LUCIANA KEIKO HATAMOTO

**Efeito do estresse e da suplementação oral com vitamina E
sobre parâmetros seminais, peroxidação lipídica de
componentes seminais e a atividade das enzimas
antioxidantes presentes no plasma seminal de cães**

São Paulo

2004

LUCIANA KEIKO HATAMOTO

**Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E
sobre parâmetros seminais, peroxidação lipídica de
componentes seminais e atividade das enzimas
antioxidantes presentes no plasma seminal de cães**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe

São Paulo

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1391
FMVZ

Hatamoto, Luciana Keiko

Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre parâmetros espermáticos, peroxidação lipídica de componentes seminais e atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães / Luciana Keiko Hatamoto. – São Paulo : L. K. Hatamoto, 2004.
180 f.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe.

1. Cães. 2. Sêmen animal. 3. Vitamina E. 4. Estresse.
5. Antioxidantes. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: HATAMOTO, Luciana Keiko

Título: Efeito do estresse e da suplementação oral com vitamina E sobre parâmetros
seminais, peroxidação lipídica de componentes seminais e a atividade das
enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães

Tese apresentada ao programa de Pós-
graduação em Reprodução Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, **Mário e Miriam**,
que sempre me apoiaram e
ajudaram a realizar aos meus
sonhos*

*Aos meus irmãos, **Vanessa**,
Marcelo, Mário e Gustavo, por
me ajudarem a ser o que sou*

*Ao meu sobrinho, **Felipe**, que me
mostrou que na vida sempre nem
sempre as coisas boas acontecem
quando a gente quer..*

Aos meus amigos,

*“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o
desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças
que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e
que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a
felicidade.”*

(Carlos Drummond de Andrade)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Por isso, manifesto a minha gratidão a todas essas pessoas, e em especial:

Agradeço a **Deus** pela proteção e por me guiar durante toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. **Renato Capanarut Barnabé** pela orientação, apoio e amizade extrema.

À Prof. Dra. **Carmen Neuza Martins Cortada** agradeço não só a orientação, mas também pela amizade e confiança.

À Prof. Dra. **Valquíria Hyppólito Barnabé** pela amizade e por ter me acolhido como uma de suas orientadas.

Ao **Departamento de Reprodução Animal** por ter me recebido e se tornado a minha segunda casa.

Ao **curso de pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal** em nome do seu coordenador, Prof. Cláudio Alvarenga de Oliveira, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. **Francisco Stefano Weschler**, meu orientador de mestrado, por ter me ajudado a dar os primeiros passos na pesquisa científica e pela ajuda no delineamento deste experimento.

À minha tia **Marcia** por ter me escutado nos piores momentos.

Ao **Comando do 2º Batalhão de Polícia do Exército** por ter permitido a utilização dos cães, das instalações e do efetivo para a realização deste experimento.

À **Seção de Cães-de-Guerra do 2º BPE** pela acolhida sincera e manutenção dos animais.

Ao 3º sargento **Mário**, aos cabos **Silvano** e **Baptista** e aos soldados **Brasil**, **Leone**, **Alessandro**, **Pinheiro**, **Luís**, **Binoti**, **Dias**, **Cristiano**, **Cunha**, **Rebouças**, **Michel**, **Dantas**, **Botelho**, **Florival**, **Wagner** e **Rodrigo**, obrigado por ajudarem no manejo dos cães e nas coletas.

Aos soldados enfermeiros **Brasil**, **Luís** e **Florival** pela ajuda constante durante as coletas.

Aos cães **Argos**, **Buck 22** (*in memoriam*), **Zeus** (*in memoriam*), **Dick** (*in memoriam*), **Conan**, **Logan**, **Harro**, **Icaro** (*in memoriam*), **Amadeus** (*in memoriam*), **Cronos**, **Fanton**, **Apolo**, **Athos A. M.**, **Quimo**, **Athos** (*in memoriam*), **Max** (*in memoriam*), **Jimmy**, **Fire**, **Brutos** (*in memoriam*), **Buck** (*in memoriam*), **Othan**. Os meus mais sinceros agradecimentos, sem a ajuda de vocês seria impossível a realização deste trabalho.

À **Érica** e ao **LDH**, na pessoa do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, obrigado pelo auxílio nas dosagens hormonais.

Ao grande amigo **Sobrinho** pela sua amizade indispensável e por me ajudar em todas as fases deste trabalho.

Ao grande amigo **Marcílio** pela amizade extrema e pela ajuda sempre quando precisei.

À equipe formada para me ajudar na fase final deste doutorado **Karina, Marcílio, Sobrinho, Paola, Paulo, Thiesa (e João Pedro), Roger, Paulo, Marina, Marcelo**. Sem o trabalho e a ajuda de vocês eu não conseguiria terminar o meu trabalho, uma parte dele também pertence a vocês.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães** pela amizade sincera e pelas longas conversas.

À **Paola** e **Karina** por terem se tornado grandes amigas neste doutorado.

Aos meus amigos da Andrologia, **Marcílio, Sobrinho, Paola, Karina, Thiesa, Roger, Paulo, Marina, Marcelo**, meu muitíssimo obrigado, de coração, pelas risadas e pelo companheirismo.

Aos amigos da pós, **Andréa, Ana Paula, Regina, Edu, Cabral, Nélcio, Marcio, Everton, Viviane, Berimbau (Cláudia), Marvin, Roberta, Snarf, Shoyo, Vinícius**, obrigado por compartilharem uma parte da vida de vocês comigo.

Às secretárias **Taís, Daura e Alice** que sempre me ajudaram.

Às secretárias da Pós **Harumi** e **Eunice** que sempre me socorreram quando precisei.

Ao funcionário **Miguel** pela amizade e ajuda.

Aos funcionários **Jocimar**, **Belau** e **Ira** por ajudarem sempre.

À dona **Sílvia** pelo seu bom humor e amizade sincera.

Às secretárias da pós **Sandra** e **Cláudia** sempre tão atenciosas e bem humoradas.

À **Margarete** da biblioteca pela ajuda com a formatação da tese.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo auxílio concedido através da bolsa de Doutorado, processo nº00/02981-9.

À **Socil Guyomarc'h** pelo patrocínio de ração.

E a todos que colaboram de alguma forma para a realização deste trabalho e que devido a um grande lapso da minha parte não foram citados meus mais sinceros agradecimentos.

*Não é o que você faz
É a maneira como você faz
É isso que gera resultados*

Sy Oliver e James Young

RESUMO

HATAMOTO, L. K. **Efeito do estresse e da suplementação oral com vitamina E sobre parâmetros seminais, peroxidação lipídica de componentes seminais e a atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães.** [Effect of stress and oral supplementation with vitamin E on seminal parameters, lipidic oxidation of seminal components and antioxidants enzymes activities in the seminal plasma in dogs]. 2004. 180 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O presente trabalho visou avaliar se, em cães, o estresse provoca efeitos deletérios sobre os parâmetros seminais e a composição do plasma seminal. Além disso, avaliou-se os efeitos da suplementação oral com vitamina E em animais estressados. Utilizaram-se 18 cães machos da raça rottweiler, com idade média de 4 anos. O tratamento foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 2x2 (com e sem estresse X com e sem vitamina E). Os animais dos grupos suplementados com vitamina E receberam 500 mg de α -tocoferol/animal/dia. O estresse foi induzido, sete dias após o início da suplementação com vitamina E através da aplicação intramuscular de 0,01mg/kg de dexametasona, durante 7 dias consecutivos. O estresse foi caracterizado através do cortisol sérico, consumo alimentar, escore corporal e peso vivo. Foram feitas duas colheitas semanais de sêmen através de manipulação digital e uma coleta semanal de sangue. Os parâmetros utilizados para avaliar os efeitos do tratamento foram: volume, densidade e pH do ejaculado, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermáticas, integridade da membrana espermática (teste de expansão hipo-osmótico, coloração fluorescente IP/DCF, coloração tripla, coloração acrossomal simples e viabilidade espermática), proteínas totais, grau de peroxidação lipídica (concentração de TBARS),

concentração de catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase no plasma seminal e nível de testosterona plasmática. Observou-se um efeito do estresse sobre o volume do ejaculado, pH do ejaculado, TBARS e porcentagem de células mortas com acrossoma reagido (classe 4 da coloração simples). A vitamina E atuou sobre a porcentagem de defeitos maiores, TBARS, a porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra e sobre a viabilidade espermática. O efeito conjunto da vitamina E e do estresse foi observado sobre a motilidade, vigor e concentração espermáticos, a porcentagem de defeitos maiores, porcentagem de células íntegras pelo teste hipo-osmótico e através de sondas fluorescentes IP/DFC. Com base nos resultados obtidos neste experimento concluiu-se que o estresse influencia de maneira negativa a célula espermática e a composição do plasma e a suplementação oral com vitamina E modifica estes efeitos.

Palavras chave: Cães. Sêmen animal. Vitamina E. Estresse. Antioxidantes.

ABSTRACT

HATAMOTO, L. K. **Effect of stress and oral supplementation with vitamin E on seminal parameters, lipidic oxidation of seminal components and antioxidants enzymes activities in the seminal plasma in dogs.** [Efeito do estresse e da suplementação oral com vitamina E sobre parâmetros seminais, peroxidação lipídica de componentes seminais e a atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal em cães.]. 2004. 180 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The present study aimed to evaluate if the stress in dogs may have deleterious effects on the sperm quality and on the composition of the seminal plasma. IN addition, the effect of supplementation with vitamin E on stressed dogs was also evaluated. Eighteen male adult rotweiller dogs were randomly allocated in a 2X2 factorial treatment design (stress and no stress X vitamin E supplementation and no supplementation). Animals of the supplemented group received 500 mg of α -tocopherol/animal/day. The stress was induced 7 days after the beginning of the vitamin supplementation using dexamethasone (0.01 mg/kg intramuscular for 7 consecutive days). Stress was characterized through the measurement of plasmatic cortisol, food intake, body score and weight. Semen collections were performed twice a week through digital manipulation and blood collections were performed weekly. Semen parameters used to evaluate the effect of the treatments were: ejaculate volume, density and pH, sperm motility, vigor, concentration and morphology, sperm membrane integrity (hypo-osmotic swelling test - HOST, fluorescent probe IP/DCF, triple stain, simple acrosome stain and sperm viability), total protein concentration, lipid peroxidation rate (TBARS), enzymatic activity of the antioxidants catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase in the seminal

plasma and plasmatic testosterone concentration. The stress influenced the ejaculate volume and pH, TBARS and percentage of dead cells with reacted acrosome (class 4 of the simple stain). Vitamin E had no effect on the percentage of sperm major defects, TBARS, percentage of cells with intact acrosome and sperm viability. The effect of vitamin E and stress was observed on sperm motility, vigor and concentration, percentage of major sperm defects, percentage of intact membrane cells evaluated through the HOST and through the fluorescent probe IP/DFC. Results obtained indicated that the stress has a deleterious effect on the spermatogenic cell and that the composition of the seminal plasma and the oral vitamin E supplementation may modify these effects.

Key words: Dogs. Animal semen. Vitamin E. Stress. Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Esquema dos possíveis níveis de peroxidação lipídica (LPO) (Adaptado de GIROTTI, 1998).....	38
Figura 2	- Esquema dos mecanismos de interação entre o nível de estresse oxidativo e antioxidantes afetando a função espermática e a fertilidade (Adaptado de SIKKA, 1996; TSIGOS; CHROUROS, 2002).....	41
Figura 3	- Esquema de algumas importantes rotas para a formação de lipídios oxidados (LOOH) e a recuperação dos mesmos. (Adaptado de GIROTTI, 1998).....	42
Figura 4	- Estrutura química do tocoferol e do tocotrienol (Adaptado de AZZI; STOCKER, 2000).....	45
Figura 5	- Reações em cadeia do α -tocoferol (adaptado de WANG; QUINN, 1999).....	46
Figura 6	- Protocolo experimental utilizado para avaliar e comparar os efeitos do estresse e da suplementação com vitamina E sobre o sêmen de cães da raça rotweiler.....	55
Figura 7	- Esquema da composição do período experimental.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Classificação das variáveis resposta e as transformações utilizadas.....	85
Quadro 2	- Sensibilidade (%) e dose mínima detectável (ng/dL) do conjunto diagnóstico e coeficiente de variação (CV, %) intra e inter ensaio da quantificação de cortisol plasmático de cães da raça rotweiller submetidos ao estresse e a suplementação com vitamina E.....	88
Quadro 3	- Sensibilidade (%) e dose mínima detectada pelo conjunto diagnóstico e coeficiente de variação (CV) intra e inter ensaio da quantificação de testosterona plasmática de cães da raça rotweiller submetidos ao estresse e a suplementação com vitamina E.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Efeito do protocolo de indução de estresse (antes e depois da aplicação de DXO) sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do nível plasmático de cortisol (ng/dL, CORT) de cães da raça rotweiller dos grupos com (tratamento) e sem estresse (controle).....	89
Tabela 2	- Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do nível plasmático de cortisol (ng/dL) de cães da raça rotweiller durante as semanas.....	92
Tabela 3	- Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do nível plasmático de cortisol (ng/dL) de cães da raça rotweiller durante as semanas.....	93
Tabela 4	- Efeito da semana sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do nível plasmático de testosterona (ng/dL) de cães da raça rotweiller durante o primeiro período experimental.....	97
Tabela 5	- Média $\pm$ erro padrão da média do nível plasmático de testosterona (ng/dL) de cães da raça rotweiller segundo o tratamento.....	98
Tabela 6	- Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do escore corporal (EC, 1-5) de cães da raça rotweiller durante o segundo período experimental.....	102
Tabela 7	- Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do escore corporal (EC, 1-5) de cães da raça rotweiller durante o segundo período experimental.....	102
Tabela 8	- Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da consistência do testículo direito (ESCTD, 1-5) de cães da raça rotweiller durante o primeiro e segundo períodos experimentais.....	104
Tabela 9	- Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da consistência do testículo direito (ESCTD, 1-5) de cães da raça rotweiller durante o primeiro e segundo períodos experimentais.....	104
Tabela 10	- Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da consistência do testículo esquerdo (ESCTE, 1-5) de cães da raça rotweiller durante o primeiro e segundo períodos experimentais.....	105

