goats submitted to scrotal insulation (IE) on the profile of biochemical markers of systemic oxidative metabolism, we used 12 animals which were randomly divided into two groups (G1 = no supplementation G2 = supplemented with selenium and vitamin E). The supplementation started 60 days before the induction of insulation (IE). At the end of the induction period of 30 days, began to IE with placement of plastic bags in the testes for 18 days. Supplementing with Selenium and Vitamin E for the animals of G2 was maintained for 42 days after the end of IE, corresponding to the post-insulation (PIE). Blood samples were obtained by jugular venipuncture for analysis of reduced glutathione (GSH), thiobarbituric acid reactive substance (TBARS-MDA) and determining the ferric reducing ability of plasma (FRAP). There was a significant decrease in GSH during the IE and then in the PIE, there was a gradual increase of this variable. There was no statistical difference between groups. The determination of TBARS, no significant differences between treatments and times of collection. We recorded significant differences in FRAP for collection times. As observed in the lower mean 12 and 18 days of IE. There were no differences between groups. The use of supplemental dietary selenium and vitamin E did not reduce the concentration of free radicals formed in a position to scrotal insulation, however the model of induction of testicular heat stress was effective in promoting systemic oxidative stress. The FRAP method can be recommended as a biochemical marker of oxidative metabolism in goats with insulation.

Keywords: Testis, goat, heat stress, enzymes, antioxidants.

LISTA DE TABELAS

Quadro 1-	Protocolo de adaptação e períodos correspondentes da indução da insulação escrotal e pós-insulação escrotal em caprinos suplementados ou não com selênio e vitamina E	51
Tabela 1-	Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (P) da atividade da glutathiona reduzida (GSH) (mg/mL) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E	57
Tabela 2-	Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (P) da concentração sérica de malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E	60
Tabela 3-	Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (P) da habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Perfil das médias da atividade da glutathiona reduzida (mg/100 mL de sangue) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E 58
- Figura 2- Perfil das médias da concentração sérica de malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E 61
- Figura 3- Perfil das médias da habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E 64

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1.	Metabolismo Oxidativo	17
2.1.1.	Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)	17
2.1.2.	Geração das EROs	19
2.1.3.	Tipos de EROs	20
2.1.4.	Espécies Reativas Derivadas do Nitrogênio	22
2.1.5.	Espécies Reativas Derivadas do Cloro	23
2.1.6.	Mecanismos de Defesa Antioxidante	24
2.1.7.	Estresse Oxidativo	30
2.2.	Insulação Testicular	33
2.3.	Selênio e Vitamina E	38
2.3.1.	Selênio	38
2.3.2.	Vitamina E	40
2.3.3.	Atuação do Selênio e da Vitamina E	42
2.4.	Avaliação do Estresse Oxidativo	45
3.	OBJETIVOS	48
3.1	Gerais	48
3.2	Específicos	48
4.	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Local de Realização do Experimento	49
4.2	Delineamento Experimental	49
4.2.1	Animais / Alimentação	49
4.2.2	Suplementação com selênio e vitamina E	49
4.2.3	Insulação Escrotal	50
4.2.4	Colheita das Amostras	50
4.3.	Métodos Analíticos	52
4.3.1.	Teor Sérico de TBARS (MDA)	52

		14
4.3.2.	Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH) eritrocitária	52
4.3.3.	Habilidade de Redução Férrica Plasmática (HRFP)	53
4.4.	Análise Estatística	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5. 1.	Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) nos eritrócitos	54
5.2.	Concentração Sérica de TBARS (MDA)	58
5.3.	Habilidade de Redução Férrica Plasmática (HRFP)	61
5.4.	Técnica de Insulação Escrotal Como Indutora de Estresse Oxidativo Sistêmico	64
6.	CONCLUSÕES	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro tem sido destacado durante séculos como área de vocação para a exploração de ruminantes domésticos, notadamente caprinos e ovinos, pelo potencial da vegetação natural para a manutenção e sobrevivência dos animais destas espécies. Nesta região tanto os animais machos como as fêmeas não apresentam sazonalidade reprodutiva, não sendo o fotoperíodo fator limitante para sua reprodução (LEITE e SIMPLÍCIO, 2005).

Até o ano de 2008 o rebanho caprino brasileiro era estimado em 9,3 milhões de cabeças, com cerca de 90% deste total localizados na Região Nordeste, constituindo um rebanho com aproximadamente 8,5 milhões de animais (IBGE, 2008). No entanto, deve-se registrar que o fato de os animais apresentarem potencial produtivo permanente ao longo do ano, e de o nordeste possuir o maior rebanho efetivo brasileiro, não atendem aos requisitos básicos de uma atividade voltada para as demandas que se manifestam em um mercado moderno e cada vez mais exigente (LEITE e SIMPLÍCIO, 2005).

O rebanho nordestino ainda apresenta índices zootécnicos baixos, devido, principalmente, à nutrição inadequada durante o período seco, quando há uma acentuada queda na produção de forragens, associada às deficiências minerais e vitamínicas (GUIMARÃES et al., 1992; LÔBO, 2005), além de fatores particulares em relação ao estresse térmico calórico a que os animais são diretamente submetidos em determinadas épocas do ano. Embora os caprinos adaptem-se bem tanto em ambientes mais favoráveis ao seu desenvolvimento quanto às mais extremas condições climáticas, de aridez e de limitações topográficas como áreas de montanha, sabe-se que a temperatura ambiente elevada tem sido freqüentemente apontada como um dos principais fatores adversos ao bom desempenho produtivo e reprodutivo de animais de interesse pecuário (SANTOS, 1995), especialmente daqueles criados em regiões com maiores índices térmicos, como os encontrados no semi-árido do estado de Pernambuco.

Como já conhecido, as variações estacionais provocam mudanças na atividade sexual dos machos, e na produção qualitativa e quantitativa do sêmen por meio da interação de fatores, como disponibilidade de alimentos, temperatura, fotoperíodo e atividade hipofisária (JENNINGS, 1976). Dentre esses, se destaca a temperatura,

uma vez que a intensidade do estresse térmico pode provocar falhas nos mecanismos de termorregulação testicular, favorecendo a degeneração do epitélio seminífero e, conseqüentemente, a espermatogênese (SANTOS et al., 1998). No entanto, poucos estudos indicam o agente causador desta alteração. Pesquisas recentes (NICHI, 2003; XAVIER, 2007) têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo como complicador dos danos provocados pelo estresse térmico testicular.

Como se sabe, a causa mais freqüente de degeneração testicular em animais é o estresse térmico calórico (BLANCHARD e VARNER, 1993; NICHI, 2003), sendo assim, torna-se importante conhecer, não só o efeito deletério que o estresse térmico causa aos testículos, mas também as modificações orgânicas que possam ser estabelecidas como mecanismo de desequilíbrio sistêmico, predispondo os animais a diferentes tipos de alterações.

Muitos estudos evidenciaram que, em casos de temperatura ambiente elevada, os mecanismos fisiológicos de termorregulação testicular não são suficientes para manter a temperatura ideal para o funcionamento da gônada masculina, determinando sua degeneração. Em condições experimentais, a insulação escrotal é um bom método para o estudo das alterações causadas pela degeneração, pois com o aumento da temperatura ocorrem mudanças na tensão intratesticular, circulação do sangue, linfa, além dos fluidos extra e intratesticulares (FLORENTINO et al. 2003a).

Não se tem conhecimento de nenhuma pesquisa realizada no campo da bioquímica clínica de caprinos sob estresse térmico testicular, a fim de determinar, com acurácia, os efeitos desse fator de estresse sobre o organismo como um todo e suas implicações na produção e reprodução animal, principalmente, no que se refere à produção de espécies reativas de oxigênio. Santos e Simplício (2000), Florentino et al. (2003a) e Xavier (2007), demonstraram que a ocorrência de processo degenerativo é marcante em caprinos quando induzidos a insulação escrotal, porém o conjunto de variáveis avaliadas foi particular ao parênquima testicular e ao sêmen.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. METABOLISMO OXIDATIVO

2.1.1. Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)

Atualmente existe um crescente interesse nos estudos com espécies reativas do oxigênio, em virtude de ter sido demonstrado que vários sistemas sofrem modificações funcionais devido aos danos causados por sua elevada produção, interferindo nas suas estruturas e funções (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; RIVLIN et al. 2004; JOHNSON et al. 2005).

As EROs são também chamados de radicais livres. Este termo refere-se a átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons na última camada que lhes confere alta reatividade e faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima, com capacidade de reagir rapidamente com diversos compostos podendo atacar alvos celulares (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; JORDÃO JÚNIOR et al. 1998; SHARMA et al. 1999; BIANCHI e ANTUNES, 1999; VOET, et al. 2000; SILVA et al. 2008).

Uma vez formados, os radicais livres (RL) interagem com outras moléculas através de reações redox, com o propósito de atingir uma configuração eletrônica estável. Em uma reação redox ocorre transferência de elétrons entre as espécies químicas participantes. Uma delas cede elétrons livres (processo denominado oxidação) e outra, necessariamente, os recebe (processo denominado redução). Toda oxidação de uma espécie química implica na redução de outra. A molécula que cede elétrons recebe o nome de agente redutor e a molécula receptora se chama agente oxidante. Quando um RL reage com uma molécula ele pode ceder ou captar elétrons, ou simplesmente pode unir-se a ela. Em qualquer destes casos a molécula se converte em um RL e se inicia uma reação em cadeia onde um RL gera outro RL (CHIHUAILAF et al. 2002), podendo resultar em morte celular e tecidual (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; JORDÃO JÚNIOR, 1998; SHARMA et al. 1999; VOET, et al. 2000; SILVA et al. 2008).

O elemento oxigênio molecular (O_2) pode ser considerado um radical livre, já que apresenta desemparelhamento de elétrons na sua última camada eletrônica, o

que lhe confere uma alta reatividade (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999, citado por SILVA et al. 2008). Entretanto, o oxigênio atmosférico, embora sendo um radical, não é reativo com moléculas biológicas, pois seus dois orbitais eletrônicos têm o mesmo estado em relação ao “spin” (JORDÃO JÚNIOR et al. 1998).

Para Ferreira e Matsubara (1997), radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, sendo estes chamados não radicalares. Como na sua maioria esses agentes são derivados do metabolismo do O_2 , é mais indicado utilizar o termo Espécie Reativa do Oxigênio (ERO).

Embora a maioria dos agentes reativos seja derivada do oxigênio, também são conhecidas e sintetizadas, durante o metabolismo normal, espécies derivadas do nitrogênio como o óxido nítrico ($NO\cdot$), o dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$) e o peroxinitrito ($ONOO\cdot$); espécies derivadas do cloro, como ácido hipocloroso ($HOCl$), o cloreto de nitrila (NO_2Cl) e as cloraminas; espécies derivadas do enxofre, como os radicais tiílas ($RS\cdot$) e as espécies derivadas de metais como o Fe, o Cu e o Mn, que são capazes de catalisar as reações dos radicais livres (VASCONCELOS et al. 2007).

As EROs podem ser geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana (BIANCHI e ANTUNES, 1999). No entanto, a principal fonte intracelular de EROs é a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial durante a fosforilação oxidativa (BEATTIE, 2003; BRENNEISEN, et al. 2005; JOHNSON et al. 2005).

Elas são formadas constantemente em sistemas aeróbicos, durante o processo de respiração celular, no processo de geração de energia para contração muscular e secreção hormonal, bem como no processo de fagocitose de bactérias por macrófagos, monócitos e neutrófilos (PENG, et al. 2000; BEATTIE, 2003); espécies tóxicas de oxigênio também são produzidos por peroxissomos, pelo sistema citocromo P450, localizado no retículo endoplasmático de células hepáticas e do intestino delgado que tem a finalidade de participar do metabolismo de compostos xenobióticos (BEATTIE, 2003; SILVA et al. 2008) e durante o processo de reperfusão de tecidos isquêmicos com sangue oxigenado (FRANCISCO NETO et al. 2005; GUIMARÃES et al. 2007).

Muitas vezes estes agentes são de extrema utilidade, e participam de processos vitais, podendo-se citar a fagocitose como parte do sistema de defesa imunológico, nos processos de desintoxicação e nos processos que desencadeiam o

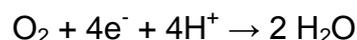
relaxamento do endotélio (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). O óxido nítrico, por exemplo, é conhecido como um regulador da atividade de fatores de transcrição e outros determinantes de expressão gênica. O peróxido de hidrogênio e o superóxido têm efeitos intracelulares similares. Citocinas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores usam as EROs como mensageiros intracelulares secundários (NORDBERG e ARNÉR, 2001; BRENNEISEN, et al. 2005).

2.1.2. Geração das EROs

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1999) citado por Silva et al. (2008), o oxigênio (O₂) que é respirado é metabolizado no organismo da seguinte maneira: aproximadamente 85 a 90% são utilizados pela mitocôndria através da cadeia de transporte de elétrons, e os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação direta. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas da citocromo c, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao O₂ para formar água (em torno de 95 a 98% dos 85 a 90% citados acima). Os 2 a 5% restantes são reduzidos univalentemente em EROs.

A etapa final da oxidação geral dos alimentos resulta na formação de NADH e FADH. A cadeia de transporte de elétrons oxida esses cofatores reduzidos por meio da transferência de elétrons, em uma série de etapas para o O₂, o acceptor final de elétrons, ao mesmo tempo em que captura a energia livre das reações de oxidação-redução para dirigir a síntese de ATP. Os vários transportadores de elétrons envolvidos na transferência de elétrons do NADH para o O₂ até formar água (H₂O) ficam agrupados em quatro grandes complexos enzimáticos com múltiplas subunidades (complexos I-IV) que catalisam diferentes reações parciais da cadeia de transporte de elétrons (Reação 01) (BEATTIE, 2003; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Reação 01 – redução tetravalente do oxigênio:



A estrutura eletrônica do O₂ favorece sua redução por adição de um elétron de cada vez (conversão univalente), o que favorece a geração de EROs (BEATTIE, 2003; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al. 2007), pois, embora a redução dos quatro elétrons do O₂ pela citocromo c oxidase seja quase sempre

executada com grande rapidez e precisão, o O_2 é, algumas vezes, reduzido apenas de modo parcial, produzindo as EROs (VOET et al. 2000).

