

Suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos induzidos à insulação escrotal

Guadalupe de Carvalho Xavier¹, Ana Cristina Marinho Maymone¹, Pierre de Castro Soares¹, Valdemiro Amaro da Silva Junior² e Maria Madalena Pessoa Guerra^{1*}

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. ²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: mpguerra@dmv.ufpe.br

RESUMO. Avaliou-se o efeito da suplementação alimentar com Selênio e Vitamina E sobre os parâmetros seminais de caprinos submetidos à insulação escrotal (IE). Utilizaram-se 12 animais distribuídos, aleatoriamente, em grupos-controle (G1) e Selênio e Vitamina E (G2). Dois meses após o início da suplementação alimentar nos animais do G2, realizou-se IE durante 18 dias. Após este período (IE), a suplementação foi mantida por mais 42 dias (fase pós-insulação escrotal, PIE). Para análise seminal, foram efetuadas seis colheitas de sêmen (antes, durante e após a IE). Não foi observado efeito da suplementação com Selênio e Vitamina E nas características quanti-qualitativas do sêmen. Com exceção do volume seminal, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de colheita para ambos os grupos, com redução de motilidade, vigor, concentração espermática, integridade do acrossoma e de DNA. Decorridos 42 dias da IE, observou-se normalidade de motilidade, vigor espermático, integridade de acrossoma e de DNA em um animal de cada grupo. Conclui-se que a temperatura elevada nos testículos de caprinos submetidos à IE altera os parâmetros seminais; a suplementação com Selênio e Vitamina E, nas concentrações de 0,1 e 0,3 mg kg⁻¹ PV⁻¹, respectivamente, não é suficiente para minimizar os efeitos deletérios da insulação escrotal induzida.

Palavras-chave: parâmetros espermáticos, antioxidantes, dieta, caprino.

ABSTRACT. Effect of diet supplementation with Selenium and Vitamin E on the seminal parameters of goats induced to scrotal insulation. This study evaluated the effect of Selenium and Vitamin E supplementation on the semen parameters of goats induced to scrotal insulation (SI). Twelve animals were used, distributed randomly in two groups (G1 = Control; G2 = Selenium and Vitamin E). Two months after the start of diet supplementation on G2 animals, it was realized SI was induced during 18 days. After this period (SI), supplementation was maintained during 42 days, corresponding to the post-insulation phase (PSI). For semen analysis, six semen collections were performed (before, during and after SI). There was no effect of Selenium and Vitamin E supplementation on the quanti-qualitative characteristics of the semen. With the exception of semen volume, a significant effect ($p < 0.05$) was observed between collection days for both groups (G1 and G2), with reduction in motility, vigor, sperm concentration, acrosome and DNA integrity. After 42 days of SI, normal values were observed for motility and sperm vigor, acrosome and DNA integrity in one animal per group. It can be concluded that the high temperature of the testes of goats subjected to SI alters semen parameters; Selenium and Vitamin E supplementation on goats, in a concentration of 0.1 and 0.3 mg kg⁻¹ BW⁻¹, respectively, was not sufficient to minimize the deleterious effects of induced scrotal insulation.

Key words: sperm parameters, antioxidants, diet, goats.

Introdução

No Brasil, algumas tecnologias como inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro* têm sido utilizadas visando incrementar o nascimento de cabritos. Além disso, o aumento do número de importações de animais e embriões tem crescido consideravelmente na última

década, resultando em sérias preocupações de ordem sanitária e genética. No caso de importação de animais, o problema se agrava em criações localizadas na região nordeste, em virtude das diferentes condições climáticas encontradas por estes animais, as quais podem comprometer o processo reprodutivo de machos e fêmeas, resultando em

baixos índices reprodutivos e produtivos.

As variações estacionais provocam mudanças na atividade sexual dos machos e na produção quantitativas do sêmen por meio da interação de fatores como disponibilidade de alimentos, temperatura, fotoperíodo e atividade hipofisária (Jennings, 1976). A temperatura é, frequentemente, um fator preocupante, uma vez que a intensidade do estresse térmico pode alterar os mecanismos de termorregulação testicular, favorecendo a degeneração do epitélio seminífero e, conseqüentemente, a ocorrência de falhas na espermatogênese (Santos *et al.*, 1998), afetando a produção total e a qualidade do sêmen (Hulet e Shelton, 1982).

Diversos fatores causadores de estresse (exposição a calor e metais pesados; ingestão excessiva de ionóforos, análogos de aminoácidos e venenos) determinam alterações similares na expressão de genes e no acúmulo de proteínas de choque térmico (HSP). Além disso, a função das células é afetada pelo processo de oxidação que ocasiona degeneração causada por espécies reativas de oxigênio (ROS), interferindo na atividade biológica dos lipídeos e das proteínas essenciais para a função celular. Tais efeitos da oxidação devem ser evitados, sendo essencial a compreensão do funcionamento das ROS envolvidas no processo de homeostase celular, assim como na ocorrência de fatores patológicos (Silva, 2006). Nos testículos, tem sido observado estresse oxidativo em pacientes portadores de criptorquidismo (Peltola *et al.*, 1995) ou varicocele (Pasqualotto *et al.*, 2000), condições que provocam aumento da temperatura testicular, inibem os sistemas de defesa antioxidantes e reduzem a concentração e a porcentagem de espermatozoides móveis no sêmen humano resultante da peroxidação lipídica da membrana celular (Aziz *et al.*, 2004).