Tabela 11	-	Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do volume da segunda fração do ejaculado (VOL, mL) de cães da raça rotweiler durante o primeiro e segundo período experimental.....	107
Tabela 12	-	Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da motilidade espermática (MOT, %) e do vigor espermático (VIG, 1-5) do sêmen fresco de cães da raça rotweiler durante o primeiro e o segundo períodos experimentais.....	109
Tabela 13	-	Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da motilidade espermática (MOT, %) e do vigor espermático (VIG, 1-5) do sêmen fresco de cães da raça rotweiler durante o primeiro e o segundo períodos experimentais.....	111
Tabela 14	-	Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da concentração do ejaculado (CONC, $\times 10^6$ espermatozoides/mL) de cães da raça rotweiler durante o primeiro e o segundo períodos experimentais.....	114
Tabela 15	-	Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da concentração do ejaculado (CONC, $\times 10^6$ espermatozoides/mL) de cães da raça rotweiler durante o primeiro e o segundo períodos experimentais.....	115
Tabela 16	-	Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem de defeitos maiores (DEFMA, %) de cães da raça rotweiler durante o experimental.....	116
Tabela 17	-	Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem de defeitos maiores (DEFMA, %) de cães da raça rotweiler durante o período experimental.....	116
Tabela 18	-	Efeito do estresse (stress) e da suplementação com vitamina E (VitE) sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem de defeitos maiores (DEFMA), defeitos menores (DEFME) e defeitos totais (DEFTOT) de cães da raça rotweiler durante o período experimental.....	117
Tabela 19	-	Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem (%) de espermatozoides com membrana íntegra pelo HOST (HIPO) de cães da raça rotweiler durante o período experimental.....	119
Tabela 20	-	Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem (%) de espermatozoides com membrana íntegra pelo HOST (HIPO) de cães da raça rotweiler durante o período experimental.....	120

Tabela 21	- Média $\pm$ erro padrão da média da concentração de proteínas totais no plasma seminal (ng/mL) de cães da raça rotweiller segundo o tratamento.....	121
Tabela 22	- Efeito do estresse (stress) e da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) da concentração de TBARS do plasma seminal (TBARS, ng/mL) de cães da raça rotweiller durante o período experimental.....	122
Tabela 23	- Média $\pm$ erro padrão da média da concentração de superóxido dismutase no plasma seminal (ng/mL) de cães da raça rotweiller segundo o tratamento.....	125
Tabela 24	- Média $\pm$ erro padrão da média da concentração de glutathione peroxidase no plasma seminal (ng/mL) de cães da raça rotweiller segundo o tratamento.....	126
Tabela 25	- Efeito do tratamento sobre a média $\pm$ erro padrão da motilidade do sêmen fresco (MOT), do sêmen pós-descongelamento (MOT 0), do sêmen pré-capacitação (MOT 1) e pós-capacitação (MOT 2) de cães da raça rotweiller.....	129
Tabela 26	- Efeito do tratamento sobre a média $\pm$ erro padrão do vigor espermático (1-5) do sêmen fresco (VIG), do sêmen pós-descongelamento (VIG 0), do sêmen pré-capacitação (VIG 1) e pós-capacitação (VIG 2) de cães da raça rotweiller.....	130
Tabela 27	- Efeito do tratamento sobre a média $\pm$ erro padrão da porcentagem (%) de células íntegras pelo HOST do sêmen fresco (HIPO) e do sêmen pós-descongelamento (HIPOC) de cães da raça rotweiller.....	132
Tabela 28	- Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) porcentagem de células com membrana íntegra através da coloração com sondas fluorescentes pré (FLUO 1) e pós-capacitação (FLUO 2) de sêmen congelado de cães da raça rotweiller.....	133
Tabela 29	- Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) porcentagem de células com membrana íntegra através da coloração com sondas fluorescentes pré (FLUO 1) e pós-capacitação (FLUO 2) de sêmen congelado de cães da raça rotweiller.....	134
Tabela 30	- Efeito da capacitação espermática sobre a média $\pm$ erro padrão da porcentagem de células íntegras segundo a coloração com sondas fluorescentes IP/DCF de cães da raça rotweiller antes (FLUO 1) e após (FLUO 2) a capacitação espermática segundo o tratamento.....	134
Tabela 31	- Efeito da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) porcentagem de células espermáticas com membrana acrossomal íntegra pela coloração acrossomal simples de sêmen congelado pré (POPE 1) e pós-capacitação (POPE 2). de cães da raça rotweiller.....	135

Tabela 32	-	Efeito da capacitação espermática sobre a média $\pm$ erro padrão da porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra (POPE) de sêmen congelado de cães da raça rotweiler segundo o tratamento.....	136
Tabela 33	-	Efeito da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da viabilidade (porcentagem de células vivas) espermática pré (EOSI 1) e pós (EOSI 2) capacitação espermática do sêmen congelado de cães da raça rotweiler.....	137
Tabela 34	-	Efeito da capacitação espermática sobre a média $\pm$ erro padrão da viabilidade espermática (EOS) de cães da raça rotweiler segundo o tratamento.....	138
Tabela 35	-	Efeito do estresse (stress) sobre a média e o erro padrão ($M \pm EP$) da porcentagem de células pertencentes às classes obtidas através da coloração tripla de espermatozóides congelados pré e pós capacitação espermática.....	140
Tabela 36	-	Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) sobre a média e o erro padrão ($M \pm EP$) da porcentagem de células pertencentes às classes obtidas através da coloração tripla de espermatozóides congelados pré e pós capacitação espermática.....	141
Tabela 37	-	Efeito da capacitação espermática sobre a média $\pm$ erro padrão da porcentagem de espermatozóides classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4 através da coloração tripla do sêmen congelado de cães da raça rotweiler.....	142

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS.....	25
2	HIPÓTESE.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	30
4.1	Testosterona plasmática.....	31
4.2	O estresse.....	32
4.2.1	<i>Dexametasona.....</i>	34
4.2.2	<i>Efeitos do estresse sobre a reprodução.....</i>	35
4.3	Estresse oxidativo.....	36
4.3.1	<i>Estresse oxidativo e infertilidade masculina.....</i>	38
4.4	Anti-oxidantes.....	41
4.4.1	<i>Vitamina E.....</i>	44
4.4.1.1	<i>Vitamina E e fertilidade masculina.....</i>	47
4.4.2	<i>Catalase (E.C. 1.11.1.6).....</i>	50
4.4.3	<i>Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1).....</i>	51
4.4.4	<i>Glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.19).....</i>	52
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5.1	Animais e local do experimento.....	56
5.2	Grupos experimentais.....	57
5.3	Indução do estresse.....	57
5.3.1	<i>Caracterização do quadro de estresse.....</i>	58

5.4	Suplementação de vitamina E.....	58
5.5	Colheita de sangue e dosagem dos níveis séricos de cortisol e testosterona plasmáticos.....	58
5.6	Escore corporal.....	60
5.7	Consistência testicular.....	60
5.8	Colheita de sêmen.....	61
5.9	Avaliação do ejaculado.....	61
5.9.1	<i>Análises macroscópicas.....</i>	61
5.9.2	<i>Análises microscópicas.....</i>	62
5.9.2.1	Motilidade espermática.....	62
5.9.2.2	Vigor espermático.....	63
5.9.2.3	Concentração espermática.....	64
5.9.2.4	Morfologia espermática.....	64
5.9.2.5	pH do ejaculado.....	65
5.9.2.6	Densidade do ejaculado.....	65
5.10	Obtenção do plasma seminal.....	66
5.11	Congelamento do sêmen.....	66
5.12	Descongelamento e lavagem das amostras de sêmen congelado.....	67
5.13	Testes que avaliam a integridade da membrana espermática.....	68
5.13.1	<i>Capacitação espermática.....</i>	68
5.13.2	<i>Teste de expansão hipo-osmótico (HOST).....</i>	69
5.13.3	<i>Coloração com sondas fluorescentes.....</i>	71

5.13.4	<i>Coloração tripla (Triple stain).....</i>	72
5.13.5	<i>Viabilidade espermática (coloração eosina/nigrosina).....</i>	74
5.13.6	<i>Coloração acrossomal simples.....</i>	74
5.14	Avaliação do estresse oxidativo – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	76
5.15	Enzimas anti-oxidantes.....	77
5.15.1	<i>Catalase (E.C. 1.11.1.6).....</i>	77
5.15.2	<i>Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1).....</i>	78
5.15.3	<i>Glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9).....</i>	79
5.16	Proteína total do plasma seminal.....	80
5.17	Delineamento experimental.....	80
5.17.1	<i>Períodos experimentais.....</i>	81
5.18	Análise estatística.....	82
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
6.1	Avaliações hormonais.....	87
6.1.1	<i>Cortisol plasmático.....</i>	88
6.1.2	<i>Testosterona plasmática.....</i>	95
6.2	Avaliação física dos animais.....	99
6.2.1	<i>Peso.....</i>	100
6.2.2	<i>Consumo alimentar.....</i>	100
6.2.3	<i>Escore corporal.....</i>	101
6.2.4	<i>Consistência testicular.....</i>	103
6.3	Avaliação do ejaculado.....	106
6.3.1	<i>Volume do ejaculado.....</i>	106

6.3.2	<i>Motilidade e vigor espermáticos.....</i>	108
6.3.3	<i>Densidade e pH do ejaculado.....</i>	112
6.3.4	<i>Concentração espermática.....</i>	114
6.3.5	<i>Alterações morfológicas.....</i>	116
6.3.6	<i>Teste de expansão hipo-osmótico (HOST).....</i>	119
6.3.7	<i>Proteína total do plasma seminal.....</i>	121
6.3.8	<i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</i>	122
6.3.9	<i>Catalase (E.C. 1.11.1.6).....</i>	124
6.3.10	<i>Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1).....</i>	125
6.3.11	<i>Glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9).....</i>	126
6.4	Avaliação do sêmen congelado.....	127
6.4.1	<i>Motilidade e vigor espermáticos.....</i>	128
6.4.2	<i>Teste de expansão hipo-osmótico (HOST).....</i>	131
6.4.3	<i>Coloração com sondas fluorescentes.....</i>	133
6.4.4	<i>Coloração acrossomal simples.....</i>	135
6.4.5	<i>Viabilidade espermática.....</i>	137
6.4.6	<i>Coloração tripla (Triple stain).....</i>	139
6.5	Correlações.....	143
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	150
8	CONCLUSÕES.....	154
	REFERÊNCIAS.....	155
	ANEXOS.....	168

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

As técnicas de reprodução assistida têm evoluído de modo a melhorar o desempenho reprodutivo. Dentre elas, destacam-se as novas tecnologias relacionadas ao diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina.

Na cinotecnia, há uma grande demanda por pesquisas sobre a fisiologia reprodutiva dos machos, com o intuito de aumentar a vida útil de animais que tenham a capacidade de imprimir características desejáveis em sua descendência.

Embora diferenças reprodutivas tenham sido demonstradas entre as espécies de uma mesma família, tecnologias que aumentem o sucesso da reprodução assistida no cão doméstico poderão ser utilizadas para canídeos selvagens em vias de extinção (WILDT et al., 1995). Além do que, em um curto espaço de tempo, outras espécies que poderão estar sob ameaça de desaparecimento, poderiam ser beneficiadas por estas técnicas de reprodução assistida e pelos bancos genômicos (IUCN, 2000).

Os cães domésticos são importantes para o ser humano, por serem não só animais de companhia, mas também por servirem como guia para cegos, auxílio psicológico no tratamento de doenças, por servirem como tração de trenó nas regiões árticas, pastoreio de rebanhos, caça, guarda, policiamento e para a detecção de drogas em aeroportos (CASE; CAREY; HIRAKAWA, 1995).

Para ocorrer o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida é necessário conhecer as particularidades da fisiologia reprodutiva masculina. A espermatogênese é um processo biológico cujo produto final, o espermatozóide, pode sofrer alteração devido a agentes como calor, luz, radiação, nutrição,

hormônios e outros fatores ainda a serem estudados. Devido a isso, há uma necessidade de maior conhecimento dos mecanismos de ação celular e molecular, que estes efeitos adversos exercem sobre os testículos e os espermatozóides (GURAYA, 1987).

Nos centros urbanos a população de cães tem aumentado dia a dia, havendo atualmente um cão para cada dez habitantes (REICHMANN et al., 2003). A proximidade com o ser humano expõe estes animais a situações que interferem na sua fisiologia tornando possível o aparecimento de alterações antes observadas somente nos seres humanos.

A urbanização do cão torna-o suscetível a agentes estressantes como calor, restrição de espaço, barulho e atividade física intensa. O estresse, independente do tipo e do tempo de exposição ao agente, pode alterar a fertilidade. No homem e nas espécies animais como bovinos, ovinos, aves e ratos submetidos ao estresse observam-se diminuição na concentração e motilidade espermática e aumento no número de alterações morfológicas (BARTH, 1993; SUÁREZ et al., 1996; TEN et al., 1997; VÉZINA et al., 1996; VOGLER et al., 1991). Porém em cães, poucos estudos avaliam a interação estresse e reprodução (BAPTISTA SOBRINHO, 2002).

Alterações reprodutivas, decorrentes do estresse, devem-se provavelmente à mudanças nos níveis hormonais (BARTH, 1993; SUÁREZ et al., 1996), ao aumento do estresse oxidativo (HSU et al., 1998; PASQUALOTTO et al., 2000) ou à diminuição da capacidade anti-oxidante do sêmen (LEWIS et al., 1997), sendo bastante provável que estes fatores estejam associados

Os espermatozóides são altamente sensíveis ao estresse oxidativo devido à alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes (DE LAMIRANDE;

GAGNON, 1995; HSU et al., 1998; ONG; SHEN; CHIA, 2002; SHARMA; AGARWAL, 1996). A oxidação espermática é acompanhada por alterações estruturais (principalmente na região acrossômica) e de metabolismo, com diminuição da motilidade e perda de constituintes intracelulares (JONES; MANN, 1977).

Alternativas para reduzir os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo têm sido testadas através da adição de substâncias anti-oxidantes aos meios de congelamento (BECONI et al., 1991; DONOGHUE; DONOGHUE, 1997) ou através da suplementação oral (HSU et al., 1998; LENZI et al., 1993; TEN et al., 1997).

A vitamina E é um anti-oxidante lipossolúvel. Nos últimos anos a suplementação oral de vitamina E tem sido utilizada como uma estratégia na prevenção e no controle do estresse oxidativo em humanos (DONELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999; GEVA et al., 1996; HSU et al., 1998; KESSOPOULO et al., 1995; ROLF et al., 1999), ratos (TEN et al., 1997), aves (SURAI et al., 1997, 1998) e coelhos (CASTELLINI et al., 2002), porém os resultados obtidos são conflitantes.