2.1.3. Tipos de EROs

a) Radical Superóxido

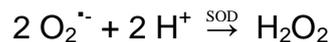
A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Reação 02:



Este radical ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima dos neutrófilos, monócitos e eosinófilos, num processo conhecido como explosão respiratória (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BEATTIE, 2003). Este processo é essencial para a função bactericida destas células, tanto que diversos estudos (SMITH et al. 1984; SMITH et al. 1997; WICHTEL, 1998; CIARLINI et al. 2002; LOPES et al. 2003; PASCHOAL et al. 2003; REIS et al. 2005) têm demonstrado que a deficiência no metabolismo oxidativo dos neutrófilos, torna os indivíduos mais susceptíveis à infecções e, até mesmo, ao parasitismo por vermes gastrintestinais. Em condições fisiológicas ele é gerado principalmente nas mitocôndrias, microssomas e peroxissomas. Também é gerado através de enzimas como a xantina oxidase e NADPH oxidase (NORDBERG e ARNÉR, 2001; ANDRADE JÚNIOR et al. 2005; VASCONCELOS, et al. 2007). Apresenta meia vida mais longa que o radical hidroxila, podendo reagir com as moléculas por mais tempo, no entanto ele apresenta uma baixa reatividade molecular, e é duvidosa sua capacidade de produzir danos significativos às estruturas celulares, pois não tem habilidade de penetrar em membranas lipídicas, agindo apenas no local de formação (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Todavia, de acordo com Andrade Júnior, et al. (2005), as reações desencadeadas pelo radical superóxido podem gerar radicais hidroxila e peroxil e em meio ácido este radical pode formar peróxido de hidrogênio. Ele também pode reagir com o óxido nítrico para formar o peroxinitrito.

b) Peróxido de Hidrogênio

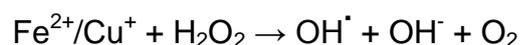
O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através do processo chamado dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos. Reação 03:



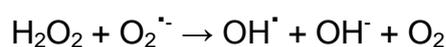
O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre verdadeiro, pois não apresenta elétrons desemparelhados em sua última camada (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ANDRADE JÚNIOR et al. 2005). Segundo Vasconcelos et al. (2007), trata-se de um agente oxidante e redutor fraco. No entanto, é considerado um metabólito do oxigênio extremamente deletério por apresentar meia-vida longa e devido a sua habilidade de penetrar membranas biológicas e iniciar o processo de peroxidação lipídica (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Também tem relevância sua participação na reação que produz o radical hidroxila, o mais lesivo e mais reativo radical conhecido, tanto durante o processo de redução tetravalente do O_2 , quanto reagindo com metais redox-ativos como o ferro e o cobre na reação conhecida como reação de Fenton (ANDRADE JÚNIOR, 2005; VASCONCELOS et al. 2007). Uma ação benéfica do radical é carrear, para fora da célula, moléculas de sinalização intracelular (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

c) Radical Hidroxila

Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxila (OH^\cdot). Este radical também pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre. Essa reação é conhecida como reação de Fenton. Reação 04:



Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo a produção de radical hidroxila (Reação 5), a chamada Reação de Haber-Weiss. Reação 05:



O radical hidroxila é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima (NORDBERG e ARNÉR, 2001; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al. 2007). É o que apresenta a meia vida mais curta, o que justifica sua maior instabilidade e maior rapidez em retirar elétrons de outras moléculas (ANDRADE JÚNIOR et al. 2005). Esta ERO reage amplamente com aminoácidos, fosfolípidos, ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e ácidos orgânicos. Assim, pode levar a mutação ou inativação do DNA, inativar várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto e também pode iniciar a oxidação de ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares ocasionando lipoperoxidação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al. 2007).

d) Oxigênio Singlete e Ozônio

Outras EROs de interesse são os oxigênio singletes, que são formas de oxigênio spin-alteradas, e o ozônio (VASCONCELOS et al. 2007). O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é uma forma excitada do oxigênio molecular, produzido por reações fotoquímicas pela exposição à radiação ionizante, luz ultravioleta ou luz visível sobre os tecidos. Ele não possui elétrons desemparelhados em sua última camada, mas mesmo assim reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos de membrana, iniciando processos de peroxidação. Por ser muito instável, possui meia-vida curta, tendo, entretanto, um poder destrutivo intenso (VASCONCELOS et al. 2007; SILVA et al. 2008). Quanto ao ozônio (O_3), este é produzido no ar atmosférico poluído e por alguns equipamentos. Ele é extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos (VASCONCELOS et al. 2007).

2.1.4. Espécies Reativas Derivadas do Nitrogênio

Além do oxigênio, o nitrogênio também participa da estrutura dos radicais livres de importância para a saúde, sendo então denominadas de espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERNs) (LEITE e SARNI, 2003). Dentre estas, merece destaque o óxido nítrico, também chamado de monóxido de nitrogênio (NO^*). Ele é

sintetizado nos organismos vivos pela enzima óxido nítrico sintetase, que converte o aminoácido L-arginina a NO^\cdot + L-citrulina. É um radical abundante que age em uma variedade de processos biológicos, incluindo relaxamento muscular, neurotransmissão e regulação imune. É considerado o membro mais estranho da família das EROs. Originalmente foi identificado como fator relaxante derivado do endotélio, é um potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial (NORDBERG e ARNÉR, 2001; VASCONCELOS et al. 2007). Segundo Nordberg e Arnér (2001), o óxido nítrico tem ainda a capacidade de inibir a peroxidação lipídica em membranas biológicas devido a sua capacidade de reagir com outras EROs menos reativas. Ele funciona também como mensageiro intracelular e devido a sua capacidade de ultrapassar membranas também funciona como transmissor de sinais entre células. Seu efeito tóxico como RL, contribui de modo importante para a lesão tecidual que ocorre nos processos inflamatórios crônicos, na sepse e na síndrome da lesão por isquemia e reperfusão (LEITE e SARNI, 2003).

Outra espécie derivada do nitrogênio é o peroxinitrito (ONOO^\cdot), formado pela reação do radical superóxido com o óxido nítrico. Ele é considerado um oxidante potente, bastante instável, com tempo de vida curto e com propriedades semelhantes ao radical hidroxila. Causa danos a muitas moléculas biológicas, inclusive a grupos S-H das proteínas, provoca hidroxilação e nitração de compostos aromáticos. Também tem capacidade de formar radicais hidroxilas independente da presença de metais de transição. Em presença de CO_2 o peroxinitrito forma o peroxicarboxilato nitroso (ONOOCO_2^\cdot) que tem importância devido a sua capacidade de formar o ânion radical carbonato (CO_3^\cdot), que é mediador de diversas reações de oxidação e nitração (NORDBERG e ARNÉR 2001; VASCONCELOS et al. 2007).

2.1.5. Espécies Reativas Derivadas do Cloro

O cloro também dá origem a espécies reativas e dentre elas destaca-se o ácido hipocloroso (HOCl). Esta é uma espécie não radicalar, membrana permeável que oxida um grande número de compostos biológicos, como tióis e tioéteres, aminas, fenóis e ligações insaturadas. Mais seletivo que o radical hidroxila, oxida ferro e proteínas. Pode reagir com o radical superóxido e formar o radical hidroxila (VASCONCELOS et al. 2007). O ácido hipocloroso é formado através da

peroxidação de íons cloro catalisado pela enzima mieloperoxidase em peroxissomos de neutrófilos, macrófagos ou monócitos ativados por células infectadas com vírus ou bactérias (HURST et al. 1991). Para destruir células infectadas, as células de defesa geram uma descarga oxidante composta basicamente por peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e óxido nítrico, além do ânion superóxido (CHIHUAILAF et al. 2002).

2.1.6. Mecanismos de Defesa Antioxidante

A produção contínua de EROs e ERNs durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares de espécies reativas e impedir a indução de danos (BIANCHI e ANTUNES, 1999; BEATTIE, 2003).

De acordo com Sies (1993), uma ampla definição de antioxidante é qualquer substância, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, que atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (SIES, 1993; BIANCHI e ANTUNES, 1999). O primeiro grupo inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase. O segundo grupo é constituído por compostos sintetizados pelo próprio organismo como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor da vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides) (WRIGHT et al., 1981; SIES, 1993; HALOVSKÁ et al., 1996; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al. 2007).

Outra forma de classificar os antioxidantes é quanto a sua forma de atuação. Nesta classificação uma linha de defesa atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido-ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd), pela GSH-Px, α -tocoferol, carotenóides, flavonóides, transferrina, bilirrubina e coenzima-Q, entre

outros. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BIANCHI e ANTUNES, 1999; SILVA et al. 2008).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos, valendo salientar que a composição das defesas antioxidantes difere entre tecidos, entre tipos celulares e possivelmente de célula a célula do mesmo tipo, em um dado tecido (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004), e seu desempenho vai depender de fatores como o tipo de radical livre formado e onde e como são gerados esses radicais. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em um determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes também são capazes de interceptar radicais livres formados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SILVA et al. 2008).

a) Mecanismo de Defesa Antioxidante Enzimático

Catalase

A catalase é uma enzima cujo sítio ativo contém o grupo heme. Está presente principalmente no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlet (VASCONCELOS et al. 2007). Sua função é catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular. Devido a sua localização no peroxissoma, ela também está relacionada com o processo de detoxificação de diferentes substratos. Outra função antioxidante da catalase é diminuir o risco de formação de radicais hidroxila via reação de Fenton, uma vez que ela elimina o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Glutationa

A família de glutaciona peroxidase apresenta-se sob quatro formas. A GSH-Px 1 ou clássica que é encontrada no citosol de todas as células do organismo; a GSH-Px 2 ou gastrointestinal é específica do trato gastrointestinal; a GSH-Px 3 ou plasmática ou extracelular é encontrada no fluido de revestimento interno do pulmão e no plasma; e a GSH-Px 4 que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo também o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais a base timina do DNA (NORDBERG e ARNÉR, 2001; VASCONCELOS et al. 2007). De acordo com Nordberg e Arnér (2001), também foi encontrada atividade enzimática da GSH-Px 4 em células espermáticas.

A GSH-Px é considerada uma metaloenzima, cuja estrutura está formada por 4 g/mol de selênio (Se) por cada mol de enzima. A função da GSH-Px é catalisar a redução do H_2O_2 e outros peróxidos à água ou álcool na presença da glutaciona reduzida (GSH). A GSH é uma flavoproteína (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) a qual atua como agente redutor ao ceder um átomo de hidrogênio (H^+), transformando-se em glutaciona oxidada ou dissulfeto de glutaciona (GSSG). Nesta reação são liberadas duas moléculas de água e o metabólito oxigenado é inativado (CEBALLOS e WITTEWER, 1996; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; CEBALLOS, et al. 1999). A GSH é considerada um dos agentes antioxidantes mais importantes do sistema de defesa antioxidante celular (SIES, 1993; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento sulfidril (-SH), presente na cisteína.

A recuperação da GSH é feita pela enzima glutaciona-redutase (GSH-Rd), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Habitualmente a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos. Visto que a GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH) e, portanto, também depende da integridade das vias da pentose, condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GSH-Rd (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Superóxido-Dismutase

A superóxido-dismutase (SOD) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Os mamíferos têm três isoenzimas diferentes da SOD que catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio. A forma citosólica da SOD contém cobre e zinco no seu sítio ativo, assim como a forma extracelular da enzima; entretanto, existe uma forma mitocondrial com manganês no seu sítio ativo (BEATTIE, 2003; NORDBERG e ARNÉR, 2001; VASCONCELOS et al. 2007). Na reação catalisada pela SOD, duas moléculas do radical superóxido formam peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, o que faz de sua atividade uma fonte de peróxido de hidrogênio celular (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

A ação conjunta das enzimas CAT, SOD e GSH-Px, evita o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, para que não haja formação do radical hidroxila, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

b) Sistema de Proteção Antioxidante Não Enzimático

Coenzima Q

O segundo grupo de antioxidantes é aquele não enzimático, também conhecido por agir na reparação da lesão ocorrida. Dentre estes tem-se a coenzima Q ou ubiquinona. Sua forma antioxidante é o ubiquinol (CoQH_2), produto da redução da CoQ, que tem a função de inibir a iniciação da peroxidação lipídica, com conseqüente impedimento da formação de radicais peroxila. Além disso, a CoQ regenera a vitamina E do radical tocoferila. Ela desempenha papel central na cadeia respiratória mitocondrial, na cadeia de transporte de elétrons extra-mitocondrial, participa da regulação da permeabilidade, diminui a oxidação de proteínas de membrana, previne a oxidação do DNA e impede a disfunção endotelial, provavelmente por aumentar a disponibilidade de óxido nítrico. A atividade antioxidante do CoQH_2 depende, não somente da sua concentração total, mas também do seu estado redox, ou seja, da proporção de CoQH_2 em relação à CoQ total (CHIHUAILAF et al. 2002; VASCONCELOS et al. 2007).

Ácido Úrico

Outro composto antioxidante não enzimático é o ácido úrico (URH_3). Este, em pH fisiológico é dissociado a urato (UrH_2^-), que possui atividade antioxidante, uma vez que reage com radicais peroxila antes que estes penetrem na membrana celular e iniciem o dano. Eles também possuem atividade de quelante de metais de transição e previnem a oxidação da vitamina C (VASCONCELOS et al. 2007).

β -Caroteno

O β -caroteno é um carotenóide presente em muitos alimentos, particularmente frutas e vegetais. As propriedades antioxidantes dos carotenóides estão relacionadas à sua capacidade de capturar radicais e outras espécies, como o oxigênio singlete, em baixas concentrações e em baixa pressão parcial de oxigênio, tais como aquelas da maioria dos tecidos sob condições fisiológicas (BIANCHI e ANTUNES, 1999; VASCONCELOS et al. 2007). O β -caroteno é o principal precursor da vitamina A, que também possui atividades antioxidantes. Em bovinos a capacidade de conversão de β -caroteno em vitamina A é de 24%, ou seja, cada 1 mg de β -caroteno equivale a 400 UI de vitamina A (BIANCHI e ANTUNES, 1999; TAVAROL, 2004).

Proteínas de Transporte de Armazenamento de Íons Metálicos

Um componente adicional do sistema de defesa antioxidante não enzimático são as proteínas de transporte e armazenamento de íons metálicos, cuja ação é seqüestrar e limitar a exposição a íons Fe^{3+} e Cu^{2+} , já que seus excessos promovem a geração de íons hidroxila através da reação de Fenton. As proteínas que cumprem esta função são a ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina e carnosina (CHIHUAILAF et al. 2002).

Transferrina

A transferrina é uma betaglobulina sintetizada pelo fígado, responsável pelo transporte de ferro no plasma (SMITH, 1997). O ferro obtido da dieta pode ser o Fe^{3+}

(férico) ou Fe^{2+} (ferroso). Para entrar na célula duodenal é necessário que o Fe esteja na forma reduzida. No interior do eritrócito é oxidado a Fe^{3+} e em seguida é reduzido a Fe^{2+} , para circular no plasma inicialmente ligado a ceruloplasmina, que novamente o oxida para que seja captado pela transferrina e daí é transportado para o fígado, onde é armazenado e distribuído para as células (VASCONCELOS et al. 2007).

Ceruloplasmina

A ceruloplasmina é uma α -2 globulina sintetizada pelo fígado que possui em sua molécula seis átomos de cobre. Sua principal função é o transporte de cobre no plasma desde o fígado até os tecidos (CHIHUAILAF et al. 2002; ROSA e MATTIOLI, 2002; VASCONCELOS et al. 2007). O Cu^{2+} , obtido da dieta, é quelado pelo aminoácido histidina e absorvido no duodeno. É transportado ao fígado ligado a albumina e lá é incorporado na proteína ceruloplasmina e então distribuído para as células (VASCONCELOS et al. 2007).