A produção equilibrada de ROS e de enzimas antioxidantes está relacionada às funções espermáticas fisiológicas (Aitken, 1994; Aitken e Baker, 2004). Todavia, a produção excessiva destes metabólitos reduz a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides, para aumentar os defeitos dos espermatozoides e iniciar uma reação em cadeia de oxidação de proteínas, lipídeos e DNA (Aitken e Baker, 2004; Sikka, 2004).

Na espécie caprina, não existem relatos que associam o efeito de temperaturas elevadas à adição de antioxidantes na dieta, como Selênio e Vitamina E, sobre a eficiência reprodutiva de machos criados na região nordeste. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da suplementação alimentar

com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos submetidos à insulação escrotal (IE).

Material e métodos

Foram selecionados, após exame andrológico, 12 machos da espécie caprina, sem raça definida (SRD), adultos, com idade variando entre 7 e 8 meses. Administrou-se anti-helmíntico (Desofenol – IBASA 20%) para o controle de parasitos internos. Em seguida, os animais foram distribuídos por amostragem probabilística em dois grupos (G1 = Controle; G2 = Selênio e Vitamina E) constituídos de seis animais cada. Todos animais foram mantidos em regime de confinamento, sendo alimentados com feno Tifton-85 e suplementados com ração balanceada (farelo de milho e farelo de soja; 200 g animal⁻¹ dia⁻¹). A dieta foi isoproteica e apresentava os respectivos teores de matéria seca (87,19%), proteína bruta (17,81%), energia metabolizável (9,75 Mj kg⁻¹), cálcio (0,41%) e fósforo (0,32%). Além de ser fornecida, no cocho, água e sal mineral (para atender às necessidades de Ca e P dos animais) à vontade. Durante o período de adaptação de 60 dias, todos animais foram submetidos à pesagem semanal, objetivando-se manter a linearidade entre ganho de peso e dose diária de Selênio e Vitamina E adicionada à ração balanceada dos animais do G2. A quantidade ofertada de Selênio foi de 0,1 mg kg⁻¹ PV, enquanto a de Vitamina E foi de 0,3 UI kg⁻¹ PV (Selevit E[®], Integral Agroindustrial Ltda.). Os animais do G2 iniciaram a dieta com Selênio e Vitamina E 60 dias antes da insulação escrotal (IE) e continuamente até o término do experimento. Os animais do G1 receberam apenas a dieta sem a referida suplementação.

Após o período de adaptação (60 dias), os 12 animais foram submetidos à IE, com a colocação de bolsa plástica de polietileno de dupla parede, separada por uma camada de algodão, de espessura aproximada de 5 mm, durante 18 dias (Florentino *et al.*, 2003). No 18º dia, término da fase de IE, três animais de cada grupo foram escolhidos por amostragem probabilística e retirados deste experimento para outro estudo, cujo objetivo é a análise histomorfométrica do parênquima testicular. Os três animais restantes de cada grupo tiveram continuidade na oferta das dietas por mais 42 dias, correspondendo ao período pós-insulação escrotal (PIE). O período experimental foi de 120 dias.

Durante o período experimental, foram efetuadas seis colheitas de sêmen, sendo uma anterior à IE (d0), uma ao término da IE (d18) e quatro no período PIE (d7, 21, 35 e 42). O sêmen foi obtido

com uso de eletroejaculador (Eletrovét, Brasil), e foram produzidos, em média, três estímulos elétricos de baixa potência (até 80 mA) por animal, com duração de 2 a 3 segundos e intervalo de 0,5 segundo. As colheitas de sêmen foram realizadas no período matinal, antes do recebimento das dietas.

As amostras de sêmen foram acondicionadas em copos coletores devidamente identificados. Em seguida, o material foi encaminhado ao laboratório para análise. As variáveis consideradas foram: volume seminal; concentração, motilidade individual progressiva (MIP), vigor e morfologia espermática, além de integridade de acrossoma e de DNA. O volume seminal foi medido em tubo coletor graduado em mL.

A concentração espermática foi avaliada em Câmara de Neubauer (em bilhões de espermatozoides mL⁻¹), após diluição de uma alíquota de sêmen, na proporção de 1:200, em solução fisiológica formolizada a 1%, de acordo com o Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Foram avaliados a motilidade individual progressiva (MIP; 0,0-100,0%) e o vigor espermático (0-5), de acordo com o CBRA (1998). Utilizou-se o método de Câmara Úmida (Mies Filho, 1987) para análise da morfologia espermática, e foram analisadas 200 células pelo microscópio de contraste de fase (Zeiss, Germany) para determinação do percentual de espermatozoides morfologicamente normais (1.000X).