2 HIPÓTESE

O estresse promove alterações na célula espermática e na composição do sêmen, e a suplementação com vitamina E atenua estes efeitos.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse sobre a fertilidade de machos canídeos e verificar ainda, se estes efeitos poderiam ser modificados através da suplementação oral com vitamina E. Os parâmetros utilizados para a avaliação dos efeitos do estresse, da vitamina E, bem como da interação entre esses dois fatores foram: motilidade, concentração, vigor e alterações de morfologia espermática; testes de integridade das células espermáticas (teste hipo-osmótico, coloração fluorescente, teste de capacitação e reação do acrossoma, viabilidade espermática, integridade da membrana acrossomal); mensuração do grau de peroxidação lipídica do sêmen; determinação da concentração das enzimas anti-oxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) presentes no plasma seminal e, ainda as alterações nas concentrações plasmáticas de testosterona.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Os estudos sobre a infertilidade de cães são escassos, por não ser este um animal de produção. Contudo, nos últimos 20 anos tem-se observado um aumento no número de trabalhos nesta área.

A avaliação dos distúrbios da fertilidade masculina, decorrente ou não de um agente específico como fumo, álcool, estresse e nutrição (WOUNG et al., 2000), deve utilizar critérios de avaliação considerados sensíveis, tais como a análise das concentrações hormonais nos tecidos e no sangue, análise da produção espermática, exame das características seminais e alterações nas taxas de fertilização (JOHNSON et al., 2000; ONG; SHEN; CHIA, 2002). Deve-se lembrar que um teste único é incapaz de avaliar todos os passos envolvidos no processo de fertilização. Somente a combinação de testes, complementares entre si, poderia fornecer uma avaliação mais confiável da função espermática (SIKKA, 1996).

Nos animais de produção (bovinos, ovinos, eqüinos e aves) e em humanos os efeitos do estresse sobre a reprodução masculina têm sido bem estudados, sendo a diminuição da motilidade espermática e o aumento na frequência de alterações morfológicas dos espermatozóides as principais conseqüências observadas (BARTH, 1993; BARTH; BOWMAN, 1994).

Segundo Ong, Shen e Chia (2002) o estudo da fertilidade masculina deve enfocar três pontos: 1) hormônios que interferem na espermatogênese; 2) mecanismos que mantêm e promovem a maturação e manutenção do espermatozóide; 3) qualidade da célula espermática.

4.1 Testosterona plasmática

A testosterona, que se origina nas células de Leydig, é o principal esteróide gonadal no macho sendo essencial para todas as fases da espermatogênese (FELDMAN; NELSON, 1996; KRETZER, 1995). Este hormônio esteróide promove a diferenciação e crescimento celular em tecidos específicos, sendo que sua maior ação está ligada aos órgãos reprodutivos (KRETZER, 1995), promovendo a ativação da espermatogênese, o desenvolvimento de órgãos sexuais acessórios, a expressão de características sexuais secundárias, as alterações comportamentais e o anabolismo celular (FELDMAN; NELSON, 1996; WEINBAUER; WESSELS, 1999).

A manutenção da função reprodutiva masculina é dependente da liberação coordenada de hormônios da cascata do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. A produção de testosterona pelos testículos é dependente da secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), sendo a secreção desses hormônios regulada pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), secretado pelo hipotálamo (SHUPNIK; SHCREIHOFER, 1997). O LH estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig e o FSH controla a espermatogênese via células de Sertoli (WEINBAUER; WESSELS, 1999).

Para que as funções testiculares e epididimárias sejam normais são necessários altos níveis locais de testosterona produzidos pelo próprio testículo (KAWAKAMI; HORI; TSUTSUI, 1998). Além de receptores para testosterona nas células de Leydig, estes também são encontrados nas células peritubulares dos túbulos seminíferos e nas células de Sertoli (WEINBAUER; WESSELS, 1999).

4.2 O estresse

Segundo Miller e O'Callaghan (2002) o estresse pode ser definido como a resposta biológica ou conjunto de reações obtidas quando um indivíduo percebe uma ameaça à sua homeostase. Esta ameaça constitui-se no agente ou estímulo estressante. O estresse pode ser subdividido em: físico (ex.: injúria mecânica, exercício), psicológico (ex.: morte, depressão) e fisiológico (ex.: hipoglicemia) (JAKOBOVITS; SZEKERES, 2002).

O estresse agudo refere-se à exposição única ao agente estressor, como por exemplo anestésias e situações de fuga, entre outros, e o crônico à exposição contínua ao agente estressor. O estresse crônico é menos estudado que o agudo, mas os parâmetros utilizados para a sua caracterização são os mesmos do estresse agudo (BEERDA et al., 1999).

Independentemente do tipo de estresse e do agente estressor a resposta do organismo é a mesma; há um aumento de atividade do sistema simpático-adrenal-medular e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (BEERDA et al., 1999; MILLER; O'CALLAGHAN, 2002). O aumento de atividade desses eixos promove uma alteração endócrina e no metabolismo de lipídios e carboidratos (JAKOBOVITS; SZEKERES, 2002; TSIGOS; CHROUROS, 2002).

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) observada durante o estresse, promove um aumento da secreção de corticosteróides pelas adrenais (BEERDA et al., 1998, 1999; DOBSON; SMITH, 1995) reduzindo as funções reprodutivas através da inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), e a conseqüente diminuição da secreção e da ação do GnRH sobre a hipófise

(DOBSON; SMITH, 1995; JAKOBOVITS; SZEKERES, 2002). Além disso, diminui a produção de FSH e LH pela hipófise e diminui a capacidade dos hormônios gonadotróficos em estimular as gônadas a produzir hormônios esteróides sexuais (RETANA-MÁRQUEZ et al., 2003; WELSH; JOHNSON, 1981).

Sob condição de estresse já se observou diminuição da secreção de testosterona no homem (JAKOBOVITS; SZEKERES, 2002), em touros (WELSH; JOHNSON, 1981), em ratos (RETANA-MÁRQUEZ et al., 2003) e no cão (BAPTISTA SOBRINHO, 2002). Em geral, o sistema reprodutivo masculino é mais sensível ao estresse que o feminino (JAKOBOVITS; SZEKERES, 2002; ROBERTI, 2003).

Além das alterações fisiológicas, os animais submetidos ao estresse apresentam redução no consumo alimentar e hídrico, e no escore corporal (CASE; CAREY; HIRAKAWA, 1995; DOBSON; SMITH, 1995) e alteração de comportamento, como por exemplo, aumento na frequência de latidos, irritabilidade e execução de movimentos repetitivos, dentre outros (BEERDA et al., 1998, 1999).

A ativação do eixo HHA também está associada à diminuição da produção do hormônio estimulador da tireóide (TSH) e inibição da conversão de tiroxina inativa em tri-iodotironina (T3) em tecidos periféricos (TSIGOS; CHROUROS, 2002).

O cortisol é um dos corticosteróides produzidos pelo córtex da adrenal, sendo sintetizado a partir do colesterol e sua secreção é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido na hipófise (MILLER; O'CALLAGHAN, 2002). A mensuração dos níveis de cortisol sangüíneo, antes e após a exposição ao fator estressor, é um indicativo da resposta biológica individual ao fator estressor (ROBERTI, 2003).

4.2.1 Dexametasona

A dexametasona (DXO) é um glicocorticóide sintético utilizado no tratamento de processos inflamatórios e para a avaliação da função normal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (FELDMAN; NELSON, 1996).

A administração de DXO promove um aumento nos níveis plasmáticos de cortisol de modo semelhante ao que ocorre durante o estresse (BARTH, 1993; BEERDA et al., 1999), podendo ser utilizada para simular ou induzir um quadro de estresse e facilitar a avaliação dos seus efeitos sobre o organismo (BARTH, 1993; BARTH; BOWMAN, 1994).

De acordo com Thibier e Roland (1976) de 1 a quatro horas após a administração de DXO observa-se uma redução na secreção de LH e de testosterona, respectivamente. Esta redução pode acarretar a diminuição da função normal do epidídimo uma vez que a concentração de testosterona seria insuficiente para mantê-la (BARTH; BOWMAN, 1994).

Além do efeito indireto da DXO sobre a testosterona plasmática, a DXO pode ainda atuar diretamente sobre o testículo uma vez que as células de Leydig possuem receptores para glicocorticóides (TSANTARLIOTOU et al., 2002).

Em bovinos, na indução do quadro de estresse através da aplicação de DXO, observou-se a diminuição ($p < 0,05$) dos níveis plasmáticos de testosterona e aumento da incidência de alterações morfológicas (BARTH, 1993).

Segundo Barth e Bowman (1994) o estresse térmico e o estresse induzido pela aplicação de DXO provocam o aparecimento de perfis espermáticos (espermograma) semelhantes.

4.2.2 Efeitos do estresse sobre a reprodução

A principal manifestação do estresse nos machos é uma queda significativa na qualidade de sêmen, que envolve redução na motilidade espermática e aumento do número de espermatozóides mortos, retenção de gota citoplasmática e um elevado grau de dano acrossomal, indicando má função epididimária. Estas alterações já foram observadas em bovinos (BARTH; BOWMAN, 1994), humanos (AITKEN et al., 1998; MIESEL et al., 1997), ovinos (JONES; MANN, 1977) e caninos (BAPTISTA SOBRINHO, 2002). No sêmen de homens submetidos ao estresse psicológico não se observa a reação do acrossoma (AITKEN et al., 1998).

Giblin et al. (1988) observaram correlação negativa entre estresse, volume do ejaculado e porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais em humanos. Suárez et al. (1996) encontraram diminuição na viabilidade e na porcentagem de espermatozóides com movimento progressivo, além de alterações na membrana espermática em ratos submetidos ao estresse psicológico crônico.

Barth (1993) verificou que o estresse térmico, induzido pelo calor, e o estresse com aumento de cortisol, induzido por dexametasona, produziram os mesmos efeitos sobre a espermatogênese de bovinos, com diminuição da motilidade de 10 a 20 % e aumento significativo de pelo menos 5% da porcentagem de alterações morfológicas espermáticas com relação aos valores pré-tratamento.

O estresse crônico promove uma estimulação contínua do eixo HHA levando à supressão da função gonadal. Este quadro tem sido observado em atletas de alto desempenho, bailarinos e indivíduos com anorexia nervosa ou desnutrição (TSIGOS; CHROUROS, 2002).

4.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo refere-se ao dano celular provocado pelo desbalanceamento entre o aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS, Reactive Oxygen Species) e a diminuição nos mecanismos antioxidantes (NICHII, 2003; SIKKA, 1996; ONG, SHEN; CHIA, 2002).

Os ROS são moléculas altamente reativas quando comparados aos outros radicais livres (qualquer composto que contenha um ou mais elétrons desapareados). Os ROS que apresentam implicações na biologia reprodutiva são: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical peroxil (LOO^-) e o radical hidroxila (OH^-) (SIKKA, 1996).

Pequenas quantidades de ROS são constantemente geradas em organismos aeróbicos em resposta a estímulos internos e externos, sendo indispensáveis nos processos metabólicos uma vez que atuam como segundo mensageiro, na proliferação celular, ou nos processos de apoptose, e ainda na imunidade e defesa contra microorganismos (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999).

Fosfolípidios insaturados, glicolípidios e o colesterol presente nas membranas celulares são os principais alvos do ataque oxidativo resultando na peroxidação lipídica, um processo degenerativo que perturba a estrutura e a função do sistema biológico com consequências patológicas (GIROTTI, 1998).

A peroxidação lipídica tem efeitos contraditórios no metabolismo. Ela pode ser considerada benéfica, pois participa da síntese de eicosanóides, da maturação celular e da mobilização de lipídios. Entretanto, ela também apresenta efeitos

negativos como a destruição de membranas e a disfunção celular (KÜHN; BORCHERT, 2002).

A degradação da estrutura da membrana plasmática provocada pelos ROS constitui o processo de lipoperoxidação. É composta basicamente por 3 etapas: 1) Iniciação: os ROS se ligam às duplas ligações dos ácidos graxos insaturados presentes na membrana formando os radicais oxil ($LO^\cdot$) e peroxil ($LOO^\cdot$); 2) Propagação: os radicais oxil e peroxil formados reagem então com os ácidos poli-insaturados intactos presentes na membrana e, 3) Terminação: toda a membrana se encontra lesada (BUETTNER, 1993; GIROTTI, 1998; SCHAFER et al., 2002).

O grau de lesão celular provocado pelo estresse oxidativo é crescente e dependente do tipo de dano causado e da resposta celular ao mesmo, podendo ser dividido em 4 níveis (GIROTTI, 1998): 1) ausência de dano e/ou os anti-oxidantes são suficientes para reparar/prevenir o dano oxidativo; 2) pequena injúria oxidativa e ativação das defesas primárias; 3) dano moderado, a capacidade de reparo anti-oxidante é excedida desencadeando a apoptose e, 4) dano intenso, com ativação de algum tipo de resposta metabólica programada levando à necrose (Figura 1). Entretanto, desde o início do processo de peroxidação lipídica observa-se a perda de fluidez e função decorrente da desorganização da membrana celular (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003).

Figura 1 - Esquema dos possíveis níveis de peroxidação lipídica (LPO) (Adaptado de GIROTTI, 1998).

4.3.1 Estresse oxidativo e infertilidade masculina

Diferentes tipos de ROS são produzidas pelo espermatozóide imaturo que podem induzir a danos de diferentes graus nas membranas das células germinativas e espermatozóides, acarretando diferentes graus de infertilidade (BOLLE; EVANDRI; SASO, 2002). Estes radicais são produzidos tanto por espermatozóides normais quanto por anormais. Entretanto, os espermatozóides normais possuem mecanismos de defesa que previnem o dano celular (SULEIMAN

et al., 1996) e desde a primeira metade da década de 40 há relatos de que os ROS diminuem a motilidade espermática (PASQUALOTTO et al., 2000).

O espermatozóide pode produzir ROS de duas maneiras: 1) através do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase presente na membrana plasmática espermática; 2) através do sistema NADH-dependente de óxido redutase presente na mitocôndria espermática. O sistema mitocondrial é a principal fonte de ROS no espermatozóide de homens inférteis (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003).

Os espermatozoides são muito sensíveis à oxidação, devido à alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (BOLLE; EVANDRI; SASO, 2002; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995; HSU et al., 1998; ONG; SHEN; CHIA, 2002; SHARMA; AGARWAL, 1996).

A oxidação espermática é acompanhada por alterações estruturais (principalmente na região acrossômica) e de metabolismo espermático com diminuição da motilidade e perda de constituintes intracelulares (JONES; MANN, 1977). A perda da motilidade pode ser decorrente da rápida perda de ATP intracelular (SIKKA, 1996).