Vitamina C

A vitamina C ou ácido ascórbico também é um componente do sistema de defesa antioxidante não enzimático. Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95% da vitamina C (AsCH_2) encontra-se na forma de ascorbato (AsC^-), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um H^+ ou $[\text{H}^+ + e^-]$ para um radical. O ascorbato atua como antioxidante sobre ERO e ERN, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato (Asc^-), ou ascorbila, pouco reativo. Atua eficientemente sobre o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, o hipoclorito (ClO^-) e os radicais hidroxila e peroxila. O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana. Além disso, ele pode regenerar o ânion radical urato, fechando o ciclo de atuação antioxidante do mesmo (CHIHUAILAF et al. 2002; VASCONCELOS et al. 2007). Apesar de sua propriedade antioxidante, o ascorbato pode desempenhar efeito de um potente pró-oxidante em presença de

excessivas concentrações de íons Fe^{3+} e Cu^{2+} e gerar radicais peróxido (H_2O_2) e hidroxila (OH^\cdot) (CHIHUAILAF et al. 2002; BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Vitamina E

A vitamina E ou tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas. Intercepta o radical peroxila com formação do radical tocoferila, que será regenerado pela vitamina C, glutatona ou ubiquinol a tocoferol (VASCONCELOS et al. 2007). Sua capacidade antioxidante está relacionada à presença de um grupo hidroxila ligado à porção hidrofóbica de sua molécula. O hidrogênio do radical hidroxila é facilmente removível, sendo assim, o tocoferol se adere à membrana celular atraindo as moléculas de ácido graxos poliinsaturados, posteriormente cede o hidrogênio fenólico aos radicais lipídicos livres formados durante a peroxidação formando o radical tocoferol-O, que por possuir baixa reatividade, não inicia reações em cadeia. O complexo radical-tocoferol é eliminado parcialmente pela respiração e a outra parte é reconvertida a tocoferol, como já foi exposto (MILLER e BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, 1993; SILVA et al. 2008).

2.1.7. Estresse Oxidativo

Distúrbios de produção de oxidante / antioxidante, em favor do oxidante, (por exemplo, no processo de sepse, reperfusão de tecidos isquêmicos, exposição à radiação inclusive radiação solar, exercício intenso e exposição ao calor), doenças imunológicas, anemia, uremia, ou em caso de deficiência dos mecanismos antioxidantes, como observado nas deficiências vitamínicas e minerais, ocorrem danos celulares os quais são denominados “Estresse Oxidativo” (SIES, 1993; BIANCHI e ANTUNES, 1999; CHIHUAILAF et al. 2002; BEATTIE, 2003; FONTEQUE, 2005; VASCONCELOS et al. 2007).

Depois de formadas, as EROs podem reagir e causar danos a todas as classes de moléculas biológicas (VOET et al. 2000; BEATTIE, 2003), sendo que o alvo celular primário pode variar, dependendo da célula, do tipo de estresse imposto e quão severo é esse estresse (SILVA et al. 2008). Já a extensão dos danos

depende não somente da natureza e quantidade de EROs, mas também do momento e da duração da exposição, associado aos fatores extracelulares, como temperatura, tensão de oxigênio e ambiente (AGARWAL et al., 2003).

De acordo com Beattie (2003), Andrade Júnior et al. (2005) e Silva et al. (2008), os constituintes celulares e extracelulares mais afetados são os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (plasmática, mitocondrial e lisossomal), proteínas (enzimas celulares e constituintes da matriz extracelular) e o ácido nucléico (principalmente cromossomos).

a) Interação das EROs com Ácidos Graxos

Os fosfolipídeos presentes em membranas plasmáticas e de organelas estão sujeitos a peroxidação de lipídeos, uma reação em cadeia de radical livre iniciada por remoção de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado por radical hidroxila (BIESALSKY, 2002; BEATTIE, 2003). Os principais ácidos atingidos são o linoléico, o araquidônico e o docosahexanóico, por possuírem fracas pontes de ligação entre carbono e hidrogênio, sendo o hidrogênio facilmente abstraído, e devido as suas múltiplas ligações (NORDBERG e ARNÉR, 2001; SILVA et al. 2008).

A peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados usualmente envolve três processos definidos como iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação ocorre com a formação de um conjugado dieno pela subtração de um átomo de hidrogênio pela ERO. A fase de propagação da peroxidação lipídica decorre da interação do oxigênio molecular com o carbono, com a formação do radical hidroperóxido, que subtrai hidrogênio de outras moléculas de lipídeos, resultando no hidroperóxido lipídico. Com a ajuda de metais catalíticos, a decomposição dos hidroperóxidos resulta na formação dos radicais alcoxil e peroxil que podem iniciar uma reação em cadeia propagando a peroxidação lipídica (BEATTIE, 2003; ANDRADE JÚNIOR et al. 2005).

Ao se degradarem, os hidroperóxidos originam uma variedade de compostos citotóxicos, como os aldeídos, entre eles o hidroxinonenal e o malondialdeído. Sendo que este último possui baixa toxicidade (CHIHUAILAF et al. 2002).

Uma conseqüência significativa da peroxidação de lipídeos é a permeabilidade de membranas aumentada, levando a um influxo de Ca^{2+} e de outros íons, com subseqüente inchamento da célula. Aumentos similares de

permeabilidade de membranas de organelas também podem resultar em má distribuição de íons e resulta em dano intracelular. Por exemplo, o acúmulo de quantidades excessivas de Ca^{2+} em mitocôndrias pode desencadear apoptose (BEATTIE, 2003). A alteração da permeabilidade das membranas pode, ainda, promover a liberação de enzimas das organelas e formação de produtos citotóxicos que inativam receptores das proteínas da membrana, fato que potencializa os danos celulares, culminando com sua morte (SILVA et al. 2008).

b) Interação das EROs com Proteínas

Nas proteínas, o ataque das EROs pode levar à modificação dos aminoácidos (SILVA et al. 2008). As mudanças físicas nas proteínas que eles compõem estão distribuídas em três categorias: fragmentação, agregação e susceptibilidade à digestão proteolítica. As proteínas são seletivamente fragmentadas nos resíduos de prolina, cisteína, metionina, histidina e arginina uma vez que eles são susceptíveis ao ataque por radicais hidroxila e os dois últimos estão em íntima associação com os metais de transição. O radical hidroxila tem, ainda, a capacidade de formar ligações cruzadas entre as proteínas o que gera agregação das mesmas (BEATTIE, 2003).

Foi observado que a presença de quantidades significativas de aminoácidos aromáticos ou sulfurados numa estrutura protéica a torna mais vulnerável a ação das EROs. Estudos realizados *in vitro* mostraram que as proteínas sofrem alterações localizadas nos sítios ligados a metais de transição. Estes sítios são particularmente susceptíveis devido à facilidade com que os metais ligados reagem com o peróxido de hidrogênio para formar íons hidroxila os quais, posteriormente, atacam os aminoácidos adjacentes (CHIHUAILAF et al. 2002).

As alterações conformacionais ocasionam alteração da atividade enzimática e aumento da susceptibilidade proteolítica (BEATTIE, 2003; ANDRADE JÚNIOR et al. 2005; SILVA et al. 2008).

c) Interação das EROs com o DNA

Sem dúvida, a conseqüência mais importante das EROs é o dano ao DNA, tanto mitocondrial como nuclear, resultando em mutações. Em humanos foram

observados, aproximadamente, 20 tipos de alterações oxidativas do DNA pela ação das EROs (ANDRADE JÚNIOR, et al. 2005). O DNA mitocondrial é mais susceptível a danos por EROs, uma vez que a cadeia de transporte de elétrons é uma fonte importante de radicais tóxicos de oxigênio. Além disso, tem-se que os mecanismos de reparo do DNA mitocondrial é menos eficiente em relação ao do DNA nuclear (CHIHUAILAF et al. 2002; BEATTIE, 2003; ANDRADE JÚNIOR, et al. 2005). O DNA nuclear está protegido de dano permanente por uma capa protetora de histonas, bem como pelos mecanismos ativos de reparo. As alterações provocadas pelas EROs, principalmente o radical hidroxila, inclui alterações de bases e quebra de moléculas. Dano ao DNA mitocondrial resultará em mutações que afetam a produção de energia, no entanto, estas alterações serão significativas na medida em que sejam intensas e capazes de iludir os sistemas de reparo antes que ocorra a replicação (CHIHUAILAF et al. 2002). Dos cinco principais componentes do DNA, a timina e a citosina são as bases mais susceptíveis aos danos causados pelo ataque dos radicais hidroxila, seguidas pela adenina, guanina e o açúcar desoxirribose (ANDRADE JÚNIOR et al. 2005).

2.2. INSULAÇÃO TESTICULAR

A caprinocultura representa uma importante atividade sócio-econômica para a população da região semi-árida do Nordeste, onde os períodos críticos de seca interferem na produção de alimentos. Apesar de os caprinos serem considerados animais de fácil adaptação, a associação entre os vários fatores climáticos como, temperatura do ar, umidade relativa do ar e irradiação provocam alterações fisiológicas que acabam interferindo na produtividade animal (SILVA et al. 2005). Appleman e Delouche (1958) observaram que em temperaturas críticas, entre 35° C e 40° C, os caprinos reduzem a sua eficiência bioenergética prejudicando o seu desempenho produtivo, em decorrência do estresse térmico.

O estresse provocado pelas elevadas temperaturas ambientais, além de interferir nos parâmetros fisiológicos, temperatura retal, frequência respiratória e temperatura superficial (Muller et al., 1994), interfere também no desempenho reprodutivo dos animais, uma vez que a espermatogênese está sobre controle fisiológico do sistema neuroendócrino e sofre influência direta da termorregulação escrototesticular (SANTOS e SIMPLÍCIO, 2000). Para Rao et al. (1983) a introdução

de animais exóticos em áreas de clima diferente ao de origem provoca deterioração no seu desempenho reprodutivo, apresentando alterações na qualidade e nos constituintes bioquímicos do sêmen, em decorrência do estresse calórico.

Muitos estudos evidenciaram que, em casos de temperatura ambiente elevada, os mecanismos fisiológicos de termorregulação testicular não são suficientes para manter a temperatura ideal para o funcionamento da gônada masculina, determinando degeneração testicular (FLORENTINO et al. 2003a). Nichi (2003), estudando as modificações na qualidade espermática de sêmen de touros indianos e europeus em diferentes épocas do ano, observou aumento da ocorrência de defeitos maiores nos espermatozoides coletados no período do verão. Silva et al. (2005), observaram diminuição da concentração espermática do sêmen de caprinos criados no semi-árido paraibano, quando as coletas foram realizadas na época mais quente do ano.

Segundo Villares (1976), nos mamíferos com testículos localizados permanentemente na bolsa escrotal, a termorregulação acontece principalmente pela existência de três mecanismos: as glândulas apócrinas, situadas na bolsa escrotal, que permitem a sudação com subsequente resfriamento testicular; a túnica dartos e o músculo cremáster que favorecem o afastamento e a aproximação dos testículos à região inguino-abdominal e o plexo pampiniforme, constituído por artérias e veias testiculares, dispostas contiguamente, o qual é responsável pela troca de calor e consequente resfriamento do sangue arterial.

Contudo, dependendo do grau de intensidade do estresse térmico, poderão ocorrer falhas na eficácia desses mecanismos, favorecendo a subsequente degeneração do epitélio germinativo testicular (HULET e SHELTON, 1982; SANTOS, 1995; FLORENTINO et al., 2003b; NICHII, 2003), com comprovado efeito depressivo na qualidade do sêmen, produzindo elevação de pH e da porcentagem de espermatozoides anormais, diminuição da motilidade, concentração espermática, volume e porcentagem de espermatozoides vivos.

De acordo com Lasota et al. (2004), os espermatozoides mamíferos têm uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana, além de apresentarem uma baixa concentração de enzimas antioxidantes em seu citoplasma. Esta característica os torna particularmente sensíveis aos efeitos das EROs.

Em condições experimentais, a insulação escrotal é um bom método para o estudo das alterações degenerativas testiculares causadas pelo estresse térmico (FLORENTINO et al. 2003a), pois o aumento da temperatura do escroto, quer natural ou induzido pela insulação da bolsa escrotal, interfere na termorregulação testicular, predispondo à degeneração do epitélio germinativo gonadal (SANTOS e SIMPLÍCIO, 2000).

Os mecanismos através dos quais ocorre morte celular em resposta ao estresse calórico, ainda não estão completamente elucidados, no entanto estudos recentes têm demonstrado que ocorre morte programada das células germinativas através de apoptose. Este tipo de morte celular também ocorre em função do estresse oxidativo, no entanto, não é conhecida a origem das EROs nos casos de estresse calórico, mas se sabe que elas estão aumentadas nestes casos (KUMAGAI et al. 2002).

Nichi (2003) observou aumento significativo nos níveis de malondialdeído no sêmen coletado de touros no período do verão, indicando a ocorrência de estresse oxidativo em temperatura elevada. Ratos adultos submetidos à cirurgia para indução de criptorquidismo apresentaram aumento da peroxidação lipídica como sinal de estresse oxidativo (AHOTUPA e HUHTANIEMI, 1992). Níveis de peroxidação lipídica também estão significativamente aumentados antes da descida dos testículos para a bolsa escrotal em ratos (PELTOLA et al. 2005). Estes dados indicam que há um envolvimento das EROs com a morte por apoptose das células germinativas testiculares.

De acordo com Nichi (2003) e Setchell (1998), uma explicação plausível para o aumento da produção de EROs durante o estresse térmico testicular seria o aumento da taxa metabólica e correspondente aumento da demanda por oxigênio sem elevação da circulação sanguínea, uma vez que o fluxo sanguíneo é limitado em função da disposição espiralada da artéria testicular, o que provocaria um quadro de hipóxia tecidual, condição predisponente para produção de EROs. Barros et al. (2009), trabalhando com bovinos não observou aumento do fluxo sanguíneo de touros submetidos à temperatura de 35°C diretamente sobre testículo. Resultados semelhantes foram encontrados por Setchell (1978) citado por Barros et al. (2009), avaliando o fluxo sanguíneo testicular de carneiros, quando a temperatura escrotal era elevada até a temperatura corporal.

Embora alguns autores afirmem que há poucas explicações sobre a morte celular causada por estresse térmico, Rockett et al. (2001), explica que o processo de degeneração testicular pelo aumento de temperatura está relacionado à expressão de um grupo de proteínas conhecidas como proteínas do choque térmico (HSPs), principalmente a HSP-70.

De acordo com Paul et al (2009), a hipóxia gera parada do ciclo celular e morte por apoptose. Os mesmos autores, trabalhando com ratos submetidos a estresse calórico transitório, encontraram evidências do envolvimento da hipóxia, estresse oxidativo e apoptose no processo de degeneração do epitélio germinativo testicular ao investigarem o marcador de hipóxia tecidual conhecido como fator induzido por hipóxia 1 α mRNA (HIF1 α mRNA), as enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase 1 (GPX1) e glutathiona S-transferase α e expressão da caspase 3 um marcador de morte celular por apoptose. Shiraishi et al. (2009), também observaram correlação entre o aumento da temperatura testicular e a expressão de marcadores do estresse oxidativo com a morte celular por apoptose, trabalhando com homens criptorquídicos. No entanto, esses mecanismos ainda não estão bem esclarecidos.

Uma explicação proposta seria que as situações de estresse como o calor, alteram a conformação terciária das proteínas, separando as cadeias de aminoácidos, expondo os aminoácidos hidrofóbicos à água e provocando a perda da função da proteína. Nesta situação ocorre ativação das Proteínas do Choque térmico (HSPs), que migram para o núcleo e nucléolo e ajudam a célula a conservar ou degradar as proteínas desnaturadas, unindo-se a elas para evitar que se agreguem, marcando-as para logo destruí-las, ou mantendo as cadeias de polipeptídeos separadas, para que quando o estresse tenha acabado, elas possam voltar ao funcionamento inicial, recuperando sua conformação tridimensional (ESSIG e NOSEK, 1997; MEYER e SILVA, 1999). As HSP70 compõem a principal classe de proteínas induzidas por temperaturas elevadas e têm se mostrado importantes tanto na espermatogênese quanto no desenvolvimento de embriões (ROCKETT et al. 2001). De acordo com Hwang et al. (2008), o nível de termotolerância de uma célula é diretamente proporcional aos níveis de HSP70 presentes em seu citosol.