Foi usada a técnica de coloração com FITC-conjugada ao *Peanut* aglutinina (FITC-PNA), para análise da integridade de acrossoma (Roth *et al.*, 1998). Inicialmente, alíquotas de 10 µL de sêmen foram utilizadas para preparação de esfregaços, os quais foram armazenados a 4°C e protegidos da luz até posterior análise. Um total de 200 espermatozoides lâmina⁻¹ foi analisado usando microscópio de Fluorescência (Olympus, Germany) e classificado como: acrossoma intacto (AI), se o acrossoma apresentava-se corado em verde; acrossoma reagido ou danificado (AR), quando nenhuma coloração esteve presente ou quando se observou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da célula.

Foi realizada a análise da integridade de DNA por meio da técnica de Laranja de Acridina, segundo Evenson *et al.* (1999). Amostras de sêmen (10 µL) foram diluídas em solução de TNE (0,15 M NaCl; 0,01 M TRIS.HCl; 1 mM EDTA.Na₂.2H₂O; q.s.p. 100 mL, pH de 7,4), em tubos de microcentrífuga (1,5 mL), e incubados a -20°C para posterior análise. Após descongelamento em banho-maria (37°C), alíquotas de sêmen + TNE (200 µL) foram

transferidas para outro tubo de microcentrífuga (500 µL) devidamente identificado e conservado em gelo seco. A seguir, adicionaram-se 100 µL da solução ácido-detergente (0,1 mL Triton X-100; 0,877 g NaCl; 8 mL 1 N HCl, pH 1,4), permanecendo em gelo seco por 30 segundos. Ao término deste período, foram acrescentados 300 µL da solução de Laranja de Acridina e homogeneizados. Foram colocados 5 µL desta solução em lâmina, cobertos com lamínula e foi observado o total de 200 espermatozoides lâmina⁻¹, classificando-os como: Danificado (D), quando observado o espermatozoide de coloração laranja ou avermelhado; Intacto (I), espermatozoide corado de verde fluorescente.

O esquema de análise de variância para estudar cada uma das variáveis, sob efeito de dois grupos de tratamentos (sem e com suplementação com Selênio e Vitamina E) e intervalos de tempo de colheita de material biológico, foi aquele utilizado para análise de um delineamento inteiramente casualizado, para um número igual de observações (Sampaio, 1998).

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

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

Resultados e discussão

O volume seminal dos animais não sofreu efeito de tratamento e dia de colheita em relação aos grupos-controle e tratados com Selênio e Vitamina E (Figura 1). A pequena variação do volume do ejaculado não apresentou diferença estatística (p > 0,05) entre os animais de ambos os grupos durante o período de insulação escrotal, corroborando os achados de Moreira *et al.* (2001), utilizando o método de eletroejaculação em ovinos da raça Santa Inês. Este fato pode ser explicado pelo uso do método de eletroejaculação para a colheita seminal, estimulando diretamente as glândulas sexuais acessórias (Pugh, 2005).