Alterações mitocondriais, danos estruturais do DNA, perda da integridade de membrana e inativação de enzimas também têm sido correlacionadas com a formação de lipo-peróxidos (radicais livres de oxigênio ligados à lipídeos) (AITKEN et al., 1998; BECONI et al., 1991; HSU et al., 1998; JONES; MANN, 1977; LEWIS et al., 1997; SHARMA; AGARWAL, 1996; SULEIMAN, et al., 1996). Observa-se também a diminuição da viabilidade espermática e aumento de alterações morfológicas de

peça intermediária com efeitos deletérios sobre a capacitação espermática e a reação de acrosoma (PASQUALOTTO et al., 2000; SIKKA, 1996).

O estresse oxidativo é considerado um dos maiores causadores de disfunção espermática (AITKEN et al., 1998; BOLLE; EVANDRI; SASO, 2002), além de ser um dos principais fatores associados tanto a perda da fertilidade de amostras de sêmen durante sua manipulação e armazenamento (AITKEN; BARKER, 2002; CALAMERA et al., 2001) quanto a diminuição do tempo de vida do espermatozóide na fêmea (BECONI et al., 1991; HSU et al., 1998).

De acordo com Lewis et al. (1997) observa-se um aumento na produção de oxigênio reativo em 40% dos homens inférteis, porém, em homens férteis não é possível a sua detecção. Já Pasqualotto et al. (2000) afirmam que de 40% a 80% dos pacientes inférteis, independente da causa da infertilidade, apresentam altos níveis de oxigênio reativo seminal.

A figura 2 apresenta um esquema das interações entre o estresse oxidativo e a redução da função espermática e da fertilidade.

Figura 2 - Esquema dos mecanismos de interação entre o nível de estresse oxidativo e antioxidantes afetando a função espermática e a fertilidade (Adaptado de SIKKA, 1996; TSIGOS; CHROUROS, 2002)

4.4 Anti-oxidantes

O organismo animal desenvolveu mecanismos para proteger-se do dano oxidativo, e as substâncias que participam destes mecanismos, receberam o nome

de anti-oxidantes. Os anti-oxidantes podem ser divididos em dois grandes grupos de acordo com o nível de defesa, primária ou secundária, em que atuam.

As defesas primárias são principalmente preventivas, promovendo a inativação do ROS antes que a oxidação dos lipídios ocorra, formada principalmente pelas enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. As defesas secundárias atuam como “back up” promovendo a eliminação dos ROS ou o reparo das alterações provocadas pela peroxidação lipídica, como por exemplo, a vitamina E e o BHT (GIROTTI, 1998; SALEH; AGARWAL, 2002) (Figura 3).

Figura 3 – Esquema de algumas importantes rotas para a formação de lipídios oxidados (LOOH) e a recuperação dos mesmos. (Adaptado de GIROTTI, 1998).

São características desejáveis às moléculas anti-oxidantes apresentar menor energia de ativação que a das moléculas oxidáveis, ter capacidade baixa de perder ou ganhar elétrons e de reagir com o oxigênio, ter atividade anti-oxidante mesmo em pequenas quantidades e poder ser reciclada direta ou indiretamente por sistemas enzimáticos (BUETTNER, 1993).

Os anti-oxidantes podem restabelecer o balanço entre as moléculas oxidantes e anti-oxidantes no organismo, mantendo assim a integridade das

membranas celulares e prevenindo o dano oxidativo ao DNA (SALEH; AGARWAL, 2002; WOUNG et al., 2000).

O estresse promove uma diminuição dos agentes anti-oxidantes através da redução de sua síntese, diminuição da absorção ou mobilização das moléculas que constituem estes agentes (HOLLAND; STOREY, 1981).

Durante o processo de maturação, o espermatozóide perde citoplasma, perdendo assim parte dos mecanismos endógenos de reparo e das defesas enzimáticas que são observadas em outros tipos celulares (DONNELLY; McCLURE; LEWIS, 1999). O espermatozóide maduro apresenta baixos níveis das enzimas anti-oxidantes (AITKEN et al., 1996; BOLLE; EVANDRI; SASO, 2002). Porém, o plasma seminal compensa esta deficiência, através de uma maior concentração destas enzimas (BOLLE; EVANDRI; SASO, 2002; LENZI, et al., 1996; SHARMA; AGARWAL, 1996), tais como a superóxido dismutase (ALVAREZ et al., 1987), o sistema glutatona peroxidase / glutatona redutase (DANDEKAR et al. 2002) e catalase (DANDEKAR et al., 2002). Além destes, existem no plasma seminal antioxidantes não enzimáticos, tais como o ascorbato (ZINI; GARRELS; PHANG, 2000), o urato (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995), a vitamina E (SURAI et al., 1998; THEROND et al., 1996), o piruvato (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995), a glutatona (LENZI et al, 1996), a taurina e a hipotaurina (HENDIN et al., 1999).

De acordo com Lewis et al. (1997) e Pasqualotto et al. (2000), a capacidade anti-oxidante total do plasma seminal é maior em homens férteis.

Hendin et al. (1999) verificaram que homens com varicocele apresentavam diminuição da capacidade anti-oxidante seminal associada à elevação dos ROS, e que esses achados estavam relacionados à infertilidade e aumento das anormalidades espermáticas observadas nestes pacientes.

Nichi (2003) observou que os níveis de peroxidação lipídica no sêmen de touros da raça Simental, criados em região tropical, foram maiores que os de touros da raça Nelore mantidos nas mesmas condições climáticas. Segundo este autor, a associação entre a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e a atividade das enzimas anti-oxidantes é importante para elucidar se o aumento da peroxidação lipídica deve-se ao aumento na produção de ROS ou à diminuição das enzimas anti-oxidantes ou, ainda, à uma associação entre esses dois fatores.

4.4.1 Vitamina E

O termo vitamina E foi primeiramente utilizado por Evans e Bishop em 1922 para descrever um fator nutricional importante para a atividade reprodutiva normal (AZZI; STOCKER, 2000). Ela é a designação genérica de todos os derivados tocoferol e tocotrienol. Genericamente são constituídos por um anel cromanol e uma cadeia lateral (BLATT; LEONARD; TRABER, 2001; DIPLOCK, 1974; MACHLIN, 1984).

Existem quatro isoformas de tocoferol e tocotrienol, que são designadas como α , β , γ e δ de acordo com a posição do grupo metil no anel cromanol. Os tocoferóis e tocotrienóis se diferenciam pela saturação na sua cadeia lateral (Figura 4). Deste modo, o termo vitamina E designa 8 compostos químicos diferentes, isômeros, que possuem a mesma função biológica (BLATT; LEONARD; TRABER,

2001; WANG; QUINN, 1999). Entretanto, o α -tocoferol apresenta uma maior atividade metabólica e biológica no organismo (BLATT; LEONARD; TRABER, 2001)

Figura 4 – Estrutura química do tocoferol e do tocotrienol (Adaptado de AZZI; STOCKER, 2000)

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel que está localizada na interface aquosa e nos domínios hidrofílicos das membranas biológicas e lipoproteínas (QUINN, 2004).

Útero, testículos, adrenais e hipófise possuem altas concentrações de vitamina E, quando comparados aos outros órgãos (BLATT; LEONARD; TRABER, 2001). Tecidos deficientes em vitamina E apresentam aumento na produção de radicais livres (MACHLIN; BENDICH, 1987).

No âmbito reprodutivo, a sua deficiência provoca a inibição da espermatogênese (MACHLIN, 1984), a degeneração testicular em cães (DIPLOCK, 1974) e o aumento da oxidação lipídica dos espermatozóides de carneiros (JONES; MANN, 1977).

Estudos “in vitro” têm demonstrado que a vitamina E atua como um captador de radicais livres e reparador das membranas celulares (Figura 5) (BIROTTI, 1998; MACHLIN, 1984). Entretanto, segundo Beconi et al. (1991) a vitamina E diminui a

peroxidação lipídica espermática através da manutenção dos níveis da superóxido dismutase no plasma seminal.

Figura 5 – Reações em cadeia do α -tocoferol (adaptado de WANG; QUINN, 1999)

A vitamina E protege as membranas celulares através de dois mecanismos (BRADFORD et al., 2003; QUINN, 2004; WANG; QUINN, 1999): atuando como um agente anti-oxidante, e assim protegendo os lipídios poli-insaturados presentes nas membranas celulares da oxidação, e ainda formando complexos com os fosfolípidios, estabilizando a membrana através de ligações do tipo “Van der Waals”.

As funções da vitamina E porém, não estão restritas somente à proteção da membrana (atividade anti-oxidante da vitamina E). Uma variedade de outras ações tem sido reconhecida e receberam o nome de mecanismos moleculares não anti-oxidantes da vitamina E.

Dentre os mecanismos moleculares não anti-oxidantes da vitamina E, destacam-se (AZZI; STOCKER, 2000; BRADFORD et al., 2003; QUINN, 2004): a regulação da taxa de transcrição de genes que codificam o CD36, α -TTP, α -tropomiosina e a collagenase; a inibição da proliferação celular, da agregação plaquetária e da adesão monocitária; a inibição da proteína quinase C e da 5-

lipoxigenase; ativação da fosfatase A2 e da diacilglicerol (DAG) quinase; a trans-acilase independente de coenzima A (CoA) e a fosfolipase D.

Segundo Bradford et al. (2003), a ação do α -tocoferol sobre a modulação da atividade enzimática pode ser maior do que a ação sobre a estrutura da membrana, uma vez que as enzimas atuam sobre substratos que estão presentes na membrana ou são ativadas/inibidas quando incorporadas às membranas.

4.4.1.1 Vitamina E e fertilidade masculina

Há controvérsias, quanto à eficiência do emprego de vitamina E na manutenção da motilidade espermática. De acordo com Beconi et al. (1991), a vitamina E no meio diluidor evitaria a perda de motilidade espermática de bovinos estressados. Askari et al. (1994) observaram um aumento mínimo na motilidade pós descongelamento, em sêmen humano congelado com meio suplementado com vitamina E. Por outro lado Donnelly, McClure e Lewis (1999) observaram diminuição na motilidade espermática, quando o sêmen humano foi mantido em meio suplementado com α -tocoferol (forma ativa da vitamina E).

Surai et al. (1997) testaram quatro níveis de suplementação, avaliando-se a suplementação de vitamina E em aves aumentaria a resistência do sêmen de frangos à peroxidação lipídica, e obtiveram uma melhor resposta nos animais suplementados com 200mg de α -tocoferol/kg de dieta, o que representava de 6 a 7 vezes o requerimento diário.

Em trabalho posterior, Surai et al. (1998) verificaram que a suplementação oral de vitamina E em aves, produz aumento nos níveis de α -tocoferol no sêmen. Este aumento está associado à redução na suscetibilidade do espermatozóide à peroxidação lipídica. Entretanto, para Halliwell (1987) o fornecimento de vitamina E a humanos não aumentaria a proteção das membranas celulares.

Hsu et al. (1998) sugeriram que em ratos, a suplementação com vitamina E de 300mg/kg ração/dia, o que representa 10 vezes o requerimento diário, ou a sua associação com vitamina C (150mg/kg ração/dia de vitamina E + 500mg/litro de água/dia de vitamina C) protegeria o espermatozóide contra a perda da motilidade, observada na peroxidação da membrana espermática, porém sem apresentar efeito sobre a concentração. No trabalho de Donnelly, McClure e Lewis (1999), a suplementação oral com ascorbato (vitamina C) e com α -tocoferol, durante o período de um mês, induziu à lesões no DNA espermático, em humanos. No entanto, Rolf et al. (1999) suplementaram homens inférteis com 800 mg/dia de vitamina E, o que representa 53 vezes o requerimento diário, e 1000mg/dia de vitamina C por 56 dias, não observando nenhuma melhora no quadro espermático desses pacientes.

Ten et al. (1997) suplementaram ratos com altas e baixas doses de vitamina E e de vitamina C (25mg de vitamina C e 60mg de vitamina E/kg de dieta e 10g de vitamina C e 600mg vitamina E/kg de dieta, respectivamente). Os autores não observaram efeito sobre a qualidade espermática, a fertilidade ou a taxa de concepção quando se forneceram baixas doses de vitamina (2 vezes o requerimento diário). Porém, altas doses de vitamina (20 vezes o requerimento diário) diminuíram a concentração espermática e aumentaram a porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas.

Kessopoulo et al. (1995) forneceram 600mg/dia de vitamina E (40 vezes o requerimento diário) para homens inférteis, e observaram aumento ($p=0,004$) no teste de penetração de zona pelúcida, indicando uma melhora da função espermática. Suleiman et al. (1996) e Vézina et al. (1996) observaram um aumento na concentração e motilidade espermática; além de uma diminuição na incidência de alterações morfológicas em homens suplementados com vitamina E. Contudo os primeiros autores ressaltaram que essa melhora dos parâmetros seminais foi suplementação dependente, ou seja, terminada a suplementação, os parâmetros analisados retornaram aos valores pré-tratamento.

Geva et al. (1996) suplementaram homens com espermíogramas normais de acordo com a World Health Organization (WHO), e que apresentavam baixas taxas de fertilidade em programas de fertilização “in vitro”, durante 3 meses com 200mg/dia de α -tocoferol, cerca de 13,5 vezes o requerimento diário. Os autores verificaram que após 1 mês de suplementação houve aumento na taxa de fertilização, de 19,3 para 29,1% ($p<0,05$), e diminuição na peroxidação lipídica, de 12,6 para 7,8 nmol/ 10^8 espermatozóides ($p<0,01$).

Castellini et al. (2002) avaliaram o efeito da suplementação de vitamina E (200mg/kg de dieta) e/ou selênio (0,05 ppm) sobre os parâmetros seminais e o nível de peroxidação lipídica (TBARS) em coelhos. Os autores observaram que animais suplementados com vitamina E apresentavam maior concentração seminal desta vitamina (1,75 mmol/L vs. 0,95 mmol/L, $p<0,005$) e um menor grau de peroxidação lipídica (12,44 nmol MDA/ 10^8 espermatozóides vs. 21,444 nmol MDA/ 10^8 espermatozóides, $p<0,05$) quando comparados com animais não suplementados.

4.4.2 Catalase (EC 1.11.1.6)

A catalase (CAT) é uma das mais eficientes enzimas conhecidas, pois não pode ser saturada por nenhuma concentração de seu substrato (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999). A CAT reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e tem como produtos desta reação a água e o oxigênio molecular.