Estas proteínas podem ativar a expressão do gene p53, que tem ação na supressão de tumores e também é expresso nos testículos. Altas temperaturas

escrotais causariam, em espermátocitos paquítenos e espermátides arredondadas, a condensação na cromatina nuclear, que, por sua vez, levariam a ativação das HSPs e posterior ativação do p53, com conseqüente interrupção do ciclo celular. Este mecanismo visaria prevenir a proliferação de células germinativas com DNA danificado (ALMON et al. 1993; DADA et al. 2001). Yin et al. (1998), observaram que a P53 foi responsável pela eliminação espontânea através de apoptose das células germinativas testiculares defeituosas de ratos. No entanto, eles sugerem que sua ativação ocorra devido a condições de hipóxia tecidual. Chaki et al. (2005), observou aumento do estresse oxidativo e morte por apoptose em células seminiais de ratos criptorquídicos, mas também ocorreu remoção de células germinativas negativas para apoptose por células gigantes multinucleadas, indicando uma outra forma de remoção de células defeituosas além da apoptose.

Morgentaler et al. (1999), postularam que o p53 poderia atuar na apoptose induzida pelo estresse térmico, com a função de selecionar as células germinativas que sofreram danos pelo calor, provocando morte celular das mesmas. Segundo Hikim e Swerdloff (1999), o mecanismo de ação do p53 no testículo ainda não foi completamente elucidado, porém, há indícios de que este mecanismo envolveria a ativação de genes indutores do p53 com posterior formação de EROs. Estas EROs provocariam a degeneração oxidativa dos componentes mitocondriais, o que permitiria a liberação de fatores indutores da apoptose, como o citocromo c. Além deste mecanismo, estudos recentes indicam que a proteína p53 promove uma permeabilidade transitória na membrana mitocondrial que por si só, permitiria a saída de EROs e do citocromo c. Além de induzir a apoptose no citosol, o citocromo c é acceptor final de elétrons, com potencial função na formação de ânions superóxido, ERO que fornece substrato para a formação do peróxido de hidrogênio, com posterior formação do radical hidroxila, outra ERO extremamente ativa (NELSON e COX, 2006).

As lesões estruturais ao nível do testículo são marcantes quando altas temperaturas são induzidas sobre este órgão e seguramente as conseqüências não se restringem apenas ao testículo, mas também ao organismo como um todo, uma vez que é acompanhado por aumento na produção de radicais livres, determinando alterações no metabolismo celular sistêmico, pois, de acordo com Sies (1993), espécies oxidativas inofensivas podem se formar no interior celular e serem

transportadas para outros sítios onde poderão ser ativadas e provocar oxidação de componentes celulares longe de onde foram produzidas.

2.3. SELÊNIO E VITAMINA E

Danos tissulares induzidos por estresse oxidativo são minimizados por elementos de defesa oxidativa, ou seja, por antioxidantes. Dentre os mecanismos de defesa, estão reconhecidamente envolvidos na proteção das membranas biológicas contra a lipoperoxidação a vitamina E e o selênio, os quais atuam sinergicamente (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; TEMPLER, 2000). A vitamina E previne a peroxidação, rastreando as EROs nos estágios iniciais da lipoperoxidação, enquanto que o selênio atua como centro ativo da enzima glutatona peroxidase a qual reduz o peróxido de hidrogênio e hidróxidos de lipídeos a produtos menos reativos (ORTOLANI, 1999; VAN METRE e CALLAN, 2001).

2.3.1. Selênio

O selênio é um microelemento essencial para o crescimento dos animais e seres humanos. Foi descoberto por Jons Jacob Berzelius em 1817. Em baixa concentração, é um elemento essencial a diversas funções; já em alta concentração possui propriedades tóxicas (FOSTER e SUMAR, 1997).

O selênio está presente no solo e na água e é absorvido pelas plantas. Sua concentração na planta depende de sua concentração no solo. Em geral, pode-se afirmar que plantas crescendo em solos com baixo pH, altos teores de argila e adubados com produtos à base de sulfato, têm baixos teores de selênio (GUEDES e NOGUEIRA, 1994; GIERUS, 2007). A concentração de selênio nas plantas e grãos é baixa, sendo, portanto, necessária sua suplementação com misturas minerais (GIERUS, 2007).

Os animais recebem Se como selenoaminoácidos, que constituem a forma orgânica do elemento e são conhecidos como selenometionina e selenocisteína, ou como compostos inorgânicos, por exemplo, o selenito de sódio ou selenito de cálcio e selenatos (FOSTER e SUMAR, 1997; UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; ALVAREZ e MORAES, 2006). As formas orgânicas do selênio representam formas análogas

dos aminoácidos sulfurados, com o selênio ocupando o mesmo lugar que o enxofre em suas estruturas moleculares (GIERUS, 2007).

Sua absorção é primariamente duodenal, não ocorrendo nenhuma absorção no rúmen ou abomaso (NCR, 2000). Esta absorção é beneficiada quando níveis das vitaminas E e A e de histidina da dieta são adequados (PUGH et al. 2005). Entretanto, quando se compara a absorção do selênio nos ruminantes e nos animais monogástricos observa-se que nos ruminantes é menor devido à ação das bactérias ruminais que atuam sobre as formas biologicamente ativas, tornando-as inabsorvíveis (CEBALLOS e WITTEWER, 1996; LUCCI, 1997; SPEARS, 2002). Outro fator que prejudica a absorção do mineral é a maior ingestão de concentrados, pois este tipo de dieta favorece a diminuição do pH ruminal, que, quanto mais ácido diminui a absorção do selênio. Outros fatores como rações mal formuladas, tipo de planta, agentes competidores como o enxofre, cádmio, prata e mercúrio e doenças entéricas diminuem a absorção do selênio e sua atividade protetora (RIET-CORREA et al. 2003).

A absorção do selenito é por difusão, e portanto proporcional à quantidade presente no lúmen intestinal, a absorção do selenato e da selenometionina ocorre por transporte ativo. Pouco do selênio elementar é absorvido no intestino devido a sua baixa solubilidade e, portanto, passa a ser excretado nessa forma nas fezes (GIERUS, 2007).

Após a absorção intestinal, selenometionina e selenocisteína podem ser metabolizadas pelos animais como aminoácidos. No metabolismo pós-absortivo das formas inorgânicas, o selenito é captado pelos eritrócitos, reduzido imediatamente a seleneto (HSe^-), acoplado à albumina e transferido ao plasma, para então ser transportado ao fígado (NRC, 2000; GIERUS, 2007). No fígado ele é ligado às globulinas e é revertido novamente para a circulação sangüínea, para então ser distribuído aos diferentes sítios de armazenamento e compartimentos de mobilização lenta, armazenando-se principalmente em tecidos que têm composição protéica (CEBALLOS e WITTEWER, 1996). Os rins e o fígado normalmente contêm as maiores concentrações de Se (FOSTER e SUMAR, 1997). O selenato, por sua vez, é incorporado diretamente pelos hepatócitos, utilizando o mesmo sistema de transporte dos fosfatos da corrente sangüínea.

Para que o selênio seja incorporado especificamente em selenoproteínas funcionais, como a glutathiona peroxidase, é necessário que as formas orgânicas e

inorgânicas sejam reduzidas a seleneto, e este, por sua vez, metabolizado à selenocisteína. A selenocisteína da dieta não é incorporada diretamente em selenoproteínas funcionais, necessitando ser inicialmente reduzida a seleneto. As formas inorgânicas são mais rapidamente transformadas em selenetos que as orgânicas (GIERUS, 2007).

O Se é excretado nas fezes após a ação dos microrganismos ruminais que reduzem o mineral a formas inabsorvíveis, principalmente a forma de selênio elementar. Esta via é a principal para os ruminantes, seguida da via urinária e de menor relevância têm-se as vias biliar, salivar e pulmonar. Os ruminantes podem ainda excretar selênio através da eructação e no leite (CEBALLOS e WITTEWER, 1996).

O requerimento mínimo de selênio para uma determinada espécie varia de acordo com a forma química do elemento ingerido e com a composição da dieta, mais particularmente, se está associada a vitamina E (GRACE et al. 1994). Os requerimentos de selênio para pequenos ruminantes variam de 0,1 a 0,3 mg/Kg (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999), no entanto, de acordo com o NRC (2000), os requerimentos de selênio variam 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, lipídeos, proteínas, aminoácidos e outros nutrientes.

2.3.2. Vitamina E

A vitamina E foi descoberta em 1923, por Evans e Bishop, em estudos de fertilidade em ratos. Devido ao seu papel na fertilidade, a substância foi chamada de tocoferol, que, literalmente, significa a substância requerida para “assegurar nascimentos normais” (RUCKER e MORRIS, 1997; JORDÃO JÚNIOR et al. 1998).

O termo vitamina E é a designação comum para descrever um grupo de potentes antioxidantes lipossolúveis que estão distribuídos em duas diferentes famílias: os tocoferóis e os tocotrienóis (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999; VASCONCELOS et al. 2007). Análises estruturais revelaram que os tocoferóis e os tocotrienóis diferem apenas na cadeia lateral fítica, que pode ser saturada, no caso dos tocoferóis, ou insaturada, no caso dos tocotrienóis. Ambos se subdividem em

quatro isômeros chamados α , β , γ e δ , dependendo do número e posição do grupo metila no anel cromanol (JORDÃO JÚNIOR et al. 1998).

Dentre todos os tocoferóis conhecidos, o α -tocoferol tem sido considerado o biologicamente mais ativo, inclusive no que diz respeito a sua atividade como antioxidante, sendo o principal antioxidante lipossolúvel, nas membranas celulares (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999).

A vitamina E está disponível nos vegetais e pastos verdes, óleo de sementes, como éster acetato sintético e está presente no colostro e no leite (PHILLIPS 1992; SILVA et al. 2008). No entanto, 80% da vitamina E perde-se em alimentos fenados, ensilados ou desidratados rapidamente. Efeito semelhante ocorre de acordo com a maturidade da planta forrageira (VAN METRE e CALLAN, 2001). Conforme relatou Lucci (1997), a concentração de vitamina E nas forragens também sofre influência da estação do ano, estando bastante reduzida no período de estiagem, pois a exposição prolongada ao O₂ e à luz solar aumenta as perdas de atividade da vitamina. A utilização de rações com elevados teores de ácidos graxos voláteis geralmente provocam a queima das reservas de vitamina E dos cereais, e ainda pode haver perda de tocoferol por oxidação após o processamento dos grãos (trituração e peletização) e a mistura com minerais (SILVA et al. 2008). Jukola et al. (1996), estudando o total de vitamina E em feno, silagem, cevada, aveia e grãos de cereais observou grande variabilidade sendo encontrado em média 30.9, 96.7, 76.9 e 37.5 mg/Kg de MS, respectivamente.

O manejo de rebanhos totalmente confinados cresce no país, e as forragens conservadas são fornecidas quase como o único volumoso, o que aumenta a chance de nascimento de crias com deficiência de vitamina E. O excessivo uso de concentrado no alimento de vacas e cabras após o parto aumenta a acidez rumenal. Essa maior acidez do rúmen acentua a perda de vitamina E e, como consequência, há redução do seu nível plasmático nos dias subseqüentes ao parto, comprometendo assim, a concentração e a composição do colostro e leite oferecido aos animais recém-nascidos (NRC, 2000; LUCCI, 1997).

A vitamina E atravessa a barreira placentária em pequenas quantidades. Os ruminantes neonatos, antes da ingestão de colostro, apresentam reduzidos níveis de α -tocoferol, se comparados aos maternos (PEHRSON et al. 1990). O requerimento de vitamina E em caprinos que não apresentam deficiência de selênio, é de 25 mg/Kg por via parenteral e 40 mg/Kg por via oral e esse valor pode dobrar quando

os animais se alimentam com sucedâneos do leite (ADAMS, 2003). De acordo com Van Metre e Callan (2001), os valores séricos normais de vitamina E em caprinos variam entre 60 e 150 µg/mL.

A vitamina E dietética é absorvida sob a forma de não esterificada no intestino delgado, incorporada a quilomícrons e secretada na circulação linfática intestinal. A enzima lipase lipoprotéica hidrolisa os triacilgliceróis nos quilomícrons e promove a formação de remanescentes de quilomícrons que são captados pelo fígado via receptor específico para a apolipoproteína-E, localizado nas células parenquimais. A vitamina E é secretada pelas células parenquimais hepáticas, em associação com as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Alguma vitamina E, associada a quilomícrons e VLDL, é, provavelmente, transferida às células periféricas e às lipoproteínas de alta densidade (HDL) durante o processo de lipólise. No metabolismo da VLDL, uma parte da vitamina se associa à LDL e segue os mecanismos de captação de LDL, tanto nas células parenquimais hepáticas quanto nas células periféricas (JORDÃO JÚNIOR et al. 1996; RUCKER e MORRIS 1997; ADAMS, 2003). A eficácia de absorção da vitamina E é menor do que a da vitamina A, com o α -tocoferol sendo mais bem absorvido. De acordo com Medeiros e Paulino (2002), quando a administração de vitamina E é realizada por via oral apenas 50% são absorvidos pelo intestino delgado, sendo o restante eliminado pelas fezes.

Os principais locais de armazenamento do tocoferol são os tecidos hepático, adiposo e muscular, no entanto esses estoques são rapidamente esgotados pela deficiência dietética (ADAMS, 2003).

2.3.3. Atuação do Selênio e da Vitamina E

Como nutriente, o Se desempenha diversas funções no organismo animal, estando intimamente ligado a vitamina E. Dentre estas funções pode-se destacar seu papel antioxidante por compor a enzima glutathiona peroxidase, cuja estrutura está formada por 4g/mol da enzima; favorece o crescimento, uma vez que faz parte da estrutura da enzima iodotironina 5'-deiodinase tipo I que catalisa a reação de deiodinização da L-tiroxina (T4), convertendo o hormônio da tireóide na sua forma ativa, 3,3',5-triiodotironina (T3), e este tem papel importante na síntese do hormônio do crescimento (GH); tem ação protetora frente à necrose hepática disseminada; também está associado a manifestações clínicas como a doença do músculo

branco, infertilidade em machos e fêmeas, retenção de placenta, metrite, cistos ovarianos e imunossupressão (FOUCRAS et al. 1996; LOMBA, 1996).

O mecanismo pelo qual a deficiência de selênio interfere na função reprodutiva da fêmea ainda não é bem esclarecido. Ceballos e Wittwer (1996), justificam esta influência como sendo resultado do estresse oxidativo produzido pela deficiência de selênio e/ou vitamina E. No entanto, de acordo com Wichtel (1998), a glutathione peroxidase está envolvida na cascata do ácido araquidônico, e os eicosanóides, produtos do metabolismo do ácido araquidônico, são mediadores importantes da função imune e reprodutiva. O Se, como glutathione peroxidase, poderia ter papéis na produção de prostaglandina 2 α (PGF_{2 α}), durante a cascata do ácido araquidônico, agindo em intermediários da PGF_{2 α} .