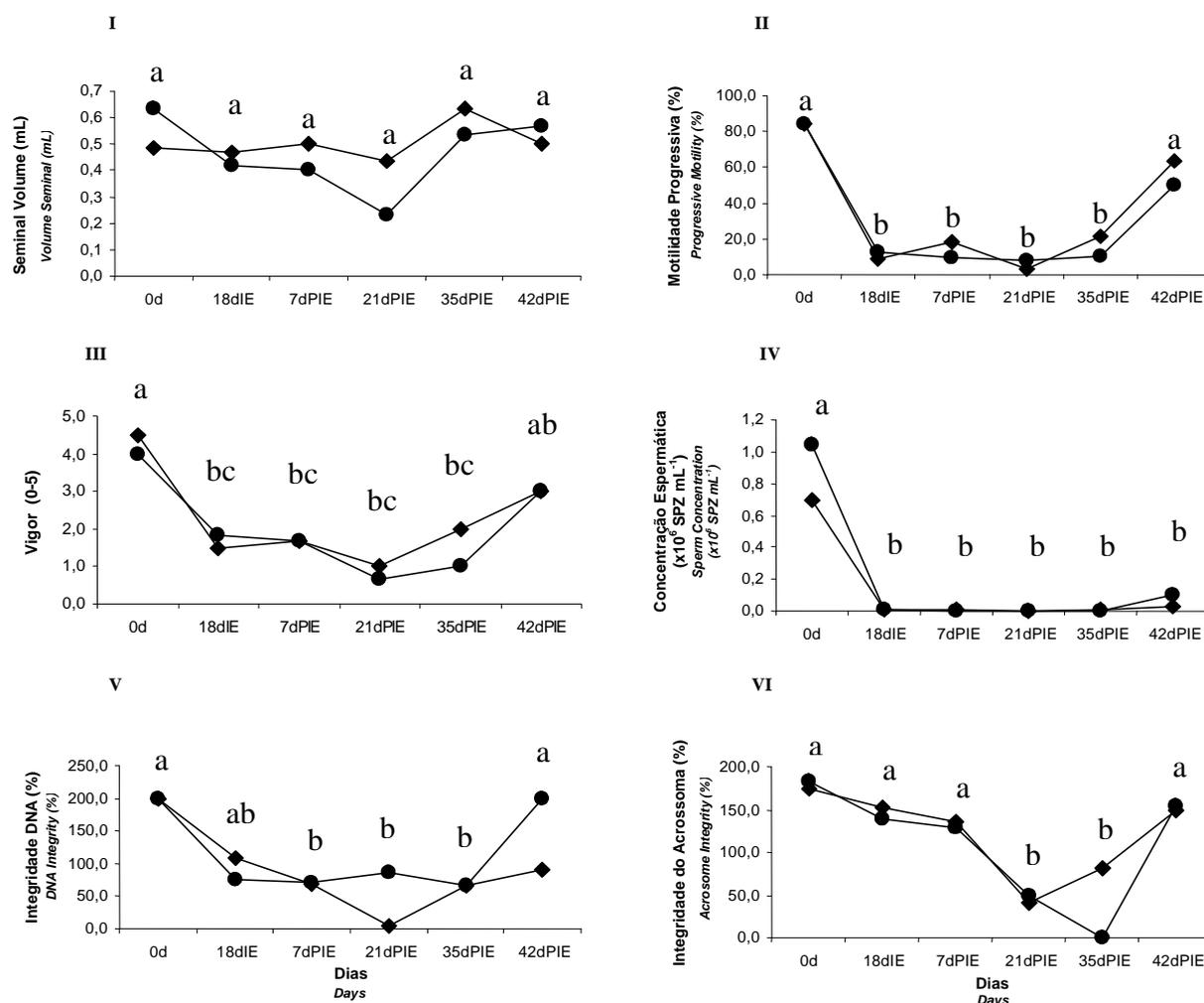


Figura 1. Médias gerais de volume seminal (I), motilidade progressiva - MIP (II), vigor (III), concentração (IV), integridade do DNA (V) e integridade do acrossoma (VI) espermático antes e durante o período de insulação escrotal (IE) e no período pós-insulação escrotal (PIE), de caprinos submetidos à IE [sem antioxidante (●)] e suplementados com Selênio e Vitamina E na dieta (◆). Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre dias de colheita.

Figure 1. General averages of semen volume (I), progressive motility - PM (II), vigor (III), concentration (IV), DNA integrity (V) and acrosome integrity (VI), before and during the scrotal insulation (SI) period and on the scrotal post-insulation period (PSI), on goats submitted to SI [no antioxidant (●)] and supplemented with Selenium and Vitamin E on diet (◆). Distinct letters indicate statistical difference ($p < 0.05$) among collection days.

Não foi registrado efeito de tratamento para o conjunto de variáveis (MIP, vigor, concentração, integridade de DNA e integridade de acrossoma) do sêmen de caprinos submetidos à insulação escrotal e tratados ou não com Selênio e Vitamina E ($p \geq 0,1800$; Figura 1). Quanto ao dia de colheita, verificou-se que MIP ($p < 0,0001$), vigor ($p < 0,0001$), concentração ($p < 0,0001$), integridade do DNA ($p < 0,0018$) e integridade do acrossoma ($p < 0,0001$) sofreram alteração durante o período experimental, compreendido por período de insulação escrotal (IE) e período de pós-insulação escrotal (PIE). Entretanto, não foi registrado efeito interativo entre tratamentos e tempos de colheita para este conjunto de variáveis ($p \geq 0,1204$).

Após a insulação escrotal (d18 IE), os valores médios de MIP, vigor e concentração espermática foram menores ($p \leq 0,0138$) do que aqueles obtidos antes da IE (d0), enquanto as menores médias de integridade de DNA e de integridade do acrossoma só foram registradas, respectivamente, a partir do d7 e do d21 depois da IE (Figura 1). A redução dos valores de MIP, vigor, concentração e integridade de DNA e acrossoma, obtidos após o insulto térmico, considerando os valores observados antes da IE (d0), corrobora os relatos da literatura (Wildevs e Entwistle, 1983; Barth, 1993; Fonseca e Chow, 1995), ao ressaltarem que o aumento artificial da temperatura do escroto altera os parâmetros quanti-qualitativos do sêmen, afetando a

qualidade e, conseqüentemente, o poder fecundante dos espermatozoides. Após o término da IE (d18), observaram-se olizoospermia e azoospermia nos animais, já relatados anteriormente como resultado da hipertermia testicular que altera a espermatogênese dos animais domésticos (Lägerlof, 1983; Barth, 1993).