Nos animais o H_2O_2 é detoxificado tanto pela CAT quanto pela glutathione peroxidase. A CAT protege as células do H_2O_2 metabólico (SIKKA, 1996), e embora a CAT não seja essencial para alguns tipos celulares, em condições normais ela possui um importante papel na tolerância ao estresse oxidativo, e na resposta adaptativa das células a este estresse (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999).

A catalase é encontrada na célula espermática e no plasma seminal de humanos, ratos e coelhos (DADENKAR et al., 2002).

Calamera et al. (2001) adicionaram ao meio Ham's F10, utilizado para a capacitação de espermatozóides humanos, 100 unidades/mL de catalase. Após um período de incubação prolongado (48 horas) os autores observaram que a adição de catalase manteve os níveis basais de produção de ROS porém não impediu a perda de motilidade ocorrida durante o tempo de incubação.

Miessel et al. (1997) verificaram que homens inférteis possuíam menor nível de catalase quando comparados com homens férteis. Entretanto, Zini et al. (2000) não verificaram diferença nos níveis de catalase entre homens férteis e inférteis.

Dadenkar et al. (2002) não conseguiram demonstrar correlação entre a atividade da catalase e a concentração espermática e a porcentagem de células

espermáticas íntegras observadas com o teste de expansão hipo-osmótico (HOST) em humanos.

4.4.3 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação entre os íons superóxido e o hidrogênio (fornecido pelo NADH_2 e NADPH_2) e tem como produto o peróxido que por sua vez pode ser destruído pela catalase ou pela glutatona (MACHLIN, 1984). A SOD converte um radical altamente reativo (O_2^-) em outro menos reativo (H_2O_2).

Outra função da SOD é a de proteger as di-hidratases (dihidróxi ácido desidratase, aconitase, 6-fosfogluconato desidratase e as fumarases A e B) da inativação pelo radical superóxido (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999).

A SOD é uma importante enzima anti-oxidante dos organismos vivos; no sêmen e nos testículos encontram-se altas concentrações desta enzima (MACHLIN, 1984).

Alvarez et al. (1987) verificaram altas correlações entre a atividade da superóxido dismutase com o índice de peroxidação lipídica espontânea ($r=0,97$; $p<0,05$) e com o tempo necessário para que o espermatozóide reduza a sua motilidade ($r=0,87$; $p<0,05$), em amostras de sêmen humano, indicando ser a superóxido dismutase, o principal mecanismo de proteção contra a peroxidação lipídica em humanos.

Aitken et al. (1996) verificaram que baixos níveis de superóxido dismutase estavam associados à função espermática defeituosa, devido à alta suscetibilidade das células espermáticas aos efeitos citotóxicos do H_2O_2 . Neste experimento, os níveis de superóxido dismutase foram negativamente correlacionados com os índices de movimento espermático e com a capacidade de fusão com o oócito ($r=-0,55$, $p<0,001$ e $r=-0,058$, $p<0,001$, respectivamente).

Zini, Garrels e Phang (2000) observaram que os níveis de superóxido dismutase foram significativamente maiores nos homens inférteis. Todavia, Miessel et al. (1997) não verificaram diferenças entre homens férteis e inférteis.

Dadenkar et al. (2002) verificaram que a atividade da SOD foi significativamente maior, em homens com oligospermia severa, quando comparados à homens normais. Os autores também observaram uma correlação positiva entre a SOD e o teste de expansão hipo-osmótico.

4.4.4 Glutathione peroxidase (1.11.1.19)

A glutathione peroxidase (GPx) constitui-se numa família de enzimas que são capazes de reduzir a concentração de hidro-peróxidos orgânicos e inorgânicos, como por exemplo LOOH e H_2O_2 , respectivamente, utilizando a glutathione (GSH) (KÜHN; BORCHERT, 2002).

A GPx tem como substrato o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como a CAT. O ciclo de redox da glutathione é a maior fonte de proteção em condições de baixos

níveis de estresse oxidativo, porém a CAT parece ter um papel mais importante em quadros severos de estresse oxidativo (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999).

Nos mamíferos existem 5 isoenzimas, sendo o grau de expressão de cada isoenzima dependente do tipo celular que a produz. A GPx contém uma molécula de selênio ligada à cisteína em cada uma de suas sub-unidades, que é essencial para a sua atividade enzimática.

A GPx associada à reprodução (GPx 5) compreende duas isoformas: uma independente de selênio, que é expressa especificamente no epidídimo (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999) e outra dependente de selênio que está localizada no núcleo da célula germinativa e está associada à condensação da cromatina durante a espermatogênese e à proteção do DNA espermático contra o dano oxidativo (KÜHN; BORCHERT, 2002).

Imai et al. (2001) detectaram intensa atividade da enzima glutational fosfolípide hidroperóxido peroxidase (PHGPx) nas mitocôndrias da peça intermediária do espermatozóide humano e uma redução na peroxidação lipídica espermática em humanos.

PHGPx é considerada a única enzima antioxidante intracelular que pode reduzir os hidro-peróxidos nas membranas. Esta enzima possui alto grau de expressão em testículos de ratos e de camundongos (IMAI et al., 1995). Nos espermatozóides epididimários, a enzima é encontrada nas cabeças e na peça intermediária dos espermatozóides (URSINI et al., 1999).

A abundância de PHGPx no espermatozóide, pode ser uma indicação de que esteja envolvida no desenvolvimento desta célula. Como ela é uma das principais seleno-proteínas nas espermátides, a deficiência de selênio provoca prejuízo à sua

atividade levando à redução na produção e motilidade de espermatozóides (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A colheita de amostras ocorreu no período de junho a dezembro do ano 2001.

A figura 6 apresenta um esquema das análises feitas.

Figura 6 – Protocolo experimental utilizado para avaliar e comparar os efeitos do estresse e da suplementação com vitamina E sobre o sêmen de cães da raça rotweiller

5.1 Animais e local do experimento

O experimento realizou-se nas instalações da Seção de Cães de Guerra do 2º Batalhão da Polícia do Exército (Canil do 2º BPE), localizado no município de Osasco, São Paulo. As temperaturas máximas e mínimas e o índice pluviométrico aferidas diariamente, no município de Osasco, encontram-se no ANEXO A. Os valores médios para as temperaturas máxima e mínima e para o índice pluviométrico, observados durante o período experimental foram 24,5°C, 15,78°C e 4,49 mm³, respectivamente.

Foram empregados 18 cães machos da raça rotweiller, com idade média de 4 anos. Antes do experimento os animais passaram por avaliação clínica geral, além de exames como hemograma, leucograma, função hepática e função renal. Além de serem vermifugados e testados contra leptospirose e brucelose.

Após a avaliação clínica, sorológica e parasitológica, os animais foram condicionados para a coleta de sêmen, através da estimulação manual. O período experimental somente foi iniciado após a estabilização do quadro espermático (alterações morfológicas e concentração espermática).

Os animais receberam ração balanceada comercial¹ duas vezes ao dia, às 4:00 e às 16:00 horas, de modo a oferecer 700g por animal diariamente². A água era fornecida “ad libitum”. O consumo alimentar era verificado diariamente e as eventuais sobras pesadas e anotadas.

¹ Must® Premium, para raças grandes, Socil Guyomarc'h (ANEXO B)

² Orientação da equipe técnica da Socil Guyomarc'h ®

A verificação do peso corpóreo foi efetuada quinzenalmente, em balança digital.

5.2 Grupos experimentais

Os animais foram sorteados aleatoriamente a quatro tratamentos, que constituíram-se de: T₁ - com estresse com suplementação, T₂ - com estresse sem suplementação, T₃ - sem estresse com suplementação, T₄ - sem estresse sem suplementação.

5.3 Indução do estresse

Os animais que dos grupos T₁ e T₂ foram submetidos ao estresse induzido através da aplicação de dexametasona³ (BARTH, 1993; BEERDA et al., 1999) por via intramuscular na dose de 0,01mg/kg de peso vivo durante sete dias consecutivos, às 8 horas da manhã (BARTH, 1993).

Os animais dos grupos T₃ e T₄ receberam uma aplicação de solução fisiológica de maneira semelhante aos animais dos grupos T₁ e T₂, com a finalidade de que todos os animais fossem submetidos ao mesmo manejo.

³ Dexavet® injetável.

5.3.1 Caracterização do quadro de estresse

A caracterização do quadro de estresse foi feita através da dosagem de cortisol plasmático (BEERDA et al., 1998, 1999), avaliação do consumo e escore corporal (CASE; CAREY; HIRAKAWA, 1995; DOBSON; SMITH, 1995).

5.4 Suplementação de vitamina E

Os animais dos tratamentos T₁ e T₄ foram suplementados com α -tocoferol⁴ por via oral na dose de 500mg/animal/dia, o que representa 10 vezes o requerimento diário para cães (50mg/dia; NRC, 1985).

A suplementação com vitamina E iniciou-se na semana anterior à semana de aplicação de dexametasona e realizada até o último dia do período experimental.

5.5 Colheita de sangue e dosagem dos níveis séricos de cortisol e testosterona plasmáticos

As colheitas de sangue para a avaliação de cortisol e testosterona plasmática foram feitas em tubos de coleta heparinizados, através de punção da veia cefálica.

⁴ BASF,

Imediatamente após a colheita, as amostras de sangue foram centrifugadas a 800g por 10 minutos, para separação do plasma, que foi então acondicionado em tubos “eppendorf” de 0,5mL, identificados e armazenados a -20°C , até o momento da análise.

Para determinação das variações diárias destes dois hormônios, foram realizadas 8 colheitas durante o período de 24 horas, no dia anterior ao primeiro e no dia posterior ao último dia da aplicação da dexametasona. Deste modo, obteve-se a variação diária de cortisol e testosterona antes (coleta pré-estresse) e após (coleta pós-estresse) a indução do quadro de estresse. Os horários utilizados para a coleta de sangue foram: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas, sendo que o tempo 0 (8 horas da manhã), correspondeu ao horário de aplicação da dexametasona (BARTH, 1993).

Para mensurar os níveis plasmáticos de cortisol e testosterona durante o período experimental realizou-se uma colheita semanal, as 8 horas da manhã.

As dosagens de cortisol e testosterona foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VRA, FMVZ-USP) através de conjuntos diagnósticos comerciais⁵.

⁵ DPC medlab código 10001037

5.6 Escore corporal

O escore corporal foi avaliado antes de cada coleta de sêmen. Utilizou-se a escala proposta por Hand et al. (2000) (ANEXO C). Esta escala vai de 1 à 5, na qual:

Escore 1..... animal muito magro

Escore 2..... animal magro

Escore 3..... animal normal

Escore 4..... animal com sobre peso

Escore 5..... animal obeso.

5.7. Consistência testicular

A consistência testicular foi estimada antes de cada coleta e sempre pelo mesmo técnico, através de palpação. Para efeito de classificação foi utilizada uma escala de um a cinco (BAPTISTA SOBRINHO, 2002), na qual:

Grau 1.....consistência flácida

Grau 2.....consistência intermediária

Grau 3.....consistência firme (desejável)

Grau 4.....consistência túrgida

Grau 5.....consistência dura

5.8 Colheita de sêmen

A colheita de sêmen era feita duas vezes por semana, as terças e quintas feiras, com início as 8:00 e término por volta de 10:00 horas.

O sêmen foi colhido através de estímulo manual em tubo graduado, isolado de choque térmico e luz, sem a presença de fêmea no cio ou manequim. Foram feitas duas colheitas por semana, durante todo o período experimental.

Como o sêmen foi congelado, optou-se por coletar apenas a segunda fração do ejaculado (fração rica em espermatozóides). A primeira e terceira frações dos ejaculados foram descartadas.

5.9 Avaliação do ejaculado

Os ejaculados foram avaliados segundo a metodologia descrita a seguir.

5.9.1 Análises macroscópicas

- Volume: mensuração realizada através de visualização direta do tubo graduado utilizado para a coleta.

- Cor: segundo o critério:

1.... coloração translúcida

2.... coloração branco turva

3.... coloração branca

4.... coloração branca leitosa

5.... coloração leitosa e opaca

5.9.2 Análises microscópicas

As análises de motilidade e vigor foram realizadas no momento da colheita. As demais análises microscópicas foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VRA, FMVZ-USP).

5.9.2.1 Motilidade espermática

Para a mensuração da motilidade, foi avaliado o movimento progressivo retilíneo e uniforme dos espermatozóides. Colocou-se uma gota de sêmen em lâmina pré-aquecida a 36°C, recoberta por uma lamínula. As células espermáticas foram observadas, então, em microscópio de luz, com aumento de 200x. O resultado da motilidade foi expresso como porcentagem de células que apresentavam movimento retilíneo e progressivo.

A motilidade espermática foi avaliada em quatro momentos diferentes: no momento da colheita (MOT), imediatamente após o descongelamento (MOT 0), antes da capacitação espermática (MOT 1) e após a capacitação espermática (MOT 2)

5.9.2.2 Vigor espermático

O vigor espermático, também chamado de velocidade de progressão espermática, avalia a qualidade do movimento exibida pelos espermatozóides móveis (SILVA; SILVA; CARDOSO, 2002). O resultado foi expresso na forma de escore (SEAGER; PLATZ, 1977):

0. células espermáticas imóveis
1. células espermáticas com movimentação lenta, latero-lateral, sem progressão
2. células espermáticas com rápida movimentação latero-lateral, sem progressão retilínea
3. células espermáticas com rápidos movimentos latero-laterais, com alguma progressão retilínea
4. células espermáticas com movimentação lenta, porém em contínua progressão retilínea
5. células espermáticas com movimentação rápida e contínua progressão retilínea.

Para a realização deste exame, colocou-se uma gota de sêmen em lâmina pré-aquecida a 36°C), recoberta por lamínula e classificou-se o tipo de movimento das células espermáticas em microscópio de luz, com aumento de 200x.

O vigor espermático foi avaliado em quatro momentos diferentes: no momento da colheita (VIG), imediatamente após o descongelamento (VIG 0), antes da capacitação espermática (VIG 1) e após a capacitação espermática (VIG 2)

5.9.2.3 Concentração espermática

No momento da colheita, o sêmen foi diluído em solução de formol salino, na proporção de 1:200. A contagem de células foi feita posteriormente em câmara de Neubauer e a concentração espermática expressa em milhões de espermatozóides por mililitro.

5.9.2.4 Morfologia espermática

A porcentagem de alterações morfológicas foi determinada através de preparações úmidas, feitas com sêmen preservado em solução de formol salino. Depositou-se uma gota de material preservado entre lâmina e lamínula. Para a leitura utilizou-se um microscópio de contraste diferencial de fase, em aumento de 1250x. Foram avaliadas 200 células espermáticas em cada preparação, e os

resultados expressos em porcentagem de defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais. A classificação das alterações morfológicas foi feita segundo Oettlé e Soley (1988).