Com relação à retenção de placenta, Lucci (1985) realizou um estudo em 120 vacas de criações situadas em quatro municípios do Estado de São Paulo. Os autores concluíram que a suplementação de Se diminuiu a incidência de retenção de placenta em apenas duas das quatro propriedades estudadas. Rosa et al. (1985), em experimentos realizados em vacas da raça holandesa, no município de Descalvado, São Paulo, concluíram que o Se associado ou não à vitamina E, não influenciou a incidência de retenção de placenta. Santiago (1986a) observou uma diminuição dos casos de retenção de placenta, em vacas da raça charolesa, que receberam, com 240/260 dias de gestação, 1ml/100 kg de selênio-tocoferol. Vasconcelos et al. (1989), fizeram investigações durante os anos de 1984 e 1985 para avaliar os efeitos da aplicação de Se, de vitamina E, e de Se associado à vitamina E na incidência da retenção de placenta, em rebanhos leiteiros em Barbacena e Passos (Minas Gerais). Chegaram à conclusão que, em Barbacena, a administração de Se foi eficaz, enquanto que em Passos este efeito não se fez sentir.

Em relação a gestação e fertilidade em vacas, Zanetti et al. (1984) suplementaram, no município de Batatais, São Paulo, vacas da raça holandesa vermelho e branca, em final de gestação. Verificaram, apesar de não haver diferenças estatísticas, que os animais suplementados com doses maiores foram inseminados mais cedo e necessitaram de um menor número de inseminações por concepção. Santiago (1986a) verificou, no Rio Grande do Sul, uma diminuição na duração média da gestação, dos partos auxiliados e da duração do puerpério clínico, além da diminuição de casos de retenção de placenta, em vacas da raça charolesa;

o grupo tratado também obteve bezerros mais pesados ao nascer e mostrou mais precocemente o primeiro cio pós-parto. Santiago (1986b) observou ainda, no Rio Grande do Sul, um aumento no índice de fecundação, diminuição do número de inseminações por concepção e do intervalo entre parto e fecundação, em dois grupos de vacas da raça charolesa, que foram tratadas com selênio-tocoferol.

Quanto à função reprodutiva dos machos, sabe-se que os espermatozoides são susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem, em suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. Os danos peroxidativos induzem a formação de EROs, que é uma das maiores causas de redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (ALVAREZ et al. 2006). Em condições fisiológicas as EROs cumprem papel importante, uma vez que promove leve capacitação espermática e aumento da afinidade pela zona pelúcida (BAUMBER et al. 2003), tanto que Rivlin et al. (2004), trabalhando com sêmen de touros, observou melhora na capacitação espermática quando da adição de pequenas concentrações de peróxido de hidrogênio, já altas concentrações foram prejudiciais.

Quando produzidas em excesso, as EROs determinam prejuízos sobre a atividade do espermatozoide que incluem perda da motilidade de forma irreversível, inibição da respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozoide (BAUMBER et al. 2003). A utilização de uma dieta com níveis apropriados de substâncias antioxidantes, especialmente selênio e vitamina E, ocorreria redução dos danos celulares (ALVAREZ et al. 2006).

Xavier (2007) observou que a suplementação com selênio e vitamina E em caprinos minimizou os efeitos drásticos causados pela insulação escrotal sobre os parâmetros biométricos testiculares além de acelerar a recuperação do processo espermatogênico após suspensão a insulação escrotal. Alvarez, et al. (2006), ao suplementarem coelhos com diferentes níveis de selenometionina e/ou vitamina C, observaram que a vitamina C melhorou a concentração e a coloração do sêmen. Lasota et al. (2004) não observaram correlação entre a qualidade do sêmen de reprodutores suínos e a concentração de GSH-Px. Já Brzezinska et al. (1995), observaram redução da produção de EROs e conseqüente melhora da taxa de fertilização ao suplementarem reprodutores suínos.

As afirmações de que a deficiência de Se também pode agir reduzindo a resposta imune dos bovinos foi estudada por diversos pesquisadores. Wichtel

(1998), observou que a administração de Se e/ou vitamina E a bezerros de duas a quatro semanas de idade melhorou a resposta imune dos animais, e que a vitamina E sozinha foi capaz de acentuar a imunidade passiva nos bezerros, aumentando a concentração de IgM e IgG no soro, em 60,7% e 46,7%, respectivamente. A diminuição da atividade da GSH-Px em células fagocíticas tem sido associada à baixa capacidade bactericida dos neutrófilos bovinos, devido ao acúmulo de radicais peróxidos que geram estresse oxidativo. Estudos recentes confirmaram que leucócitos de bovinos deficientes em Se têm sua atividade diminuída e que a proliferação de linfócitos também é prejudicada.

Devido a esta ação imunológica, foram realizados estudos para avaliar a resposta de fêmeas bovinas suplementadas com Se e/ou vitamina E à ocorrência de mastite. O primeiro estudo feito sobre o efeito do Se e vitamina E na incidência de mastite clínica foi reportado por Smith et al., (1984) onde encontraram diminuição de 37% na incidência de mastite clínica em vacas recebendo suplementação de 740 UI de vitamina E por dia, durante o período seco. Apenas a injeção de selênio, 21 dias antes do parto, não teve efeito significativo sobre incidência de mastite, no entanto, vacas suplementadas com selênio e vitamina E tiveram diminuição dos sintomas clínicos de mastite comparadas com aquelas que não receberam nenhum tipo de suplementação. Smith et al., (1997) concluiu que a suplementação com Se e vitamina E melhora a resposta neutrofílica da glândula mamária, debelando as infecções mais rapidamente, e diminuindo a contagem de células somáticas do leite. Isso, além de garantir a cura do animal, ainda melhora a qualidade do leite, evitando perdas maiores ao produtor. Paschoal et al., (2003) concluíram que a suplementação com selênio no pré-parto aumentou o nível sérico do mineral nas vacas e reduziu a contagem de células somáticas nas oito primeiras semanas de lactação, desempenhando importante papel na resposta imune da glândula mamária de bovinos leiteiros. Politis et al. (1995), observaram que a suplementação com vitamina E preveniu a supressão da atividade de neutrófilos e macrófagos sanguíneos no período pós-parto.

2.4. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

A produção exacerbada de radicais livres é controlada pelo sistema antioxidante eritrocitário, representado por um sistema enzimático. A determinação

dos radicais livres é extremamente difícil devido a curta meia-vida e à tecnologia para detectar diretamente os radicais em sistemas biológicos (FONTEQUE, 2005). Devido a esses problemas analíticos e tendo em vista o mecanismo de lesão dos radicais livres, utilizam-se biomarcadores para monitorar o envolvimento das EROs na patogênese da lesão. A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o malondialdeído (MDA) são os testes mais freqüentemente utilizados para a mensuração da lipoperoxidação de membranas (BIESALSKY, 2002).

A atividade das EROs pode ser avaliada indiretamente pela mensuração dos produtos de sua reação com ácidos poliinsaturados de membrana celular, tais como o malondialdeído, ou ainda pela interferência nas quantidades de substâncias e enzimas com atividade antioxidante, tais como a glutathione e suas enzimas conjugadas (McGRATH et al., 1995). Algumas substâncias com atividade antioxidante são classicamente indicadas, como é o caso dos antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não enzimáticos (glutathione, vitamina C e E, selênio, ergotioneína, flavonóides polifenólicos) em diferentes matrizes biológicas (CHIHUAILAF et al., 2002).

Novos testes que mensuram o efeito antioxidante em fluidos biológicos podem ser úteis em prover o índice de habilidade que o organismo tem de resistir ao dano oxidativo determinado por algum fator (BENZIE e STRAIN, 1996).

Segundo Mates (2000), tanto o ânion superóxido como o peróxido de hidrogênio, têm a capacidade de redução do íon metálico ferro (Fe^{3+}), formando novo íon (Fe^{2+}), uma vez que o ferro é o principal metal de transição responsável pela transformação do H_2O_2 em OH^- , por meio da reação de Fenton.

Neste contexto, o poder antioxidante pode ser referido analogamente como a habilidade de redução. Assim sendo, utilizar um método com potencial de redução, em método colorimétrico, ligado a um oxidante reduzido, facilmente poderia oferecer uma um método simples para avaliar esta habilidade. O método FRAP, o qual mede a habilidade de redução férrica plasmática (BENZIE e STRAIN, 1996), tem sido recomendado como um indicador de estresse oxidativo. Tal método ainda é pouco aplicado na rotina clínica em Medicina Veterinária (SOARES, 2004).

A menor capacidade produtiva e reprodutiva de caprinos criados em regiões de elevadas temperaturas, como no estado de Pernambuco, poderia ser explicada por uma maior produção de EROs e também por uma menor eficiência dos

mecanismos de proteção antioxidante, causados pelas altas temperaturas. No caso particular de estresse térmico testicular, este levaria a danos não só testiculares e espermáticos, como já comprovado por Santos (1995) e Florentino (2000a), mas também sobre o organismo como um todo. O uso de nutrientes antioxidantes, como o selênio e a vitamina E, tem alcançado interesse por boa parte da comunidade científica nos inúmeros modelos experimentais e ensaios clínicos registrados, verificando-se os efeitos benéficos que estes nutrientes estabelecem para os animais. Costa (2000) reportou que mais pesquisas são necessárias, para melhor definir um protocolo experimental, em termos de dose, via e duração de tratamento, bem como condição de saúde ou doença, no qual os agentes antioxidantes interferem positivamente no organismo animal.

É importante verificar o impacto que estes nutrientes exercem nos caprinos induzidos ao estresse térmico testicular, o qual determina graves alterações sobre o parênquima testicular e, supostamente, grande formação de EROs. A maior demanda de produção de caprinos para suprir as necessidades de consumo da população de baixa renda, justifica o desenvolvimento de estudos mais específicos envolvendo os diferentes segmentos da reprodução e da produção animal. Associada a estas questões, o fornecimento de alimentos de boa qualidade é também de relevante importância no sistema produtivo. Neste contexto, a suplementação alimentar com base em produtos contendo substâncias antioxidantes apresenta-se como uma grande oportunidade de negócio para os micro e pequenos produtores da região Nordeste. Uma das questões importantes sobre a oferta de selênio e vitamina E, como componente dietético para caprinos, refere-se à minimização dos efeitos deletérios do estresse oxidativo causado por elevadas temperaturas ambientais.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAIS:

Avaliar a ação protetora da suplementação oral com selênio e vitamina E contra os danos oxidativos sistêmicos causados pelo estresse térmico testicular em caprinos.

3.2. ESPECÍFICOS:

Avaliar o perfil sérico e plasmático de indicadores bioquímicos de estresse oxidativo (glutathiona reduzida, Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico -TBARS e Habilidade de Redução Férrica Plasmática-FRAP) antes, durante e após a fase de insulação escrotal;

Avaliar o modelo de indução da insulação escrotal como sendo capaz ou não de induzir estresse oxidativo sistêmico em caprinos;

Padronização da técnica “Habilidade de Redução Férrica Plasmática” (FRAP) como método de avaliação do estresse oxidativo na espécie caprina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de Realização do Experimento

O experimento foi realizado no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, nos setores de Clínica Médica de Grandes Animais e Laboratório de Andrologia. As determinações bioquímicas foram executadas no laboratório de Patologia Clínica da mesma instituição.

4.2. Delineamento Experimental

4.2.1 Animais / Alimentação

Foram selecionados, após exame andrológico, 12 machos da espécie caprina, sem raça definida (SRD), com idade variando entre sete e oito meses, os quais foram sorteados, por amostragem probabilística, para composição de dois grupos: G1 (não suplementados com selênio e vitamina E; n=6) e G2 (suplementados com selênio e vitamina E; n=6).

Todos os animais foram mantidos em regime de confinamento em baias individuais. A alimentação, tanto dos animais do G1 quanto os do G2 consistia de uma mistura concentrada à base de milho triturado, farelo de soja (*Glycine hispida*, Maxin) e sal comum (NaCl) acrescido de calcário, na proporção de 75%, 23% e 2 %, respectivamente, além de água *ad libitum*. A ração foi fornecida duas vezes ao dia, sendo 200g/cabeça/dia pela manhã e 200g/cabeça/dia à tarde. Com relação ao feno triturado de capim Tifton (*Cynodon dactylon*), este foi oferecido à vontade, porém permitindo sobras de 10%, com base em pesagens consecutivas das sobras.

4.2.2. Suplementação com Se + Vitamina E

Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 30 dias e ao término deste período, foi realizada a suplementação de Selênio e Vitamina E¹ ao grupo G2 compreendendo um período de fornecimento de 60 dias, quando então se iniciou o período de insulação escrotal (PIE). Os animais do grupo controle não receberam o respectivo suplemento. Durante e após o período de insulação escrotal

¹ Selevit E® – Integral Agroindustrial Ltda, Fortaleza, Ceará – Brasil

o G2 continuou recebendo a suplementação por mais 42 dias, compreendendo a fase pós-insulação escrotal. O selênio foi suplementado sob forma de selenito de sódio na dose de 0,1 mg/Kg de peso vivo, enquanto que para a vitamina E empregou-se a dose de 0,3 UI/Kg de peso vivo. Os animais foram pesados em intervalos de seis dias para correção da suplementação, obedecendo à teoria de regressão linear do ganho de peso em função do tempo.

4.2.3. Insulação Escrotal

Decorrido o período de adaptação dos animais e suplementação de Selevit E, todos os caprinos foram submetidos à insulação escrotal, por meio do emprego de uma bolsa plástica de polietileno de dupla parede, separadas por uma camada de algodão de aproximadamente cinco mm, conforme modelo utilizado por Florentino et al. (2003ab). Esta fase teve duração de 18 dias (Quadro 1). A partir do 18º dia, quando as bolsas plásticas foram retiradas dos testículos, foi mantida a administração do Selevit E aos animais do G2 por um período adicional de 42 dias, correspondendo à fase de pós-insulação escrotal (PIE).

Ao término do período de insulação escrotal, foram escolhidos, por amostragem probabilística, três animais de cada grupo, os quais foram submetidos à orquiectomia, para estudo histomorfométrico de parênquima testicular (Xavier, 2007). Os demais animais (G1=3 e G2=3) continuaram nas condições do experimento até o 150º dia, correspondendo ao término da fase de recuperação da insulação escrotal (RIE), onde os três animais restantes de cada grupo também foram submetidos à orquiectomia bilateral e os mesmos parâmetros foram aferidos.

4.2.4. Colheita das Amostras

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular, em tubos siliconizados e com sistema à vácuo², sem anticoagulante e com anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético – EDTA), para obtenção do soro e plasma/sangue total, respectivamente. O sangue sem anticoagulante foi mantido à temperatura ambiente, enquanto que as demais amostras com EDTA foram homogeneizadas, refrigeradas e encaminhadas ao laboratório para posterior processamento analítico.

² BD – Vacutainer System® - Becton Dickison Ind. Cir. Ltda

Tais amostras de sangue, com exceção das amostras destinadas à determinação da atividade da glutathiona reduzida (GSH), foram centrifugadas³ por período de 15 minutos a 500G, para obtenção de soro e plasma, os quais foram acondicionados em tubos de polietileno, tipo Eppendorf, e armazenados em freezer à temperatura de -20° C. As amostras de sangue total foram mantidas sob refrigeração até a determinação da GSH, a qual foi realizada no mesmo dia da coleta.