Nos d7, d21 e d35 do período PIE, nos animais que apresentaram células espermáticas no ejaculado, constatou-se que as médias de MIP, vigor e integridade do DNA mantiveram-se menores do que no dia 0 (início da IE) e semelhantes àsquelas observadas ao término do período de IE (d18), enquanto a concentração espermática manteve-se com médias menores até o d42 PIE, quando comparadas ao d0. No d42 PIE, foram verificadas médias semelhantes ao dia 0 (antes do início da IE) para MIP, vigor, integridade do DNA e do acrossoma, em ambos os grupos (Figura 1). Todavia, ressalta-se que a avaliação espermática foi realizada em apenas um animal de cada grupo, em virtude de os outros caprinos ainda apresentarem azoospermia. Nestes animais, os valores de MIP, vigor e integridade de acrossoma apresentaram-se próximos àqueles encontrados antes da IE, ratificando os relatos de Lägerlof (1983) e Barth (1993), ao evidenciarem que, após a IE de quatro dias em *Bos taurus*, os resultados dos parâmetros seminais apresentaram-se normais depois de 42 dias do término do insulto térmico. Contrariamente, Moreira *et al.* (2001) observaram em carneiros Santa Inês que, após insulto térmico de sete dias e 12 colheitas pós-IE durante 118 dias, a concentração espermática somente apresentou valores próximos ao normal no 79º dia do PIE, período menor de IE e maior de PIE do que aquele realizado neste experimento. Além disso, segundo estes autores, a MIP e o vigor apresentaram-se alterados logo no primeiro dia após o término de IE, tendo seus valores próximos aos normais apenas 90 dias após o término de IE.

Tendo em vista que a espermatogênese em caprinos apresenta duração média de 60 dias, o período de recuperação do insulto térmico é maior do que os 42 dias em que foram realizadas as avaliações dos parâmetros seminais dos animais deste experimento. No entanto, neste momento (d42), constatou-se melhora significativa de alguns parâmetros seminais (MIP, vigor e integridade do acrossoma) em um animal de cada grupo, apesar de a concentração espermática ainda apresentar valores reduzidos. No entanto, não é possível afirmar que todos animais apresentariam

espermatogênese normal aos 60 dias PIE, uma vez que a oligozoospermia ou azoospermia, observada em dois animais de cada grupo, pode estar de acordo com os relatos de Florentino *et al.* (2003), ao concluírem que o desafio térmico escrototesticular durante 18 a 30 dias em caprinos determina perda da qualidade do ejaculado com poucas possibilidades de recuperação.

Recentemente, demonstrou-se que, em resposta ao estresse térmico, a degeneração das células germinativas ocorre por meio da morte celular programada (apoptose), caracterizada pela fragmentação de DNA (Tapanainem *et al.*, 1993; Billing *et al.*, 1995; Mieusset e Bujan, 1995), por serem células termo-sensíveis em todos estágios da espermatogênese. Por outro lado, a regeneração da função espermática, após o dano causado pelo calor, depende da extensão e da duração do insulto térmico, assim como do intervalo de tempo do término da injúria à restauração de espermatozoides normais no ejaculado, correspondente ao período de início da diferenciação na espermatogênese até a ejaculação (Waites e Setchell, 1990; Setchell, 1998).

Neste experimento, observou-se que o porcentual de células com DNA íntegros reduziu após o período de IE, mas somente evidenciou diferença estatística ($p < 0,05$) sete dias após o término do insulto térmico, apresentando valores baixos até o d35 PIE nos animais do grupo-controle e até o d42 PIE nos tratados com Selênio e Vitamina E, demonstrando que a suplementação alimentar com antioxidantes não auxiliou a recuperação da integridade do material genético. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Sun *et al.* (1997) e Lopes *et al.* (1998), ao afirmarem que o sêmen de má qualidade apresenta-se com grande porcentual de espermatozoides com DNA danificado.

Os danos do DNA poderiam estar associados ao estresse oxidativo decorrente da produção excessiva de ROS (Lopes *et al.*, 1998). Todavia, os animais do grupo tratado com Selênio e Vitamina E não apresentaram menor porcentual de células com DNA danificado quando comparado ao grupo-controle; provavelmente o tipo de oxidante produzido não foi sensível à ação antioxidante do Selênio e da Vitamina E, ou as concentrações destes antioxidantes não foram eficientes para contrapor os efeitos negativos da elevada concentração de ROS, nas condições do experimento.

Com base na análise de relação entre pares de variáveis (Figura 2), verificou-se alto coeficiente

de relação entre vigor x MIP ($r = 0,91$), integridade do acrossoma x vigor ($r = 0,75$), integridade de acrossoma x MIP ($r = 0,65$), assim como entre concentração espermática x vigor ($r = 0,72$), concentração espermática x MIP ($r = 0,80$) e entre integridade do DNA e vigor ($r = 0,60$), integridade do DNA x MIP ($r = 0,63$) e integridade do DNA x integridade do acrossoma

($r = 0,69$). Conforme esperado, observou-se correlação entre pares de variáveis da qualidade do sêmen (MIP, vigor, concentração espermática, integridade de DNA e de acrossoma), refletindo o efeito quadrático compatível com o grau de injúria causada pela insulação escrotal e, ao longo do tempo, uma evolução progressiva da função testicular.