5.9.2.5 pH do ejaculado

O pH do ejaculado foi mensurado no momento da coleta através do uso de pHmetro digital portátil ⁶.

5.9.2.6 Densidade do ejaculado

A mensuração da densidade do ejaculado foi feita de maneira indireta. A fórmula da densidade é:

$$densidade = \frac{massa \text{ ou } peso}{volume}$$

Padronizou-se então o volume de 0,5mL, aferido através de pipeta automática, que foi então pesado em balança de precisão, com quatro casas decimais. O peso obtido foi utilizado para o cálculo da densidade. A densidade foi expressa assim em g/mL.

⁶ Modelo: Checker1, ph - testes and electrode, Hanna Instruments

5.10 Obtenção do plasma seminal

Após a realização das avaliações imediatas e retiradas as alíquotas para as análises laboratoriais e para o congelamento, o plasma seminal foi separado das células espermáticas através de duas centrifugações sucessivas (GLANDER et al., 2002). Primeiramente, o ejaculado foi centrifugado a 1000g por 15 minutos. O sobrenadante foi então centrifugado a 4000g por 20 minutos e a 4°C. Assim garantiu-se a total retirada de células espermáticas. O sobrenadante (plasma seminal) foi então armazenado à temperatura de -20°C até o momento das análises.

5.11 Congelamento do sêmen

O protocolo utilizado para o congelamento de sêmen foi descrito por Santos (1997). O diluidor utilizado no congelamento do sêmen foi o Tris-frutose-ácido cítrico (ANEXO D) e o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL . Segundo o autor este foi o diluidor que apresentou melhores resultados no congelamento do sêmen, canino.

5.12 Descongelamento e lavagem das amostras de sêmen congelado

As amostras de sêmen congeladas foram descongeladas e lavadas de acordo com o protocolo descrito por Rota et al. (1999).

A amostra foi descongelada através de imersão da palheta em água à 70°C por 8 segundos, foi então transferida para um tubo, mantido em banho-maria a 37°C e contendo 0,5mL de capacitation canine medium (CCM, MAHI; YANAGIMACHI, 1978, ANEXO E) com 2% de albumina sérica bovina (BSA, fração V).

A seguir, o material foi centrifugado a 700g por 8 minutos e o sobrenadante desprezado. Em seguida, adicionou-se 1mL de meio CCM com BSA a 36°C. O “pellet” formado foi ressuspensionado para outra lavagem. No total, foram efetuadas duas lavagens com meio CCM com BSA, para que a retirada do diluidor fosse efetiva.

Terminadas as lavagens, o sobrenadante foi novamente retirado, colocando-se lentamente 1,5mL de meio CCM com BSA mantido a 36°C em estufa com 5% de CO₂ pela parede do tubo. Após delicada homogenização, retirou-se uma alíquota de 0,6mL, que foi mantida em banho-maria a 36°C para a realização dos testes antes da capacitação espermática. Este foi considerado, então, o tempo 1 (ROTA et al., 1999).

5.13 Testes que avaliam a integridade da membrana espermática

O transporte de moléculas através da membrana espermática é um processo essencial para a viabilidade e capacidade fertilizante do espermatozóide (KUMI-DIAKA, 1993), exigindo-se, entretanto, que esta membrana apresente-se íntegra para ser funcional. Para avaliar a integridade da membrana espermática foram utilizados a capacitação espermática, o teste hipo-osmótico, a coloração fluorescente, a coloração de eosina/nigrosina, a coloração acrossomal simples e a coloração tripla.

5.13.1 Capacitação espermática

A capacitação é necessária para que o espermatozóide sofra a reação acrossômica. Contudo, após a capacitação não se verifica uma mudança visível na morfologia espermática, porém observa-se um aumento na motilidade espermática e a ocorrência do movimento de “Wisplash” (CUMMINS, 1982). Como a visualização do movimento de “Wisplash” e o aumento da motilidade são meios subjetivos de diagnóstico, a maioria dos ensaios realizados para detectar a capacitação espermática avalia a capacidade do espermatozóide em sofrer reação acrossômica (MEDEIROS; PARRISH, 1996). A reação acrossômica pode ser avaliada através de colorações específicas, que avaliem a integridade da membrana acrossomal.

O meio utilizado para a capacitação espermática permaneceu por uma hora em estufa de CO₂ antes de ser utilizado (ROTA, 1998).

Após o descongelamento, lavagem (item 5.12) foi retirada uma alíquota para realização dos testes antes da capacitação espermática (ROTA, 1998): motilidade, vigor, HOST, viabilidade espermática, integridade da membrana acrossomal, coloração fluorescente e coloração tripla (tempo 1). O sêmen foi então, levado à estufa de 5% de CO₂ onde permaneceu por 1 hora a temperatura de 37°C, para promover o “swim up”. Decorrido este tempo, o sêmen foi retirado da estufa de CO₂ e avaliado em microscópio de luz quanto a capacitação espermática, através da análise da motilidade progressiva retilínea e da observação do movimento de “Wisplash” (CUMMINS, 1982). Além disto, foram realizados os seguintes testes: motilidade, vigor, viabilidade espermática, integridade da membrana acrossomal, coloração fluorescente e coloração tripla (tempo 2).

5.13.2 Teste de expansão hipo-osmótico (HOST)

O teste de expansão hipo-osmótico foi realizado segundo a técnica descrita por Jeyendran et al. (1984). Este teste baseia-se no fato de que, quando uma célula é exposta às condições hipo-osmóticas, a água passa através da membrana, para tentar equilibrar a osmolaridade intra-celular. Este influxo de água aumenta o volume espermático e a membrana plasmática “incha”, sendo a cauda do espermatozóide mais sensível às condições osmóticas, mostrando-se enrolada quando da entrada de água (JEYENDRAN et al., 1984).

Misturou-se 0,1mL de sêmen com 0,9mL de solução hipo-osmótica (60 mOsmol, ANEXO F). Como controle, adicionou-se 0,1mL de sêmen com 0,9mL de solução iso-osmótica (300 mOsmol). As duas alíquotas foram então mantidas em banho-maria à 37°C, durante 30 minutos. Após esse período, adicionou-se 0,1mL de solução de formol salino com intuito de parar a reação e conservar a amostra. Em seguida as amostras foram levemente agitadas através de movimentos de inversão e imediatamente resfriadas a 5°C até o momento da análise.

Para a verificação de alterações nas células espermáticas, colocou-se uma gota do material entre lâmina e lamínula, sendo a leitura realizada em microscópio de contraste diferencial de fase, com aumento de 400x. Foram contadas então 200 células espermáticas.

Na solução hipo-osmótica (60mOsmol), os espermatozóides que apresentavam enrolamento de cauda, caracterizando visualmente o edema, foram considerados como aqueles que apresentavam integridade estrutural e funcional da membrana espermática. Por outro lado, as células espermáticas que não apresentavam enrolamento de cauda foram consideradas como células de membrana não integra.

A solução iso-osmótica (300mOsmol) serviu como controle para evidenciar e descartar células que apresentavam cauda enrolada (patologia) antes do início do teste.

O resultado foi expresso em porcentagem de células com membrana integra e obtido por diferença, como mostrado a seguir:

$$\text{HIPO} = \% \text{ sptz hipo} - \% \text{ sptz iso}$$

Onde:

Hipo.....porcentagem de células espermáticas com membrana íntegra

%sptz hipo....porcentagem de espermatozóides com cauda enrolada na solução
 hipo-osmótica

%sptz iso.....porcentagem de espermatozóides com a cauda enrolada na solução
 iso-osmótica.

O HOST foi realizado em dois momentos diferentes: imediatamente após a coleta de sêmen (HIPO) e antes da capacitação espermática (HIPOC).

5.13.3 Coloração com sondas fluorescentes

Colorações com substâncias fluorescentes também podem ser utilizadas para verificar a integridade da membrana espermática, uma vez que demonstram a presença de rupturas na membrana celular, decorrentes de danos sofridos pelas células (KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994).

A coloração fluorescente foi realizada de acordo com a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990), adaptada por Cunha et al. (1996) ao cão.

Os corantes utilizados nesta técnica foram o iodeto de propídeo (IP) e o diacetato de carboxifluoresceína (DCF).

O IP se liga ao DNA celular corando-o de vermelho, porém, a membrana de células íntegras é impermeável à entrada do IP, evidenciando somente células danificadas. O DCF sofre a ação de esterases não específicas no interior das células espermáticas íntegras, promovendo a visualização da coloração verde

fluorescente com o uso de microscópio de fluorescência (HARRISON; VICKES, 1990).

Uma alíquota de 10 μL de sêmen foi diluída em 40 μL da solução de trabalho (ANEXO G) preparada no momento do uso. Após 8 minutos uma gota do material foi analisada entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência⁷ com aumento de 400X e filtros B-2E/C e G-2E/C. Foram contadas 100 células, sendo consideradas integras aquelas de coloração verde fluorescente e lesadas, as células que apresentassem coloração vermelha ou vermelha e verde.

A avaliação da integridade da membrana espermática através de sondas fluorescentes foi realizada em dois momentos diferentes; antes da capacitação (FLUO 1) e após a capacitação (FLUO2).

5.13.4 Coloração tripla (*Triple stain*)

Para observar a reação acrossômica, foi utilizada a técnica de Harayama, Kusunoki e Kato (1993), que consiste na coloração tripla dos espermatozóides capacitados (ANEXO G). Esta coloração foi realizada antes e após a capacitação espermática.

Diluiu-se 300 μL da suspensão espermática em uma solução de 0,85% de NaCl, contendo 2% de “trypan blue” em volumes iguais, com posterior incubação a 37°C por 15 minutos. A seguir, a amostra foi lavada com meio CCM sem BSA por meio de centrifugação a 400g por 5 minutos, até que o sobrenadante ficasse limpo.

Após o descarte do sobrenadante da última lavagem, homogenizou-se o pellet, com 50µL de solução de glutaraldeído a 3% em CCM sem BSA incubado a 36°C em banho-maria por 20 minutos. A solução foi então lavada com CCM sem BSA por centrifugação a 400g por 5 minutos. O excesso de sobrenadante foi descartado e confeccionou-se um esfregaço com o material obtido, que foi seco a temperatura ambiente.

As lâminas foram então coradas em solução de "Bismark Brown" (0,8%) a 40°C por 5 minutos. A seguir, foram coradas em solução de Rosa Bengala (0,8%) em temperatura ambiente por 20 minutos, lavadas e secas ao ar.

Em seguida, foram desidratadas por 30 segundos em gradientes crescentes de álcool (50, 70 e 96%), lavadas com xilol e montadas com Permount®⁸. Para mensurar a viabilidade e o estado do acrossoma foram avaliadas 200 células, sob microscopia de interferência diferencial de fase com aumento de 1250 vezes.

Esta técnica de coloração possibilita a visualização de quatro padrões de coloração espermática (TALBOT; CHACON, 1981):

1. Espermatozóides vivos e intactos (classe 1, TRI-1): corados de castanho na região pós-acrossomal e de rosa no acrossomo.
2. Espermatozóides vivos com reação acrossômica (classe 2, TRI-2): corados de castanho na região pós-acrossomal e de branco no acrossomo.
3. Espermatozóides mortos com acrossomo intacto (classe 3, TRI-3): corados de azul na região pós-acrossomal e de rosa no acrossomo.
4. Espermatozóides mortos com reação acrossômica degenerativa (classe 4, TRI-4): corados de azul na região pós-acrossomal e de branco no acrossomo.

⁷ NIKON, modelo TE300

⁸ Fischer Cientific, USA

A coloração tripla foi realizada em dois momentos: antes e após a capacitação espermática.

5.13.5 Viabilidade espermática (coloração eosina-nigrosina)

A coloração de eosina-nigrosina avalia a viabilidade dos espermatozóides, uma vez que identifica os vivos e mortos. O espermatozóide morto não possui a sua membrana íntegra sendo, em decorrência, permeável à eosina, o que confere a célula um tom rosáceo.

Esta coloração foi realizada com o sêmen antes e após a capacitação, utilizando-se a metodologia proposta pela WHO (1992). Adicionou-se ao sêmen o corante (ANEXO I) na proporção 1:1. Após 3 minutos foi confeccionado um esfregaço, que foi seco ao ar. Foram contadas 200 células em microscópio com interferência diferencial de fase, e em aumento de 1250x sob imersão. Células vivas não apresentavam coloração, células mortas apresentavam coloração rósea. O resultado é expresso em porcentagem de células vivas, a viabilidade espermática.

A avaliação da viabilidade espermática foi realizada em dois momentos diferentes: antes da capacitação (EOSI 1) e após a capacitação (EOSI 2).

5.13.6 Coloração acrossomal simples

A coloração acrossomal simples (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991) avalia a integridade da membrana acrossomal. Misturou-se 10 μ L de sêmen à igual quantidade de corante (ANEXO J). Após 3 minutos fez-se um esfregaço, que foi seco ao ar. As lâminas foram lidas em microscópio com interferência diferencial de fase sob aumento de 1250x em imersão. Contaram-se 200 células e o resultado foi expresso em porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra. As células foram classificadas de acordo com o seguinte critério

- Células com membrana acrossomal íntegra (AI): apresentam uma coloração lilás na região acrossomal e levemente mais escura (azulada) na região pós-acrossomal.
- Células com membrana acrossomal não íntegra ou acrossomo ausente (AA): apresentam coloração rosa na região acrossomal e levemente mais clara na região pós-acrossomal.

A avaliação da integridade da membrana acrossomal através da coloração acrossomal simples foi realizada em dois momentos diferentes; antes da capacitação (POPE 1) e após a capacitação (POPE 2).

5.14 Avaliação do estresse oxidativo - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica pode ser mensurada através da determinação de TBARS presentes no plasma seminal. A metodologia utilizada foi descrita por Ohkawa, Onish e Yagi (1979). O método baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea, que é quantificado através de espectrofotometria num comprimento de onda de 532 nanômetros (nm). Esta reação ocorre em temperaturas entre 90 e 100°C, em pH ácido.

Alíquotas de 500 µl de plasma seminal e 1000µL de solução de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%) foram centrifugadas a 1800g por 15 minutos e à temperatura de 15°C, para que ocorresse a precipitação de proteínas. Alíquotas de 500µL do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 500µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA, 1%), dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH) 0,05N, recém preparado. Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho fervente a 100°C por 10 minutos e resfriados depois em banho de gelo a 0°C.