Decorridos 90 dias do início do experimento (adaptação + suplementação G2), foi realizada a colheita de sangue, que correspondeu ao momento basal (D₀) (Quadro1). Na fase de insulação escrotal, foram coletadas amostras de sangue a cada seis dias constituindo-se os respectivos momentos: 6_{IE}, 12_{IE} e 18_{IE}. Por conseguinte, foram realizadas, a cada sete dias, mais seis colheitas de sangue, correspondente a fase PIE, com os respectivos momentos experimentais: 7_{PIE}, 14_{PIE}, 21_{PIE}, 28_{PIE}, 35_{PIE} e 42_{PIE}.

Quadro 1 – Protocolo de adaptação e períodos correspondentes da indução da insulação escrotal e pós-insulação escrotal em caprinos suplementados ou não com selênio e vitamina E

	Período de Adaptação	Suplementação Se/Vit E	D ₀	6 _{IE} 12 _{IE} 18 _{IE} *	7 _{PIE} 14 _{PIE} 21 _{PIE} 28 _{PIE} 35 _{PIE} 42 _{PIE} **
				Insulação escrotal	Pós-Insulação escrotal Suplementação G2
G1	30 dias	0 dia	90	18 dias	42 dias
	n= 6		dias	n= 6	n= 3
G2	30 dias	60 dias	90	18 dias	42 dias
	n= 6	n= 6	dias	n= 6	n= 3

*Ao término do período de insulação escrotal três animais foram submetidos à orquiectomia. **Ao término do período de pós-insulação escrotal os outros três animais restantes, de cada grupo, também foram submetidos à orquiectomia.

³ Centrifugador Excelsa 2 – Fanem Ltda

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Teor Sérico de TBARS (MDA)

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) foi determinada no soro pelo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). O referido método se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico, em meio aquecido, quando este é submetido ao posterior resfriamento. A leitura foi realizada em analisador bioquímico semi-automático⁴ empregando-se comprimento de onda de 532nm.

4.3.2. Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH) Eritrocitária

A atividade da GSH foi determinada por método colorimétrico descrito por Beutler et al. (1963), utilizando-se sangue total. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital⁵, em comprimento de onda de 412 nm.

Como esta técnica fornece resultado em densidade óptica o mesmo foi transformado em mg/100 mL de sangue, realizando-se o seguinte cálculo:

$$\text{GSH (mg/ 100 mL de sangue)} = (\text{OD1} - \text{OD2}) \times 31040/\text{VG}$$

Onde,

OD1 = Densidade ótica inicial

OD2 = Densidade ótica final

VG = Volume globular da amostra

Para a determinação da GSH, realizou-se previamente o hematócrito em tubos capilares de 75 mm, onde as amostras foram centrifugadas⁶ por quinze minutos a 13.000 (RPM) (JAIN, 1986).

⁴ Bioplus® – Modelo BIO 2000

⁵ Micronal® – Modelo B34211

⁶ Microcentrífuga - Fanem

4.3.3. Habilidade de Redução Férrica Plasmática (HRFP)

Foi realizada empregando-se plasma, de acordo com o método colorimétrico descrito por Benzie e Strain (1996), que relataram a HRFP, em pH ácido, reduzindo o complexo tripiridiltiazina férrica (Fe^{3+} – TPTZ) à forma ferrosa (Fe^{2+}), formando uma coloração azul intensa. Esta foi lida em absorvância de 593nm utilizando-se analisador bioquímico semi-automático⁴.

4.4. Análise Estatística

Os parâmetros foram testados, inicialmente, quanto à sua distribuição normal, e foi necessário submeter à variável MDA à transformação pela raiz quadrada [$\text{RQ}(x+1)$], segundo recomendações de Sampaio (1998). Os dados que atenderam as premissas de normalidade ou transformados foram submetidos à análise de variância (Teste F) que separou como causa de variação, os efeitos: grupos, dias de coleta e interação. Foi aplicado o nível de significância (p) de 5%, e a diferença mínima significativa (DMS) do teste de Duncan para comparações de médias quando na presença de significância. Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) nos Eritrócitos

Não foi registrado efeito de tratamentos em relação à atividade eritrocitária de glutathiona ($P = 0,0969$), obtendo-se médias gerais de 50,04 mg de GSH/100 mL de sangue e 50,55 mg de GSH/100 mL de sangue, para os grupos controle e suplementados com selênio e vitamina E, respectivamente. Considerando-se o fator interação grupos x momentos, tem-se que este não foi significativo, obtendo-se nível P de 0,3740. No que diz respeito ao fator momentos de coletas, este foi significativo apresentando nível P de 0,0002.

Com base na análise do perfil das médias da GSH nos diferentes momentos de coleta, é possível verificar que as maiores concentrações de GSH foram identificadas no momento inicial e no período após a insulação escrotal, aos 42 dias PIE. Menores valores de médias foram registrados no período da IE, compreendido entre o 6^o e 18^o dias da IE (Tabela 1; Gráfico 1).

Outra observação importante é que os valores encontrados no dia zero, mesmo no grupo suplementado, não atingiu os níveis considerados normais de GSH, pois, de acordo com Vallejo et al., (1989), o limite mínimo na determinação da deficiência de GSH em caprinos é 60 mg/100mL de sangue. Moreno et al. (1987), observou que existe um fator genético que determina a concentração de GSH em caprinos, assim como já foi observado em ovinos por Igbokwe e Bah (1999), onde existe um polimorfismo da GSH que classifica os animais em dois tipos, os que apresentam nível de GSH abaixo de 60mg/100 mL de sangue e os que apresentam níveis acima de 60mg de GSH/100mL de sangue. Arranz et al. (1993), não observaram polimorfismo nos níveis de GSH de bovinos.

Dentro daquilo que era esperado, durante o período de indução da insulação escrotal, conforme modelo estatístico aplicado neste delineamento, ocorreu uma diminuição na quantidade de glutathiona reduzida nos eritrócitos. Esta redução é explicada pela ação dos radicais livres que penetram na hemácia e se ligam aos radicais sulfidrilas, presentes na membrana citoplasmática, formando dissulfetos e em seguida danificam a parede celular (HOWELL e GOONERATNE, 1987). Os

danos às hemácias certamente foram menores em proporção à quantidade de glutathiona reduzida presente dentro desta célula e isso pode explicar o fato do grupo suplementado apresentar maiores médias gerais desta variável.

Outro fato observado foi uma redução significativa da GSH nos momentos M7 (28 PIE) e M8 (35 PIE), embora já houvesse cessado o estímulo calórico e os valores de GSH já estivessem retornando aos valores basais. Este fato pode ser explicado pela ação pró-oxidante da vitamina E. De acordo com Upston et al., (1999), na presença de colesterol LDL a vitamina E determina um efeito nulo ou até mesmo pró-oxidante diante de peroxidação lipídica. No entanto, foi observada queda nos valores tanto do grupo suplementado quanto do não suplementado, sugerindo mais estudos para compreender este efeito. Outra possibilidade é a formação de EROs em função da reperfusão tecidual durante o período de recuperação do estresse calórico que provocou a hipóxia (SETCHELL, 1998). Guimarães et al., (2007), observou uma diminuição nos níveis de GSH testicular de ratos submetidos a torção do cordão espermático no momento da reperfusão.

No momento 7PIE os valores de GSH elevaram-se progressivamente e ao término do período experimental os dois grupos recuperaram as concentrações iniciais de GSH. Este fato é explicado pela ação da Glutathione Redutase que tem a função de regenerar a GSH, com o objetivo de impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (ROVER JÚNIOR, et al., 2001).

Considerando-se que se observou maior atividade de GSH no período da recuperação da insulação e que o grupo G2 obteve médias mais elevadas, entende-se que a suplementação contínua destes nutrientes propiciou ação antioxidante efetiva. Este fenômeno bioquímico teria sido melhor compreendido se tivesse sido efetivado a análise da atividade da glutathiona peroxidase, a qual é selênio dependente, além da quantificação tanto sérica quanto testicular do Se, efetivando-se uma análise de relação entre estes diferentes compartimentos, para justificar tal hipótese.

Melhores respostas poderiam ter sido observadas caso fosse aumentada a dosagem do selênio, uma vez que, de acordo com Underwood e Suttle, (1999), as necessidades diárias de selênio para um pequeno ruminante variam de 0,1 a 0,3 mg/Kg e neste experimento foi administrada a menor dose. Outro fator importante é

a forma química do elemento a ser administrado, onde a utilização do selênio como selenoaminoácido (selenometionina ou selenocisteína) melhora a retenção do mesmo no organismo (CEBALLOS e WITTWER, 1996; FOSTER e SUMAR, 1997). Neste delineamento experimental foi utilizado o selenito de sódio.

Conforme Xavier (2007), que trabalhou neste mesmo delineamento, nos animais do grupo Controle, após 42 dias da retirada do insulto térmico, 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. 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. Em alguns túbulos foi possível verificar células descamadas em apoptose, vacuolização de células de Sertoli e espessamento de membrana basal. Por outro lado, no grupo suplementado com Selênio e Vitamina E identificaram-se túbulos seminíferos com espermatídes arredondadas e em alongamento, e túbulos seminíferos entre os estágios I e VIII do ciclo do epitélio seminífero.

Tabela 1 – Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (P) da atividade da glutatona reduzida (mg/100 mL de sangue) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E

Grupos	Momentos										“P”
	0d	6IE	12IE	18IE	7PIE	14PIE	21PIE	28PIE	35PIE	42PIE	
CONTROLE (G1)	53,13	48,13	41,07	45,13	50,13	50,00	51,07	46,67	38,27	40,04	A
	±4,56	±3,92	±5,80	±7,20	±11,43	±3,12	±6,43	±4,82	±9,83	±19,13	
SELEVIT E (G2)	59,80	43,20	46,93	44,00	50,40	55,07	55,47	47,60	49,73	53,33	A
	±6,45	±3,99	±6,12	±8,19	±4,92	±2,34	±3,49	±1,20	±11,38	±4,77	
Média Geral	56,47	45,67	44,00	44,57	50,27	52,53	53,37	47,13	44,00	54,28	
“P”	a	dc	d	d	abcd	abc	abc	bcd	d	a	

0d – Início do experimento; 6 – 18 IE – Dias do período de insulação escrotal; 7 – 42 PIE – Dias do período pós insulação escrotal. Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade; Letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade. Efeito de Grupos = 0,0969; Efeito de Momentos = 0,0002; Interação Grupos x Momentos = 0.3740.

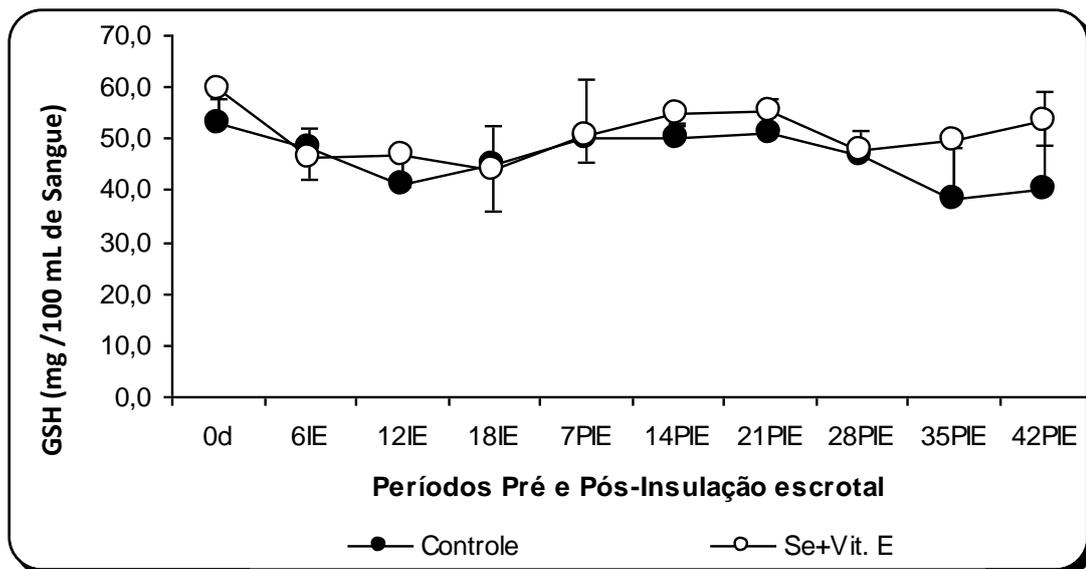


Gráfico 1 – Perfil das médias da atividade da glutatona reduzida (mg/100 mL de sangue) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E

5.2. Concentração Sérica de TBARS (MDA)

Quanto aos valores séricos de molandialdeído, não foi verificado efeito significativo para os fatores grupos ($P = 0,3275$), momentos ($P > 0,4685$) e suas interações ($P = 0,3275$) nos caprinos induzidos a estresse térmico testicular e suplementados ou não com selênio e vitamina E, conforme pode ser visto na Tabela 2. A média geral para o grupo controle foi de $0,71 \mu\text{mol/L}$ e de $0,63 \mu\text{mol/L}$ para o grupo que recebeu SELEVIT E[®].

Os valores médios dos teores de TBARS séricos observados neste estudo (Tabela 2; Gráfico 2) demonstram que não houve alto grau de peroxidação lipídica capaz de determinar elevados valores deste indicador no sangue, embora se tenha observado que nos momentos 12_{IE}, 18_{IE}, estes valores estiveram mais elevados em relação aos animais do grupo suplementado. Mesmo assim, não foram identificados níveis significativos entre grupos. Este perfil confirma a presença de danos oxidativo nas membranas lipídicas tanto dos eritrócitos quanto de outros tecidos, particularmente o testículo, pois, segundo Antunes et al. (2008) e Strauss (1981),

esta substância é o produto final da oxidação pelos radicais livres de alguns lipídeos. O achado importante do presente trabalho é que os teores de TBARs foram inferiores, embora não significativos, no grupo de animais suplementados com SELEVIT E, podendo-se supor que este medicamento reduziu a reação em cascata da formação de radicais livres por meio da formação de glutatona intra-eritrocitária e retirada do fator térmico testicular.

Weigel (2008) não observou efeito benéfico da suplementação apenas de vitamina E em ovinos intoxicados por cobre, encontrando valores maiores de malondialdeído neste grupo em comparação aos grupos tratados apenas com vitamina C ou com a associação das vitaminas C e E. As maiores médias foram encontradas no auge da crise hemolítica, momento em que ocorreu maior dano oxidativo.

De acordo com Beconi et al., (1991), os níveis de malondialdeído podem ser influenciados pela quantidade de células presentes susceptíveis a peroxidação lipídica. Como o estresse calórico foi induzido no testículo, supõe-se que uma das origens dos radicais livres, que induziram estresse oxidativo sistêmico, seja testicular.

Não foi encontrado na literatura valores de referência deste metabólito para caprinos. No entanto, em um trabalho desenvolvido com cabras, para avaliar o efeito da suplementação de vitamina E no desempenho reprodutivo de fêmeas submetidas a protocolo de sincronização estral por meio de colocação de esponjas intravaginais, foi encontrado valor basal médio semelhante aos encontrados neste estudo (SÖNMEZ et al., 2008).