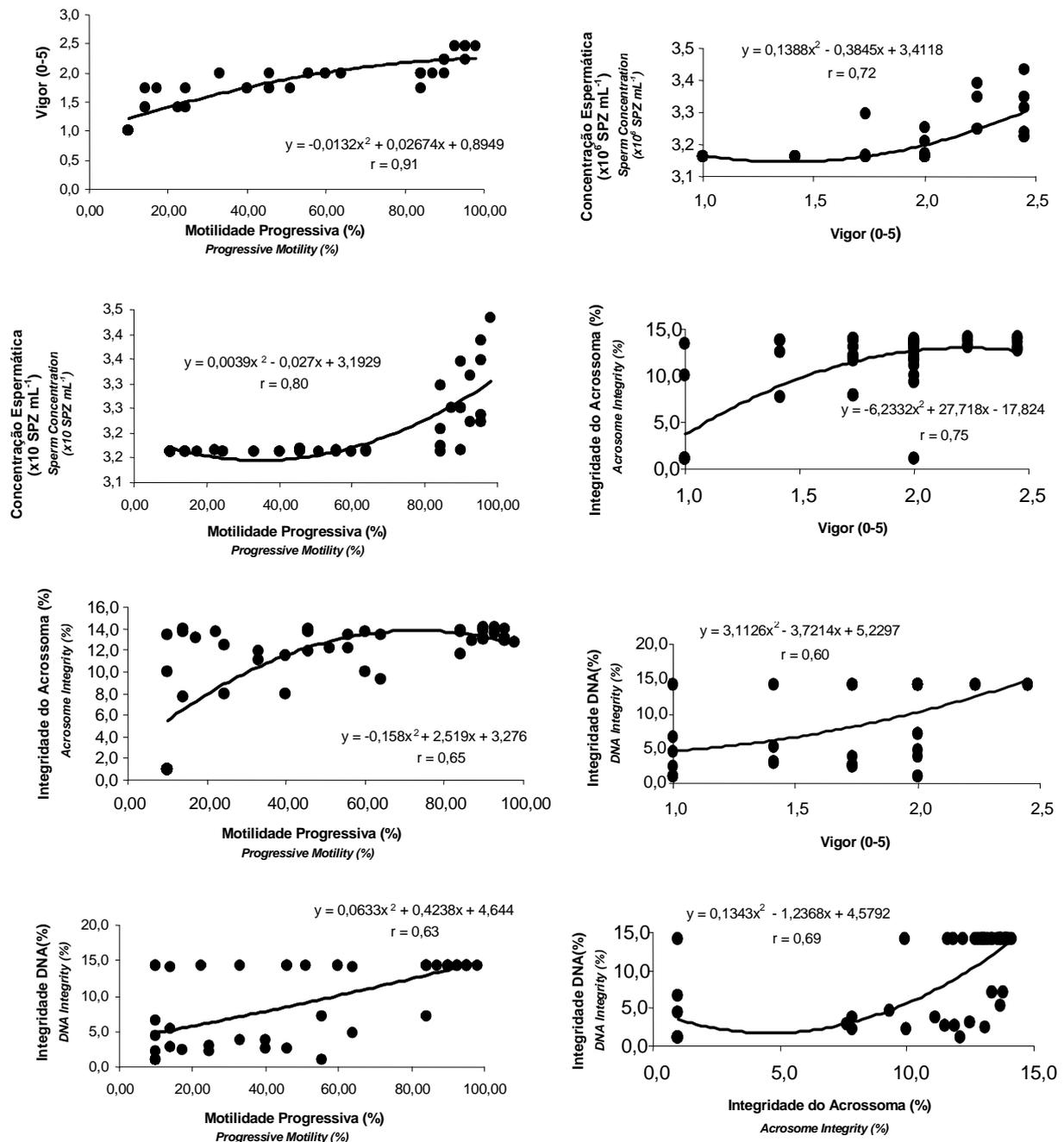


Figura 2. Correlação entre pares de variáveis do sêmen, antes e durante o período de insulação escrotal (IE) e no período pós-IE (PIE), de caprinos submetidos à IE e suplementados com Selênio e Vitamina E na dieta ($p < 0,0001$).

Figure 2. Correlation between pairs of semen variables, before and during the SI period (SI) and on post-SI period (PSI), on goats submitted to SI and supplemented with Selenium and Vitamin E on diet ($p < 0,0001$).

O estudo da morfologia espermática evidenciou que as amostras de sêmen apresentaram 83,41 e 83,58% de células normais antes do período de insulação escrotal (0d), para os animais do grupo-controle (G1) e tratados com Selênio e Vitamina E (G2), respectivamente. Foram observados pequenos percentuais de espermatozoides com cabeça estreita (4,42 e 5,8%), cabeça destacada (0,75 e 1,08%), gota citoplasmática proximal (0,66 e 0,58%), gota citoplasmática distal (4,83 e 1,50%), cauda dobrada (0,33 e 0,66%) e cauda enrolada (1,08 e 1,25%), respectivamente, para os animais do grupo-controle e tratados com Selênio e Vitamina E. Após o término da insulação (d18), constatou-se oligozoospermia severa ou azoospermia em quatro animais do grupo-controle e quatro do grupo tratado com Selênio e Vitamina E. Nos animais em que foi possível avaliar a morfologia espermática, observaram-se 26,5% de células normais nos animais-controle e 65,0% naqueles tratados com Selênio e Vitamina E. As patologias mais observadas foram cabeças destacadas (63,5 e 13,5%) e caudas enroladas (7,00 e 11,50%), respectivamente para G1 e G2. Ao término do período pós-insulação escrotal (PIE), a maioria dos animais ainda apresentava oligozoospermia, mas um animal de cada grupo (Controle e Tratado) apresentou células morfologicamente normais (81,5 e 78,00%, respectivamente).