Os TBARS foram quantificados em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão feita com malondialdeído .

O malondialdeído (MDA) é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a concentração dos TBARS é determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} \text{ mL}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído

(BUEGE; AUST, 1978). A peroxidação lipídica no sêmen é expressa em nanogramas de TBARS/mL de sêmen.

5.15 Enzimas anti-oxidantes

As alterações no metabolismo oxidativo foram estudadas determinando-se a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Todas as determinações foram realizadas em espectrofotômetro nas temperaturas e comprimentos de onda recomendados para cada enzima.

5.15.1 Catalase (E.C. 1. 11. 1. 6)

A atividade da catalase é determinada avaliando-se o consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante 8 minutos, pela leitura espectrofotométrica a 230nm e 30°C (BEUTLER, 1975). O meio de reação deve conter 10 μ L de plasma seminal, tampão Trisaminometano/EDTA (concentração final 50mM e 250mM, respectivamente), pH 8,0 e 900 μ M de H_2O_2 (concentração final de 9,0mM).

Os cálculos consideram o valor 0,071M⁻¹cm⁻¹ como coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ($^{\epsilon} H_2O_2$) :

A concentração da catalase expressa-se em ng/mL de plasma seminal.

5.15.2 Superóxido dismutase (E.C. 1. 15. 1. 1)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) é medida indiretamente através da taxa de redução do citocromo c pelo ânion superóxido (O^{2-}) controlada por 5 minutos. O sistema xantina-xantina oxidase é empregado como gerador contínuo de O^{2-} . Este O^{2-} causa redução do citocromo c.

A SOD total presente na amostra compete com o citocromo c pelo O^{2-} e a atividade da SOD total é medida indiretamente, determinando-se a taxa de diminuição da redução do citocromo c (FLOHÉ; ÖTTING, 1984).

O meio de reação deve conter citocromo c ($1\mu M$), xantina ($50\mu M$), EDTA ($100\mu M$) e tampão fosfato de sódio ($50\mu M$, pH 7,8). Realiza-se a adequação da atividade da enzima xantina oxidase necessária para a geração de O^{2-} e redução do citocromo c em 0,025 unidades de absorbância por minuto, pois 1 unidade de atividade da SOD total corresponde a 50 % deste valor. O ensaio é realizado a 550nm e 25°C.

Uma unidade de SOD corresponde a 0,0125 unidades de absorbância/ minuto e portanto, x unidades de SOD na amostra corresponderão a (variação na absorbância da amostra - 0,025).

$$x \text{ unidades de SOD na amostra} = (\text{variação na absorbância da amostra} - 0,025) / 0,0125 \times \text{diluições}$$

A concentração da SOD expressa-se em ng/mL de plasma seminal.

5.15.3 Glutathione peroxidase (E.C. 1. 11. 1. 9)

A atividade da glutathione peroxidase (GSPH-Px) foi determinada através da adaptação do método de Wendel (1981) e Mannervik (1985). O método consiste em medir-se o consumo de NADPH.

Provoca-se a reação de um hidroperóxido com glutathione reduzida (GSH), catalisada por GSH-Px em acoplamento com a enzima glutathione redutase (GSSGr), que converte o dissulfeto de glutathione (GSSH - glutathione oxidada) formando GSH e consumindo NADPH, o que pode ser controlado espectrofotometricamente.

Foram utilizados como reagentes: NADPH (0,12 mM), GSH (1mM), GSSGr (0,25U/ mL) e azida sódica (NaN₃) (0,25 mM). O volume de 1 mL da cubeta foi completado com tampão fosfato 143 mM, EDTA 6,3 mM, pH 7,5, o qual também foi empregado para solubilizar o NADPH. A GSH foi solubilizada em solução de ácido metafosfórico a 5 %, por ser mais estável. A azida sódica foi empregada para inibir a ação da catalase.

Esta reação inicia-se com a adição de 1,2 mM de ter-butil hidroperóxido (TBHP) e o consumo de NADPH foi registrado, controlando-se a absorbância por 10 minutos a 37°C e 340 nm.

Os resultados são expressos em ng/mL de plasma seminal.

5.16. Proteína total do plasma seminal

A concentração de proteínas no plasma seminal foi determinada segundo a metodologia de Lowry et al. (1951).

Este método baseia-se no princípio de que em solução alcalina, forma-se um complexo entre a proteína e o cobre. Este complexo reduz o reagente de Folin formando um composto colorido azul, mensurado no espectrofotômetro.

Para o preparo da amostra misturou-se 10µL de plasma seminal à 990µL de solução de NaOH 0,1N. Retirou-se 500µL desta mistura, adicionou-se 2,5mL de “Alkaline Cooper Reagent” (ANEXO K). Imediatamente após, homogenizou-se a amostra em vórtex e então a mistura descansou em temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, adicionou-se 0,25mL de reagente de Folin diluído (1:1 em água destilada e preparado no momento do uso) e utilizou-se o vórtex novamente. Após 30 minutos à temperatura ambiente realizou-se a leitura por espectrofotometria em um comprimento de onda de 660nm.

A concentração de proteína é dada em ng de proteína/mL de plasma seminal.

5.17 Delineamento experimental

Este foi um experimento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial (2x2, com e sem estresse X com e sem suplementação em vitamina E) de tratamentos.

Com o intuito de se aumentar o número de unidades experimentais, realizaram-se 2 períodos de tratamento. No início de cada período os animais foram sorteados aleatoriamente a cada um dos grupos experimentais (item 4.2), para garantir a homogeneidade entre os grupos.

5.17.1 Períodos experimentais

O presente experimento realizou-se no período de junho a dezembro do ano de 2001. Foi composto de dois períodos experimentais subseqüentes (Período 1: julho/agosto/setembro; Período 2: outubro/novembro/dezembro). Cada período durou 77 dias e foi dividido da seguinte maneira: 7 dias para a realização do padrão espermático dos animais, 7 dias de suplementação exclusiva de vitamina E⁹, 7 dias de aplicação de dexametasona (DXO) e 56 dias restantes referentes ao tempo necessário para que se completasse um ciclo espermato gênico¹⁰ (Figura 7). Durante o mês de junho foi realizada a avaliação clínica e sanitária dos animais.

Figura 7 - Esquema da composição do período experimental

⁹ A suplementação de vitamina E iniciou-se 1 semana antes da aplicação de dexametasona e terminou no último dia do período experimental.

¹⁰ No cão cada ciclo do epitélio seminífero tem duração de 13,6 dias, sendo necessários quatro ciclos do epitélio seminífero para que se complete um ciclo espermato gênico, portanto, um ciclo espermato gênico completo dura em média 54,4 dias (JOHNSON et al, 2000; PURSWELL; FREEMAN, 1993).

Para determinação dos padrões seminais normais de cada animal, utilizaram-se os valores observados na semana anterior (PRE) à semana de suplementação com a vitamina E (SUPLE).

Entre o primeiro e o segundo período experimental, permitiu-se um intervalo de 15 dias sem suplementação de vitamina E, para se evitar qualquer efeito residual decorrente da suplementação vitamínica, embora Vézina et al. (1996) tenham observado que os efeitos da suplementação de vitamina E são suplementação-dependente, ou seja, todos os parâmetros observados retornaram aos valores pré-tratamento após o término da suplementação. Após estes 10 dias de repouso, foram contados mais 20 dias, de modo semelhante ao realizado no período 1.

5.18 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem à estas premissas eram transformados (logaritmo na base 10 - $\log_{10}X$; Raiz quadrada - $\sqrt{X}$; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregados as médias e os erros padrões (média $\pm$ erro padrão) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais.

Com exceção dos valores de cortisol e testosterona plasmática e os referentes ao sêmen congelado, os valores utilizados representam uma média dos dados obtidos nas duas coletas semanais de sêmen.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta. As variáveis classificatórias utilizadas foram estresse (Sim e Não), suplementação com vitamina E (Sim e Não), período (1 e 2) e semana (PREV, SUPLE, DXO, SE1, SE2, SE3, SE4, SE5, SE6, SE7, SE8).

As variáveis resposta foram: cortisol plasmático (CORT), testosterona plasmática (TESTO), escore corporal (EC), consistência testicular (ESC), volume do ejaculado (VOL), motilidade espermática (MOT), vigor espermático (VIG), pH seminal (PH), densidade do ejaculado (DENS), concentração espermática (CONC), porcentagem de defeitos maiores (DEFMA), porcentagem de defeitos menores (DEFME), porcentagem de defeitos totais (DEFTOT), porcentagem de células com membrana íntegra pelo HOST (HIPO), porcentagem de células viáveis (EOSI), porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra (POPE), porcentagem de células vivas e com integridade acrossomal (TRI), concentração de TBARS (MDA), concentração de catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD), glutational peroxidase, (GPx) e proteínas totais presentes no plasma seminal (PROT).

As variáveis resposta foram analisadas através da correlação de Pearson (PROC CORR), sendo os resultados expressos através do coeficiente de correlação

de Pearson (r) e seu nível de significância (p). Para a análise de correlação, as variáveis referentes às anormalidades espermáticas foram analisadas uma a uma e classificadas em defeitos maiores, menores e totais (OETTLÉ; SOLEY, 1988).

Na análise de variância, foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias estresse (STRESS), suplementação com vitamina E (VitE), período (PER) e semana (SEM) e as interações: estresse*vitaminaE (STRESS*VitE), estresse*vitaminaE*período (STRESS*VitE*PER), estresse*vitaminaE*semana (STRESS*VitE*SEM) e estresse*vitaminaE*semana*período (STRESS*VitE*SEM*PER). As demais interações duplas e triplas não foram analisadas, uma vez que as informações fornecidas por estas interações tinham pouco interesse neste estudo e os graus de liberdade à elas designados foram incluídos nos graus de liberdade do resíduo.

As variáveis resposta cortisol e testosterona plasmáticos foram analisadas de duas maneiras, pois foram coletadas de dois modos diferentes. A primeira análise (avaliação da variação diária) foi feita nas amostras colhidas durante os dois período de coleta de 24 horas, perfazendo um total de 8 amostras (tempo) por colheita. Neste caso, avaliou-se também o efeito de colheita (COL, antes e após a semana de aplicação de dexametasona), de tempo (TEMP) e suas interações com as demais variáveis classificatórias. A segunda análise, proveniente dos dados obtidos semanalmente, avaliou a variação hormonal durante todo o período experimental e foi feita de modo semelhante às demais variáveis resposta.

O quadro 1 ilustra qual o comportamento das variáveis resposta bem como as transformações utilizadas para que elas apresentassem um comportamento paramétrico.

Tipo	Transformação	Variável resposta
Paramétrico	Nenhuma	<ul style="list-style-type: none"> - Escore corporal (EC), - Consistência do testículo esquerdo (ESCTE) - Motilidade pós descongelamento (MOT 0) - HOST pós descongelamento (HIPOC) - POPE pré capacitação (POPE 1) - Classes 3 e 4 da coloração tripla após a capacitação espermática (TRI 3-2 e TRI 4-2)
	Elevado ao quadrado	<ul style="list-style-type: none"> - Consistência do testículo direito (ESCTD) - Densidade do ejaculado (DENS)
	Logaritmo na base 10	<ul style="list-style-type: none"> - Concentração de TBARs (MDA) - Coloração fluorescente pós capacitação espermática (FLUO 2) - Viabilidade espermática pré e pós capacitação espermática (EOSI 1 e EOSI 2) - POPE pós capacitação espermática (POPE 2)
	Raiz quadrada	<ul style="list-style-type: none"> - Concentração plasmática de testosterona (TESTO) - Concentração de proteína (PROT) - Coloração fluorescente pré capacitação espermática (FLUO 1) - Classes 1 e 2 da coloração tripla pré capacitação espermática (TRI 1-1 e TRI 2-1)
	Elevado à -1	<ul style="list-style-type: none"> - Concentração plasmática de cortisol (CORT) - pH seminal (pH)
	VAR**-2	<ul style="list-style-type: none"> - Vigor espermático pós descongelamento (VIG 0)
Não Paramétrico		<ul style="list-style-type: none"> - Volume do ejaculado (VOL), - Motilidade espermática (MOT), - Vigor espermático (VIG), - Concentração espermática (CONC) - Porcentagem de defeitos maiores (DEFMA), menores (DEFME) e totais (DEFTOT) - HOST (HIPO), - Concentração de glutathione peroxidase (GLUT) - Concentração de superóxido desmutase (SOD) - Motilidade espermática pré e pós capacitação espermática (MOT 1 e MOT 2) - Vigor espermático pré e pós capacitação espermática (VIG 1 e VIG 2) - Classes 3 e 4 da coloração tripla pré capacitação espermática (TRI 3-1 e TRI 4-1) - Classes 1 e 2 da coloração tripla pós capacitação espermática (TRI 1-2 e TRI 2-2)

Quadro 1 – Classificação das variáveis resposta e as transformações utilizadas

As variáveis paramétricas foram analisadas através da análise de variância (ANAVA).

As variáveis resposta não-paramétricas, foram analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Nestes casos utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos, sendo os efeitos das variáveis classificatórias e de suas interações, verificadas separadamente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a discussão, os resultados foram divididos em 5 grupos: avaliações hormonais, avaliação física dos animais, avaliação do ejaculado, avaliação do sêmen congelado e correlações.

6.1 Avaliações hormonais

Os parâmetros hormonais avaliados foram o nível plasmático de cortisol (CORT) e de testosterona (TESTO). O nível de cortisol foi utilizado como um dos indicativos do sucesso do protocolo de indução de estresse proposto por Barth (1993), e para caracterizar o quadro de estresse. O nível de testosterona plasmática serviu para avaliar a interação entre os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gonadal.

Devido a problemas na aquisição dos conjuntos diagnósticos, somente foram realizadas as dosagens hormonais do primeiro período experimental. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, se a variação entre as duplicatas fosse superior a 20% a amostra era novamente quantificada.

6.1.1 Cortisol plasmático

Para o processamento das amostras na determinação do cortisol plasmático foram necessários 6 ensaios. Os coeficientes de variação (CV) intra e inter ensaio da quantificação do cortisol plasmático, encontram-se no quadro 2.

Ensaio	Sensibilidade % (dose*)	CV Intra Baixo (%)	CV Intra Alto (%)
1	97,7 (0,1)	9,75	2,95
2	98,6 (0,07)	18,28	2,99
3	97,7 (0,1)	3,84	2,99
4	97,7 (0,1)	9,77	1,01
5	98,7 (0,6)	12,72	9,97
6	97,7 (0,1)	2,96	2,79
CV Inter ensaio		1,42	0,33

* dose mínima (ng/dL) detectada pelo ensaio.