Tabela 2 – Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (P) da concentração sérica de TBARS ($\mu\text{mol/L}$) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E

Grupos	Momentos										“P”
	0d	6IE	12IE	18IE	7PIE	14PIE	21PIE	28PIE	35PIE	42PIE	
CONTROLE	0,72	0,71	1,03	0,97	0,63	0,75	0,57	0,68	0,71	0,50	A
	$\pm 0,24$	$\pm 0,30$	$\pm 0,37$	$\pm 0,18$	$\pm 0,09$	$\pm 0,55$	$\pm 0,26$	$\pm 0,48$	$\pm 0,35$	$\pm 0,19$	
SELEVIT E	0,62	0,73	0,65	0,79	0,42	0,63	0,45	0,54	0,69	0,59	A
	$\pm 0,11$	$\pm 0,26$	$\pm 0,26$	$\pm 0,34$	$\pm 0,34$	$\pm 0,39$	$\pm 0,12$	$\pm 0,16$	$\pm 0,83$	$\pm 0,08$	
Média Geral	0,67	0,72	0,84	0,67	0,52	0,78	0,51	0,61	0,78	0,54	
“P”	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	

0d – Início do experimento; 6 – 18 IE – Dias do período de insulação escrotal; 7 – 42 PIE – Dias do período pós insulação escrotal. Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade; Letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade. Efeito de Grupos = 0,3275; Efeito de Momentos = 0,4685; Interação Grupos x Momentos = 0,5253.

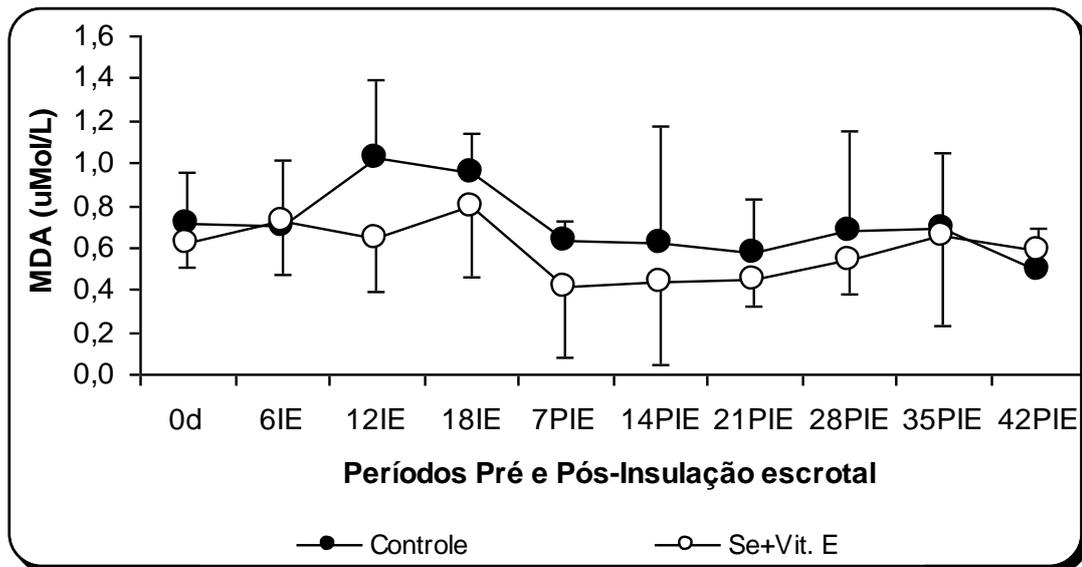


Gráfico 2 – Perfil das médias da concentração sérica de malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E

5.3. Habilidade de Redução Férrica Plasmática (HRFP)

Não foi registrado efeito de tratamentos em relação à habilidade de redução férrica plasmática ($P = 0,3813$), registrando-se médias gerais de 601,85 e 589,87 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente (Tabela 3; Gráfico 3). Quanto ao fator momentos de coletas, este foi significativo ($P = 0,0001$), enquanto que em relação ao fator interação grupos x momentos, este não foi significativo ($P = 0,9865$).

Com relação às médias da HRFP nos diferentes momentos de coleta, foi possível verificar que menores valores de médias foram identificados nos momento inicial e do período da IE em relação aos demais momentos do período pós IE (Tabela 3; Gráfico 3). Embora não tenha sido significativo, pôde-se observar uma tendência do grupo suplementado com selênio e vitamina E a apresentar valores mais elevados de HRFP.

Pela primeira vez foi realizado um ensaio testando a habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) em caprinos induzidos a IE. Menores valores deste índice foram detectados durante o auge da IE e nos primeiros dias após a IE.

Estes resultados podem ser explicados pela depleção das reservas antioxidantes do plasma no auge do estresse oxidativo, uma vez que coincide com os momentos em que ocorreu diminuição dos níveis da GSH (Tabela 1). Guimarães et al., (2007), não encontrou diferença significativa nos valores de HRFP de ratos submetidos a torção do cordão espermático, embora tenha observado redução dos níveis de GSH nos momentos de maior estresse oxidativo. Aguilar-Silva et al. (2002) observaram diminuição da capacidade antioxidante plasmática em atletas submetidos a exercício físico prolongado. Já Alves (2008) observaram aumento significativo da HRFP em ovinos intoxicados por cobre no momento de maior estresse oxidativo, representado pela crise hemolítica.

Após o período de insulação escrotal foi observado um aumento capacidade antioxidante plasmática (Tabela 3), indicando que o organismo foi estimulado a produzir antioxidantes mediante o desafio imposto, estando associado também, o término do insulto térmico testicular. Weigel (2008) e Alves (2008) também observaram este comportamento nos níveis de HRFP de ovinos intoxicados por cobre, onde os maiores índices desta variável foram encontrados dois dias após a crise hemolítica. Ao término do período experimental os resultados da HRFP ainda não haviam atingido os valores basais, embora os demais compostos analisados (MDA e GSH) já houvessem retornado. Este fato sugere a necessidade de maiores estudos para compreender melhor o comportamento da HRFP após estresse oxidativo.

Embora não tenha sido encontrado na literatura valores de referência para a HRFP de caprinos, de acordo com o perfil desta variável no experimento, pode-se crer que esta foi eficiente em avaliar a capacidade antioxidante plasmática. Alves (2008), trabalhando com ovinos intoxicados experimentalmente com Cu, encontrou valores basais semelhantes aos observados neste experimento também no momento basal.

Maiores estudos são sugeridos no sentido de averiguar o grau de relação existente entre esta variável com outras utilizadas como indicadores do metabolismo oxidativo, em situações de estresse térmico testicular e em outras enfermidades de interesse científico.

Tabela 3 – Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (P) da habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E

Grupos	Momentos										“P”
	0d	6IE	12IE	18IE	7PIE	14PIE	21PIE	28PIE	35PIE	42PIE	
CONTROLE	526,38	619,25	422,05	491,38	597,07	514,97	708,93	732,27	679,53	606,90	A
	$\pm 89,85$	$\pm 111,11$	$\pm 115,37$	$\pm 154,36$	$\pm 82,68$	$\pm 49,65$	$\pm 73,52$	$\pm 150,19$	$\pm 148,99$	$\pm 195,77$	
SELEVIT E	515,80	536,35	462,67	381,10	625,00	646,30	744,73	716,80	741,73	647,97	A
	$\pm 74,90$	$\pm 119,67$	$\pm 75,01$	$\pm 73,68$	$\pm 28,69$	$\pm 83,20$	$\pm 66,61$	$\pm 29,17$	$\pm 51,98$	$\pm 55,46$	
Média Geral	521,09	544,47	459,03	477,91	611,03	630,63	726,83	707,87	710,63	627,43	
“P”	d	d	d	d	bc	abc	a	ab	ab	abc	

0d – Início do experimento; 6 – 18 IE – Dias do período de insulação escrotal; 7 – 42 PIE – Dias do período pós insulação escrotal. Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade; Letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade. Efeito de Grupos = 0,3813; Efeito de Momentos = 0,0001; Interação Grupos x Momentos = 0,9865.

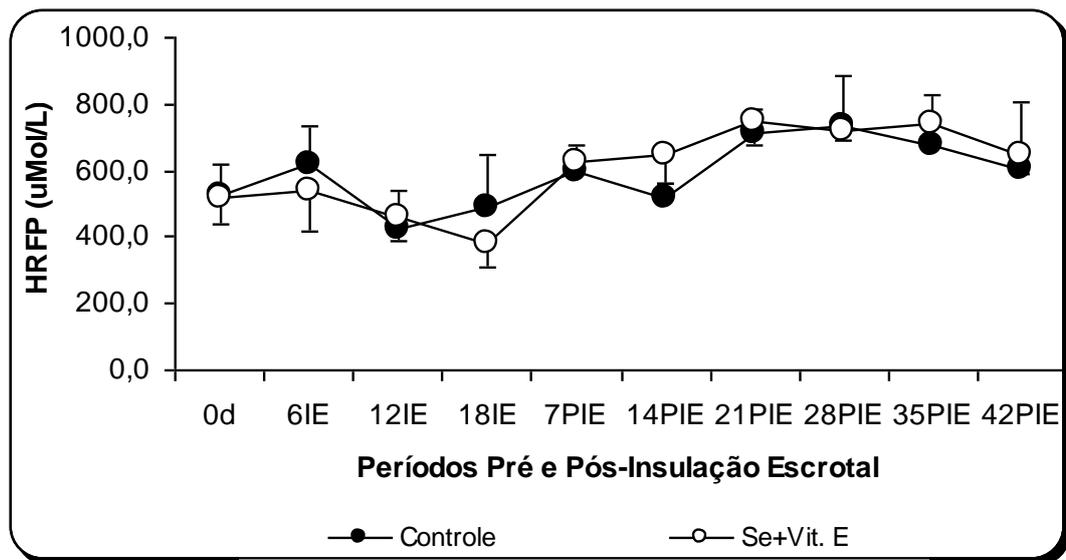


Gráfico 3 – Perfil das médias da habilidade de redução férrica plasmática ($\mu\text{mol/L}$) de caprinos induzidos a insulação escrotal, no período de insulação e pós-insulação escrotal, suplementados ou não com selênio e vitamina E

Com base na análise de relação entre pares de variáveis, todas as combinações foram inferiores a $r = 0,20$ com $P > 0,10$, correspondendo-se, portanto, como relação de baixa intensidade.

5.4. Técnica de Insulação escrotal como indutora de estresse oxidativo sistêmico

De acordo com os perfis dos indicadores bioquímicos de estresse oxidativo pesquisados neste experimento, pode-se afirmar que a técnica de insulação escrotal mostrou-se eficiente em causar dano oxidativo sistêmico, uma vez que se verificou uma variação significativa no diferentes momentos de coleta, particularmente em relação a GSH, a qual diminuiu no período de IE. Florentino et al. (2003ab), Xavier (2007) e Xavier et al. (2008) a consideraram um bom método para o estudo experimental de alterações estruturais e funcionais dos testículos induzidas pelo aumento da temperatura, no entanto, não foram encontrados relatos do uso deste método objetivando estudar as alterações no metabolismo oxidativo sistêmico.

Não foram encontradas referências para explicar o aumento sistêmico das EROs em experimentos de insulação escrotal, onde o calor é induzido localmente.

No entanto, pode-se supor que as EROs liberadas ao nível dos testículos foram liberadas e agiram sobre a membrana eritrocitária, causando ativação de substâncias antioxidantes intra-eritrocitárias, como a GSH. Este dano pôde ser confirmado pelas medidas das TBARs que indicam danos na membrana lipídica dos eritrócitos. Esta suposição baseia-se na afirmação de SIES (1993), onde uma ERO pode se formar em um sítio e provocar lesão em outro.

Outra possibilidade é o aumento dos níveis dos indicadores bioquímicos em função do aumento da frequência respiratória devido ao calor induzido nos testículos, pois Waites (1962), observou aumento significativo da frequência respiratória de carneiros induzidos a insulação escrotal e de acordo com Halliwell e Gutteridge (1999), citado por SILVA et al. 2008 o aumento do consumo de oxigênio resulta na formação de radicais livres. Para confirmar essa hipótese teria sido necessário registrar a frequência respiratória dos animais utilizados neste experimento e avaliar com a destes autores.

6. CONCLUSÕES

1. A suplementação com selênio (0,1 mg/kg) e vitamina E (0,3 UI/Kg), nas referidas doses, não é suficiente para promover uma maior proteção contra os danos oxidativos gerados pelo estresse térmico testicular em caprinos.

2. O método de insulação escrotal empregado aponta para uma eficiência em gerar dano oxidativo sistêmico, o qual pode ser aplicado em estudos de estresse térmico testicular associado ao uso de substâncias antioxidantes.

3. O teste de habilidade de redução férrica plasmática (HRFP) é um teste eficiente para determinação da capacidade antioxidante presente no plasma de caprinos, considerando, também, que é um teste exeqüível e prático.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1048p.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. A role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.

AGUILAR-SILVA, R. H.; CINTRA, B. B.; MILANI, S.; et al. Estado antioxidante do sangue como indicador da eficiência do treinamento em nadadores. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 10, n. 3, p. 7 – 11, 2002.

AHOTUPA, M.; HUHTANIEMI, I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1114-1118, 1992.

ALMON, E.; GOLDFINGER N.; KAPON, A.; et al. Testicular tissue specific expression of p53 supressor gene. **Development Biology**, v. 153, p. 107-116, 1993.

ALVAREZ, C.A. MORAES, G.V. Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista de Saúde e Biologia**, v.1, n.1, p. 42-51, 2006.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V.; SCAPINELLO, C.; et al. Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre as características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelho. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 28, n.2, p.177-185, 2006.

ALVES, K. H. G. **Avaliação dos parâmetros físicos, hemogasométricos e metabolismo oxidativo em ovinos intoxicados com cobre, tratados ou não com tetratiomolibdato**. 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

ANDRADE JÚNIOR, D.R. SOUZA, R. B.;SANTOS, S. A. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

ANTUNES, M. V.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G. D.; et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 279-287, 2008.

APPLEMAN, R.D.; DELOUCHE, J.C. Behavioral, physiological and biochemical responses of goats to temperature, 0° to 40° C. **Journal of Animal Science**, v.17, p. 326-335, 1958.

ARRANZ, J. J.; BAYÓN, Y.; SAN PRIMITIVO, F. Erythrocyte reduced glutathione in Sayaguesa and avileña-negra iberica cattle. **Archivos de Zootecnia**, v. 42, p. 457 – 462, 1993.

BARROS, C. M. Q.; OBA, E.; SIQUEIRA, J. B. et al. Efeito da temperatura ambiente sobre as temperaturas escrotal, intratesticular, intravascular e fluxo sanguíneo testicular de touros. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 354-362, 2009.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR,J.J.; et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621–628, 2003.

BEATTIE, D.A. Bioenergética e metabolismo oxidativo. In: DEVLIN, T.M. (Ed.) **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2003, p. 476-527.

BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHAND, L. M. et al. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 545 – 553, 1991.

BENZIE, I. F. F.; STAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, n. 5, p. 882-888, 1963.

BIESALSKY, H. K. Free radicals theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care**, v. 5, p. 5-10, 2002.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n. 2, p. 123-130,1999.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Testicular degeneration. In: MICKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1993, p. 855-860.

BRENNEISEN, P.; STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 256-267, 2005.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1145-1155, 1999.

BRZEZINSKA, E.; SLEBODZINSKA, A.B.; PIETRAS, B.; et al. Antioxidant Effect of Vitamin E and Glutathione on Lipid Peroxidation in Boar Semen Plasma. **Biological Trace Element Research**, v. 47, n. 1-3, p. 69-74, 1995.

CEBALLOS, M.A.; WITTEWER, F.G. Metabolismo del selenio em rumiantes. **Arquivos de Medicina Veterinaria**, v. 28, n. 2, p. 5-18, 1996.