O processo de degeneração testicular compromete a fertilidade dos reprodutores como consequência de alterações na espermatogênese, determinando aumento da produção de espermatozoides anormais (Nascimento e Santos, 1997) e redução da concentração espermática (oligozoospermia ou azoospermia), afetando a qualidade do sêmen (Fraser e Wilson, 1966). Fato comprovado ao se avaliar o percentual de células espermáticas morfologicamente normais neste experimento, em que se observou que a injúria térmica afetou os animais de ambos os grupos, independentemente da suplementação com Selênio e Vitamina E, assim como determinou a ocorrência de animais de ambos os grupos com azoospermia ou oligozoospermia severa.

Nos últimos dez anos, a função antioxidante da Vitamina E tem sido amplamente investigada (Azzi *et al.*, 2000). Neste experimento, esperava-se que a associação de Selênio e Vitamina E na dieta de caprinos reduzisse os danos testiculares e, conseqüentemente, a má qualidade do sêmen decorrente da insulação induzida, uma vez que, em ratos, a administração de Vitamina E inibiu significativamente o efeito negativo do aquecimento dos testículos causado pelo criptorquidismo (Cui

et al., 2006). Uma vez que a Vitamina E atua como antioxidante lipossolúvel na membrana celular e o Selênio age como componente da enzima Glutathione peroxidase que atua reduzindo os peróxidos formados, neste experimento poderia ter sido observado efeito positivo da adição destes antioxidantes. Todavia, o percentual de gametas com integridade de acrossoma, que reflete a estabilidade das membranas celulares, ou com elevado percentual de células móveis, decorrentes da inibição da produção de peróxidos, não diferiu entre os animais de ambos os grupos (Controle e Selênio e Vitamina E).

Os requerimentos de Selênio nos caprinos variam entre 0,05 a 0,3 mg kg⁻¹ MS⁻¹ (NRC, 1981), dependendo da sua concentração prévia no organismo animal e da presença, na dieta, de fatores que interferem ou favorecem a sua atuação, tais como Vitamina E, enxofre, lipídios, proteínas, aminoácidos e outros nutrientes (McDowell, 1999). Neste experimento, os animais foram suplementados com 0,1 mg kg⁻¹ PV⁻¹ de Selênio e 0,3 mg kg⁻¹ PV⁻¹ de Vitamina E, supondo ser suficiente para minimizar os efeitos deletérios do aumento da temperatura escrotal. Segundo Schwenke e Behr (1998), a combinação da Vitamina E, um antioxidante lipofílico, com a Vitamina C ou Selênio é capaz de atenuar as ações deletérias dos peróxidos. Assim, existe a possibilidade de que, neste experimento, em condições de estresse térmico determinado pela IE, o organismo animal tenha produzido outro tipo de oxidante, que não seja o H₂O₂, uma vez que não se dosou a concentração deste peróxido. Por conseguinte, é indicado estudar o perfil de indicadores de peróxidos do sêmen em futuros trabalhos a fim de compreender melhor os resultados obtidos após a adição de substâncias antioxidantes, assim como estudar o efeito do uso de antioxidantes por um período de tempo maior, após o término da IE.

Nos animais deste experimento, é possível que o efeito deletério da elevada temperatura esteja relacionado à produção de HSPs, uma vez que, em situações de aumento de temperatura testicular, a proteína do choque térmico HSP 105, específica das células germinativas (Itoh e Tashima, 1990; 1991), bem como as HSP 27 e HSP 90, encontradas nas células de Sertoli, em espermatogônias, em espermatócitos e em espermátides, podem ser responsáveis por alterações das características quantitativas do sêmen, em virtude de que em células isoladas dos testículos de ratos submetidos à temperatura de 37 a 42°C, Biggiogera *et al.* (1996) observaram concentrações elevadas destas últimas

proteínas (HSP 27 e 90). Todavia, dosagens de HSP não foram realizadas neste experimento, devendo ser estudadas com maiores detalhes em futuros trabalhos. Por conseguinte, com base nos resultados obtidos, ainda não é possível indicar o uso destes antioxidantes na dieta de animais de alto valor zootécnico importados de clima temperado para sistemas de criação do Nordeste do Brasil, para adaptação mais rápida às condições edafoclimáticas desta região.

Conclusão

A temperatura elevada nos testículos de reprodutores caprinos submetidos à insulação escrotal altera os parâmetros seminais, além de que a suplementação na dieta de caprinos com Selênio e Vitamina E, nas concentrações de 0,1 e 0,3 mg kg⁻¹ PV⁻¹, respectivamente, não é suficiente para minimizar os efeitos deletérios da insulação escrotal induzida.