CEBALLOS, M.A.; WITTEWER, F. G.; CONTRERAS, P. A.; et al. Actividad de glutatión peroxidasa em bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 54-67, 1999.

CHAKI, S. P.; MISRO, M. M.; GHOSH, D.; et al. Apoptosis and cell removal in the cryptorchid rat testis. **Apoptosis**, v. 10, p. 395-405, 2005.

CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITWER, F.G. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. **Veterinaria México**, v.33, n. 3, p. 265-283, 2002.

CIARLINI, P.C.; CIARLINI, L. D. R. P.; ALENCAR, N. X.; et al. Metabolismo oxidativo de neutrófilos em ovelhas naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais e correlação entre nível sérico de cortisol e carga parasitária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, Minas Gerais, v. 54, n. 3, p. 242-247, 2002.

COSTA, J. N. **Leucograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos, proteinograma e imunoglobulinas de bovinos da raça holandesa (*Bos taurus*). Influência do desenvolvimento etário e da suplementação com vitamina E (acetato de DL – alfa – tocoferol)**. UNESP – Botucatu, 2000, 209p. (Doutorado Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. São Paulo.

DADA, R.; GUPTA, N.P.; KUCHERIA, K. Deterioration of sperm morphology in men exposed to high temperatures. **Journal of Anatomical Society of India**, v. 50, n. 2, p. 107-111, 2001.

ESSIG, D.A. NOSEK, T.M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: A dual function of reactive oxygen species? **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 22, n. 5, p. 409-428, 1997.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

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

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

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

FONTEQUE, J. H. **Estresse oxidativo e lipoperoxidação devido a anemia induzida por perda aguda de sangue em ovinos**. 2005. 68f. Tese (Doutorado Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista UNESP, Botucatu, 2005.

FOSTER, L.H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 211-228, 1997.

FOUCRAS, G.; SCHELCHIER, F.; VALARCHER, J. F. et al. La dystrophie musculaire nutritionnelle chez les ruminants. **Le Point Veterinaire**, v. 27, n. 172, p. 36-38, 1996.

FRANCISCO NETO, A.; SILVA, J.C.C.B.; FAGUNDES, D.J.; et al. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 134-139, 2005.

GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1212-1220, 2007.

GRACE, N.D.; VENNING, M.; VICENTE, G. An evaluation of a controlled release system for selenium in lambs. **New Zealand Veterinary Journal**, n. 42, p. 63-65, 1994.

GUEDES, R.M.C.; NOGUEIRA, R.H.G. Efeito da deficiência de vitamina E e selênio sobre a formação e a propagação dos radicais livres de oxigênio e as principais alterações provocadas em suínos. **A Hora Veterinária**, v.14, n. 81, p. 69-74, 1994.

GUIMARÃES, A. M.; SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; et al. Variação sazonal de vitamina A, macro e microelementos no capim, plasma e fígado de novilhas Nelore, criadas em pastagens de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 1, p. 57-66, 1992.

GUIMARÃES, S.B.; ARAGÃO, A.A.; SANTOS, J.M.V.; et al. Oxidative stress induced by torsion of the spermatic Cord in Young rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 30-33, 2007.

HALOVSKÁ, K.; LENÁRTOVÁ, V.; PEDRAJAS, J. R.; et al. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in sheep organs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 115B, n. 4, p. 451-456, 1996.

HIKIM, A.P.S.; SWERDLOFF, R.S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 38-47, 1999.

HOWELL, J.; GOONERATNE, S.R. The pathology of Copper toxicity. In.: HOWELL, J.; GAWTHORNE, J. M. **Copper in animals and man**. Florida: CRS press, 1987, v.2, p. 53-78.

HULET, C. V.; SHELTON, M. Ovinos e caprinos. In.: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1982. p. 397-411.

HURST, J.K.; BARRETTE JR, W.C.; MICHEL, B.R.; et al. Hypochlorous acid and myeloperoxidase-catalyzed oxidation of iron-sulfur clusters in bacterial respiratory dehydrogenases, **European Journal Biochemistry**, v. 202, p. 1275-1282, 1991.

HWANG, S. O.; BOSWELL, S. A.; SEO, J. S. et al. Novel oxidative stress-responsive Gene *ERS25* functions as a regulator of the heat-shock and cell death response. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 19, p. 13063-13069, 2008.

IBGE – Instituto de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2008**, Disponível em: < <http://www.ibge.com.br/home/estatistica/economia/ppm/2008/ppm2008.pdf>>. Acesso em: 26 de jan. 2010.

IGBOKWE, I. O.; BAH, G. S. Erythrocyte glutathione concentrations in Nigerian sheep in the Sahel region, **Revue d Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 52, n. 1, p. 77 – 80, 1999.

YIN, Y.; STAHL, B. C.; DEWOLF, W. C.; et al. p53-Mediated germ cell quality control in spermatogenesis. **Developmental Biology**, v. 204, p. 165-171, 1998.

JAIN, N.C. **Shalm's Veterinary Hematology**. 4^a ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.

JENNINGS, J.J. Effect of season and mating frequency on semen characteristics in rams. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1., Kracow, 1976. **Anais...** Kracow: The Polish Society for Animal Reproduction, 1976. p. 998-1001.

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

JORDÃO JÚNIOR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina-Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JUKOLA, E.; HAKKARAINEN, J.; SALONIEMI, H.; et al. Effect of selenium fertilization on selenium in feedstuffs and selenium, vitamin E, and β -carotene concentrations in blood of cattle. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 831-837, 1996.

KUMAGAI, A.; KODAMA, H.; KUMAGAI, J.; et al. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 1, p. 118-123, 2002.

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

LEITE, E.N.; SIMPLÍCIO, A.A. Importância econômica da produção de ovinos e caprinos no nordeste brasileiro. In: **EMBRAPA – Sistema de produção de caprinos e ovinos de corte para o nordeste brasileiro. Sistemas de Produção**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. Versão Eletrônica. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/caprinoseovinosdecorte/capriooovinoscortenebrasil>>. Acesso em: 18 de jan. 2009.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 60-65, 2003.

LÔBO, R.N.B. Raças. In: **EMBRAPA – Sistema de produção de caprinos e ovinos de corte para o nordeste brasileiro. Sistemas de Produção**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. Versão Eletrônica. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/caprinoseovinosdecorte/capriooovinoscortenebrasil>>. Acesso em: 18 de jan. 2009.

LOMBA, F. Influence des rapports anions-cations et oxydants-antioxydants dans les rations des vaches laitières en période de tarissement sur incidence du syndrome du part. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 140, p. 109-122, 1996.

LOPES, S.T.A.; PAES, P. R. O.; KOHAYAGAWA, A.; et al. Atividade funcional neutrofílica em cabras com mastite induzida experimentalmente por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetato DL- α -tocoferol). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 515-521, 2003.

LUCCI, C.S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole, 1997. 169p.

LUCCI, C. S. Suplementação de selênio para bovinos leiteiros. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 1985, CABORIÚ. **Anais...** Caboriú, 1985. p. 73.

McGRATH, L.T.; DOUGLAS, A.F.; McCLEAN, E.; et al. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, n. 2, p. 179-188, 1995.

MATES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MEDEIROS, R. M. T.; PAULINO, C. A. Vitaminas. In.: Spinosa, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. P. 625-640.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira** v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MILLER, J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function. **Journal Dairy Science**, v. 76, p. 2812-2823, 1993.

MORENO, A.; HABA, M.; MORERA, L.; et al. Erythrocyte GSH concentration in the Malagueña goat breed. **Archivos de Zootecnia**, v. 36, n. 136, p. 313 – 319, 1987.

MORGENTALER, A.; STAHL, C.; YIN, Y. Testis and temperature. An historical, clinical and research perspective. **Journal of Andrology**, v. 20, p. 189-195, 1999.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 4ª ed., São Paulo: Sarvier Editora, 2006. 1202 p.

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

NRC – National Research Council. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. National Academy Press, Washington DC, 2000. 248p.

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

ORTOLANI, E. L. Macro e microelementos. In.: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999. p. 555-565.

PASCHOAL, J.J.; ZANETTI, M.A.; CUNHA, J.A. Suplementação de selênio e vitamina E sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 72-83, 2003.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which germ cell death. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 913- 919, 2009.

PEHRSON, B.; HAKKARAINEN, J.; BLOMGREN, L. Vitamin E status in newborn lambs with special reference to the effect of dl- α -tocopheryl acetate supplementation in late gestation. **Acta Veterinary Scandinavica**, v. 31, p. 359- 367, 1990.

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

PENG, J.; GRAHAM, L.J.; WATSON, K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 11, p. 1598-1606, 2000.

PHILLIPS, R.W. Vitaminas Lipossolúveis. In: BOOTH, N.H.; McDONALD, L.E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 40, p. 553-560.

PUGH, D.G.; DARREL, L.; RANKINS, J.; et al. Alimentação e nutrição. In: PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 2, p. 30-31.

RAO, B.R.; PANDEY, J.N.; JAIRAM, B.T. Seasonal variation of certain biochemical constituents in the semen of Nail and Corriedale rams and their relationship with physical attributes under semi-arid tropical regions. **Indian Veterinary Journal**, v. 60, p. 199-204, 1983.

REIS, M.C.; COSTA, J.N.; PEIXOTO, A.P.C.; et al. Efeito da idade de da suplementação oral com acetato de DL-alfa-tocoferol sobre os níveis séricos de vitamina e sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em bezerros. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 6, n. 1, p. 8-17, 2005.

RIET-CORREA, F.; TABOSA, I.M.; AZEVEDO, E.D.; et al. Doenças dos ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba. **Semi-árido em Foco**, v. 1, n.1, 2003. 116p.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; et al. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 518-522, 2004.

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. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 229-239, 2001.

ROSA, D.E.; MATTIOLI, G.A. Metabolismo y deficiencia de cobre en los bovinos. **Analecta Veterinaria**, v. 22, n. 1, p. 7-16, 2002.

ROSA, L. C. A.; SIQUEIRA, M. M.; ANDRADE, P. et al. Efeito do selênio e vitamina “E” sobre a retenção de placenta do gado leiteiro. **Artigos de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 117-122, 1985.

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

RUCKER, R.B.; MORRIS, J.G. The vitamins. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. London: Academic Press, 1997. cap. 24, p. 703-738.

SANTIAGO, C. M. Estudo da influência do uso de emulsão de selênio-tocoferol nas vacas de corte em gestação no Rio Grande do Sul, Brasil. **Hora Veterinária**, Porto Alegre, RS, v.31, n. 6, p. 23-25, 1986a.

SANTIAGO, C. M. Estudo do efeito da emulsão de selênio-tocoferol na fecundidade de vacas de corte no Rio Grande do Sul, Brasil. **Hora Veterinária**, v. 32, n. 6, p. 13-15, 1986b.

SANTOS, D. O. **Insulação escrotal em caprinos (*Capra hircus*, LINNAEUS, 1758) adultos e suas conseqüências nas características escroto-testiculares do sêmen**. 1995. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1995.

SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 9, p. 1835-1841, 2000.

SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Características escroto-testiculares e do ejaculado em bodes mestiços submetidos à insulação escrotal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 287-291, 1998.

SAS INSTITUT. **SAS User's Guide**: statistical Analysis Systems Institute. Inc. Cary, 2000.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SETCHELL, B. P. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 179-194, 1998.

SHARMA, R. K. PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R.; et al. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2801-2807, 1999.

SHIRAISHI, K.; TAKIHARA, H.; MATSUYAMA, H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. **Word Journal of Urology**. ago. 2009. Versão online.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal Biochemistry**. v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; ALFARO, C.E.P.; et al. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semi-árido paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 1, p. 07-14, 2005.

SILVA, R.M.N.; EVÊNCIO NETO, J.; SOUZA, A. P.; et al. Efeitos antioxidantes da vitamina E e selênio administrados por via parenteral em ruminantes. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 43, p. 37-47, 2008.

SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 1. ed. London: Academic Press, 1997. cap. 9, p. 223-237.

SMITH, K.L.; HARRISON, J.H.; HANCOCK, D.D.; et al. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1293-1300, 1984.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. **Caprine Goat medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. 381p.

SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.; WEISS, W.P. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. **Journal Animal Science**, v. 75, p. 1659-1665, 1997.

SOARES, P.C. **Efeito da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo em ovinos**. 110 2004.117f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2004.

SÖNMEZ, M.; BOZKURTA, T.; TÜRKA, G.; et al. The effect of vitamin E treatment during preovulatory period on reproductive performance of goats following estrous synchronization using intravaginal sponges. **Animal Reproduction Science**. V. 114, n. 1-3, p. 183-192, 2009.

SPEARS, J.W. Trace mineral bioavailability in ruminants. **The Journal Nutrition**, v.133, p. 1506S-1509S, 2002.

STRAUSS, R. G. Malonaldehyde formation is not a suitable screening test to detect oxidation in human neutrophils. **Journal Clinical of Pathology**, v. 34, p. 800-802, 1981.

TAVAROL, L.C. Vitaminas, esquecidas ou desconhecidas? **Melhor**, v.42, 2004. Disponível em: <http://www.dbosul.com.br/revistas/revista_Melhor/pdbos_matéria_impressao.asp?edicao=042&Arquivo=ARTIGO1.TXT>. Acesso em: 18 de fev. 2009.

TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: more question than answers. **Nutrition Research**, v. 20, n. 3, p. 449-459, 2000.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3.ed. Cabi Publishing: Wallingford, 1999. 614p.

UPSTON, J. M.; TARENTIS, A. C.; STOCKER, R. Tocopherol-mediated peroxidation (TMP) of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. **Faseb Journal**. v.13, n.9 p.977-994, 1999.

WAITES, G. M. H. The effect of heating the scrotum of the ram on respiration and body temperature. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 47, p. 314-323, 1962.

WICHTEL, J.J. A review of selenium deficiency in grazing ruminants. Part 1: New roles for selenium in ruminant metabolism. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, n. 2, p. 47-52, 1998.

WEIGEL, R. A. **Avaliação do metabolismo oxidativo e da histopatologia renal e hepática de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato e vitaminas antioxidantes**. 2008. 100f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

WRIGHT, J. R.; COLBY, H. D.; MILES, P. R. Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 206, p. 296-304, 1981.

VALLEJO, M.; TUNÓN, M. J.; GONZÁLES, P. Interacciones entre parámetros sanguíneos (HB, GSH, hematocrito, Ke e Kp) en caprinos. **Arquivos de Zootecnia**, v. 38, n. 141, p. 177 – 188, 1989.

VAN METRE, D. C.; CALLAN, R. J. Selenium and vitamin E. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 373-402, 2001.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILVA, H. M.; REIS, R. B. et al. Retenção de placenta em gado leiteiro – efeito da administração de selênio sobre a incidência de retenção de placenta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 41, p. 315-322, 1989.

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

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

VILLARES, J. B. Biotecnologia da reprodução animal, in.: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 1976, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte, MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1976. p. 192-215.

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

XAVIER, G. C.; MAYMONE, A. C. M., SOARES, P. C.; et al. Suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos induzidos à insulação escrotal. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 1, p. 103 – 111, 2008.

ZANETTI, M. A. LUCCI, C. S. MEIRELLES, G. J. R. Selênio em bovinos leiteiros no Estado de São Paulo – Suplementação de selênio para vacas em fase final de gestação. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v. 2, n.21, p. 141-145, 1984.