Referências

- AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.*, Melbourne, v. 6, p. 19-23, 1994.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.*, Melbourne, v. 16, p. 581-588, 2004.
- AZIZ, N. et al. Novel association between sperm reactive species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v. 81, p. 349-354, 2004.
- AZZI, A. et al. Specific cellular responses to alpha-tocopherol. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 130, p. 1649-1652, 2000.
- BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 1, n. 4, p. 1-11, 1993.
- BILLING, H. et al. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stage. *Endocrinology*, Baltimore, v. 136, p. 5-12, 1995.
- BIGGIOGERA, M. et al. Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. *Exp. Cell Res.*, New York, v. 229, p. 77-85, 1996.
- CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2. ed. Minas Gerais: CBRA, 1998.
- CUI, Z.G. et al. Enhancement of apoptosis by nitric oxide release from phenyl-tert-butyl nitrene under hyperthermic conditions. *J. Cell. Physiol.*, Philadelphia, v. 205, p. 458-476, 2006.
- EVENSON, D.P. et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.*, Oxford, v. 14, p. 1039-1049, 1999.
- FLORENTINO, C.M. et al. Efeito do tempo de insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de caprinos (*Capra hircus* L.) sem raça definida. *Rev. Cienc. Vet. Trop.*, Recife, v. 6, n. 1, p. 39-45, 2003.
- FONSECA, V.O.; CHOW, L.A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 47, n. 5, p. 707-716, 1995.
- FRASER, A.F.; WILSON, J.C. Testicular calcinosis in domestic ruminants. *Nature*, London, v. 210, n. 5035, p. 547, 1966.
- HULET, C.V.; SHELTON, M. *Ovinos e caprinos*. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.). *Reprodução animal*. 4. ed. São Paulo: Manole, 1982.
- ITOH, H.; TASHIMA, Y. A novel testis-specific 105-kDa protein related to the 90-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v. 193, p. 429-435, 1990.
- ITOH, H.; TASHIMA, Y. Different expression time of the 105-kDa protein and 90-kDa heat-shock protein in rat testis. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v. 289, p. 110-112, 1991.
- JENNINGS, J.J. Effect of season and mating frequency on semen characteristics in rams. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1., Krakow, 1976. *Anais...* Krakow: The Polish Society for Animal Reproduction, 1976. p. 998-1001.
- LÄNGERLOF, N. Infertility in male domestic animals. *Vet. Med.*, Chicago, v. 33, p. 550-561, 1983.
- LOPES, S. et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, Oxford, v. 13, p. 896-900, 1998.
- MCDOWELL, L.R. *Vitamins in animal nutrition*. New York: Academic Press, 1999.
- MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais*. 6. ed. São Paulo: Ed. Sulina, 1987. v. 2.
- MIEUSSET, R.; BUJAN, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int. J. Androl.*, Turku, v. 8, p. 169-184, 1995.
- MOREIRA, P.E. et al. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1704-1711, 2001.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- NRC-National Research Council. *Nutrient requirement of goats*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1981.
- PASQUALOTTO, F.F. et al. Relation between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v. 73, p. 459-464, 2000.
- PELTOLA, V. et al. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. *Biol. Reprod.*, Champaign, v. 53, p. 1146-1150, 1995.
- PUGH, D.G. *Clínica de ovinos e caprinos*. São Paulo: Roca, 2005.
- ROTH, T.L. et al. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the

- Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biol. Reprod.*, Champaign, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998.
- SANTOS, D.O. *et al.* Características escroto testiculares e do ejaculado em bodes mestiços submetidos à insulação escrotal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 287-291, 1998.
- SAS-Statistical Analysis System Institute, General Linear Model: 8.2, Cary. North Caroline: SAS Institute, 2000.
- SCHWENKE, D.C.; BEHR, S.R. Vitamin E combined with selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 83, p. 366-377, 1998.
- SETCHELL, B.P. The parkes lecture heat and the testis. *J. Reprod. Fertil.*, Cambridge, v. 114, p. 179-194, 1998.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.*, Lawrence, v. 25, p. 5-18, 2004.
- SILVA, P.F.N. *Physiology of peroxidation process in mammalian sperm*. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)–Utrecht University, Utrecht. 2006.
- SUN, J.G. *et al.* Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.*, Champaign, v. 56, p. 6002-607, 1997.
- TAPANAINEM, J.S. *et al.* Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol. Endocrinol.*, Bethesda, v. 77, p. 643-650, 1993.
- WAITES, G.W.H.; SETCHELL, B.P. Physiology of the mammalian testis. *In: LAMMING, G.E. (Ed.). Marshall's physiology of reproduction*. 4. ed. London: Churchill Livingstone, v. 2, p. 1-105, 1990.
- WILDEUS, S.; ENTWISTLE, K.W. Spermogram and sperm reserves in hybrid *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls after scrotal insulation. *J. Reprod. Fertil.*, Cambridge, v. 69, p. 711-716, 1983.

Received on June 18, 2007.

Accepted on March 19, 2008.