Quadro 2 – Sensibilidade (%) e dose mínima detectável (ng/dL) do conjunto diagnóstico e coeficiente de variação (CV, %) intra e inter ensaio da quantificação de cortisol plasmático de cães da raça rotweiller submetidos ao estresse e à suplementação com vitamina E

Com exceção dos ensaios 2 e 5, os CV intra ensaio permaneceram abaixo de 10%, garantindo que não houveram variações na pipetagem das amostras, e que o erro humano devido ao procedimento de pipetagem foi mínimo. O CV inter ensaio também foi baixo, demonstrando que as variações entre os ensaios foram pequenas.

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a variação diária nas concentrações plasmáticas de cortisol antes e após a

aplicação de dexametasona, observou-se que houve efeito de estresse ($p < 0,0001$), da coleta ($p < 0,0001$), do tempo ($p = 0,0009$) e da interação estresse*coleta ($p < 0,0001$).

O efeito estatístico significativo da interação estresse*coleta indica que o protocolo proposto por Barth (1993) mostrou-se eficiente para a indução do estresse em cães, uma vez que os valores obtidos antes da aplicação diferiram dos obtidos após a aplicação.

O aumento no nível plasmático de cortisol é um indicativo comumente utilizado para a caracterização dos quadros de estresse (BARTH, 1993; BEERDA, et al, 1997). No cão, o cortisol é o primeiro glicocorticóide secretado (BEERDA, et al., 1997, 1999). Entretanto, esse aumento na secreção pode ou não ser mantido (BEERDA, et al., 1999).

Tabela 1 – Efeito do protocolo de indução de estresse (antes e depois da aplicação de DXO) sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do nível plasmático de cortisol (ng/dL, CORT) de cães da raça rotweiller dos grupos com (tratamento) e sem estresse (controle)

Com estresse (Tratamento)			Sem estresse (Controle)		
Antes da aplicação de DXO	Após a aplicação de DXO	p^*	Antes da aplicação de DXO	Após a aplicação de DXO	p^{**}
1,60±0,07	0,40±0,01	<0,001	1,50±0,09	1,79±0,11	0,2231

*referente à comparação entre os animais com estresse antes e após a semana de aplicação de DXO

** referente à comparação entre os animais sem estresse antes e após a semana de aplicação de DXO

Os animais do grupo controle (T_3 e T_4), que receberam a aplicação de placebo ao invés de DXO, não apresentaram alteração no nível plasmático de cortisol (Tabela 1).

A dexametasona (DXO) é um glicocorticóide sintético que, como os corticosteróides naturais (ex.: cortisol), promove uma inibição da liberação do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Este efeito ocorre devido ao fato de que altos níveis de glicocorticóides exercem efeitos inibitórios sobre a hipófise, refletindo-se diretamente sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (FELDMAN; WEIDENFELD, 1995).

Quando há excesso de estímulo, a hipófise pode se tornar resistente ao ACTH diminuindo assim a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) (TIZABI; AGUILERA, 1992) e conseqüentemente a liberação de cortisol, através de um “feed-back” negativo (FELDMAN; WEIDENFELD, 1995).

Beerda et al. (1999) também observaram diminuição nos níveis plasmáticos de cortisol após a aplicação de dexametasona, entretanto, esta diminuição não foi considerada como um efeito supressor decorrente da aplicação de dexametasona. Estes autores utilizaram a mesma dose deste experimento (0,01mg dexametasona/kg peso vivo), porém em uma única aplicação.

De acordo com Suárez et al. (1996) a resposta do eixo hipotálamo-adrenal é reduzida depois de repetidas exposições a um mesmo agente agressor. O protocolo utilizado estabelecia um total de 7 aplicações consecutivas, e talvez, para cães, este seja um estímulo muito intenso.

Segundo Roberti (2003), homens submetidos ao estresse psico-social (falar em público) durante 4 dias seguidos apresentaram altos níveis de cortisol no primeiro dia após a exposição ao agente estressor. Contudo, observou-se uma diminuição dos níveis de cortisol nos dias subseqüentes, e no quarto dia já não se observava diferença significativa.

Diferenças individuais podem refletir uma grande variabilidade de respostas ao estresse, dificultando a sua identificação e caracterização. Os efeitos da raça, idade, sexo e a experiência prévia dos animais, são fatores ignorados na maioria dos estudos e que possuem extrema influência sobre o grau da resposta do animal ao agente estressor (BEERDA et al., 1997; KUBOKAWA et al., 1999; ROBERTI, 2003).

Baptista Sobrinho (2002) observou que o nível plasmático de cortisol de cães sem estresse foi de $1,094 \pm 0,913$ ng/dL (média e desvio padrão), valor este inferior ao encontrado neste trabalho (Tabela 1), para os animais que não receberam DXO.

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre o nível de cortisol plasmático durante o dia observou-se também uma tendência ($p=0,0778$) de efeito da interação estresse*coleta*tempo. Indicando que pode haver diferença na secreção de cortisol durante as 24 horas, do dia e que esta diferença é observada antes e após a aplicação de dexametasona.

Beerda et al. (1999) relatam que em cães há uma maior secreção de cortisol no período da manhã. Entretanto, Baptista Sobrinho (2002) não observou variações na secreção de cortisol durante o dia.

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre o nível plasmático de cortisol ao longo do período experimental, observou-se efeito da semana ($p<0,0001$) e das interações estresse*vitamina E ($p=0,0191$) e estresse*vitamina E*semana ($p<0,0001$).

Tabela 2 – Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) do nível plasmático de cortisol (ng/dL) de cães da raça rotweiler durante as semanas

	Com vitamina E			Sem vitamina E			<i>p</i> ***
	Com	Sem Stress	<i>p</i> *	Com	Sem	<i>p</i> **	
	Stress (1)	(3)		Stress (2)	Stress (4)		
Prev ¹	1,74±0,33	1,63±0,27	0,8020	1,97±0,35	1,44±0,40	0,2576	0,6955
Suple ²	1,57±0,11	1,58±0,25	0,8287	1,62±0,15	1,39±0,15	0,2876	0,8243
DXO ³	0,42±0,02	1,65±0,27	0,0001	0,38±0,01	1,97±0,27	<0,0001	<0,0001
SE1 ⁴	0,96±0,18	0,97±0,11	0,8403	1,09±0,18	1,43±0,32	0,3807	0,4043
SE2 ⁴	1,36±0,24	0,94±0,14	0,1972	1,09±0,10	1,62±0,47	0,3926	0,4059
SE3 ⁴	1,47±0,29	1,35±0,30	0,7603	1,03±0,11	1,77±0,30	0,0427	0,2743
SE4 ⁴	1,66±0,40	0,96±0,17	0,1541	1,91±0,54	2,07±0,66	0,8718	0,2495
SE5 ⁴	2,66±0,67	2,33±0,51	0,8189	2,04±0,17	1,55±0,18	0,1040	0,4758
SE6 ⁴	1,96±0,58	1,19±0,10	0,1932	1,25±0,23	1,84±0,11	0,0513	0,1534
SE7 ⁴	1,66±0,33	1,69±0,20	0,7813	1,73±0,32	2,10±0,33	0,3879	0,7086
SE8 ⁴	1,34±0,25	0,74±0,03	0,0223	1,25±0,18	0,79±0,08	0,0737	0,0255

*referente à comparação entre com e sem estresse dos animais suplementados com vitamina E

**referente à comparação entre com e sem estresse dos animais não suplementados com vitamina E

***referente ao efeito de tratamento (1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação)

1...Prev...semana prévia

2...Suple...semana de suplementação

3...DXO...semana de aplicação da DXO

4...SE...semana

Tanto os animais suplementados quanto os não suplementados, apresentaram diferenças entre os tratamentos na semana DXO e na semana SE8 (Tabela 2).

Tabela 3 – Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) do nível plasmático de cortisol (ng/dL) de cães da raça rotweiller durante as semanas

	Com estresse			Sem estresse			p^{***}
	Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}	
	(1)	(2)		(3)	(4)		
Prev ¹	1,74 $\pm$ 0,33	1,97 $\pm$ 0,35	0,6066	1,64 $\pm$ 0,27	1,44 $\pm$ 0,40	0,6835	0,6955
Suple ²	1,57 $\pm$ 0,11	1,62 $\pm$ 0,15	0,8181	1,58 $\pm$ 0,25	1,39 $\pm$ 0,15	0,7055	0,8243
DXO ³	0,42 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,01	0,0883	1,65 $\pm$ 0,27	1,97 $\pm$ 0,27	0,3928	<0,0001
SE1 ⁴	0,96 $\pm$ 0,18	1,09 $\pm$ 0,18	0,5412	0,97 $\pm$ 0,11	1,43 $\pm$ 0,32	0,1909	0,4043
SE2 ⁴	1,36 $\pm$ 0,24	1,09 $\pm$ 0,10	0,4720	0,94 $\pm$ 0,14	1,62 $\pm$ 0,47	0,2068	0,4059
SE3 ⁴	1,47 $\pm$ 0,29	1,03 $\pm$ 0,11	0,2074	1,35 $\pm$ 0,30	1,77 $\pm$ 0,30	0,3137	0,2743
SE4 ⁴	1,66 $\pm$ 0,40	1,91 $\pm$ 0,54	0,7342	0,96 $\pm$ 0,17	2,07 $\pm$ 0,66	0,0847	0,2495
SE5 ⁴	2,66 $\pm$ 0,67	2,04 $\pm$ 0,17	0,6258	2,33 $\pm$ 0,51	1,55 $\pm$ 0,18	0,2070	0,4758
SE6 ⁴	1,96 $\pm$ 0,58	1,25 $\pm$ 0,23	0,2458	1,19 $\pm$ 0,10	1,84 $\pm$ 0,11	0,0052	0,1534
SE7 ⁴	1,66 $\pm$ 0,33	1,73 $\pm$ 0,32	0,8567	1,69 $\pm$ 0,20	2,10 $\pm$ 0,33	0,2992	0,7086
SE8 ⁴	1,34 $\pm$ 0,25	1,25 $\pm$ 0,18	0,8403	0,74 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,08	0,6189	0,0255

*referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais estressados

**referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais sem estresse

***referente ao efeito de tratamento (1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação)

1...Prev...semana prévia

2...Suple...semana de suplementação

3...DXO...semana de aplicação da DXO

4...SE...semana

Em humanos, cães, ratos e trutas observam-se grandes diferenças individuais na resposta neuroendócrina ao agente estressor (BEERDA, et al., 1999; KUBOKAWA et al., 1999; ROBERTI, 2003; SURAI et al., 1996). A intensidade de resposta ao agente estressor possibilita a divisão dos indivíduos em dois grandes grupos: indivíduos com alta resposta e indivíduos com baixa resposta ao estresse (ROBERTI, 2003). Além da variabilidade na resposta individual ao agente estressor

observa-se também que indivíduos do sexo masculino são mais responsivos ao estresse do que os do sexo feminino (KUBOKAWA et al., 1999; ROBERTI, 2003). E esta grande variabilidade individual na intensidade de resposta aos estímulos estressores dificulta a formação de um grupo experimental homogêneo.

Retana-Márquez et al. (2003) avaliaram o efeito agudo e crônico de 3 diferentes fontes de estresse (imobilização, choque elétrico e imersão em água fria) em ratos. Os autores observaram que a resposta neuroendócrina é dependente do tipo de estímulo e que alguns estímulos não promovem a elevação nos níveis de cortisol.

Baptista Sobrinho (2002) observou que cães machos rotweiller submetidos ao estresse de trabalho apresentavam valores médios de $1,376 \pm 0,800$ ng/dL (média e desvio padrão) para o nível plasmático de cortisol. Este é um valor bastante próximo aos encontrados neste trabalho (Tabela 3) indicando que o estresse de trabalho e o estresse induzido pela aplicação de DXO estimulam de maneira semelhante o sistema neuroendócrino.

Observou-se a elevação de cortisol na semana 5 (SE5) nos animais experimentais. Isto deve ser resultado do fato de que esta semana coincidiu com a semana de 7 de setembro. Os animais foram alojados em um quartel militar, e nesta semana houve grande movimentação decorrente das preparações para a comemoração desta data. Esta mudança no ambiente pode ser considerada como um agente estressor para os animais. Este achado demonstra que a capacidade de resposta da adrenal aos estímulos estressantes foi mantida, mesmo nos animais que receberam dexametasona, indicando que a supressão provocada pelo protocolo experimental de indução de estresse (Tabela 1) não foi permanente.

6.1.2 Testosterona plasmática

Para o processamento de todas as amostras da determinação da testosterona plasmática foram necessários 4 ensaios. Os coeficientes de variação (CV) intra e inter ensaio das quantificações de testosterona plasmática encontram-se no quadro 3.

Ensaio	Sensibilidade % (dose*)	CV Intra Baixo (%)	CV Intra Alto (%)
1	92,2 (1,08)	8,31	6,20
2	91,9 (1,06)	2,74	2,62
3	92,5 (0,93)	1,58	2,50
4	93,0 (0,94)	10,05	1,15
CV Inter ensaio		0,58	0,43

* dose mínima (ng/dL) detectada pelo ensaio hormonal

Quadro 3 – Sensibilidade (%) e dose mínima detectada pelo conjunto diagnóstico e coeficiente de variação (CV) intra e inter ensaio da quantificação de testosterona plasmática de cães da raça rotweiler submetidos ao estresse e a suplementação com vitamina E

Os valores de CV intra ensaio permaneceram abaixo de 10%, indicando que não houve variações na pipetagem das amostras, ou seja, que o erro humano foi mínimo. O CV inter ensaio também foi baixo, demonstrando que as variações entre os ensaios foi mínima.

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a variável resposta testosterona plasmática (TESTO), avaliada durante o período de 24 horas, foi possível demonstrar efeito da interação estresse*coleta*tempo ($p=0,0028$) o que indica que o nível de testosterona variou

durante as 24 horas de coleta e ainda, que esta variação foi diferente antes e após a aplicação de DXO.

O pico de TESTO ocorreu pela manhã e a vitamina E não interferiu no momento e na intensidade de pico.

Os valores encontrados para testosterona plasmática (Tabela 4 e 5) são semelhantes aos observados por Kawakami et al. (1998), que avaliaram animais saudáveis após a maturação sexual. Estes autores observaram uma variação diária na secreção deste hormônio, o que foi comprovada neste experimento.

Barth e Bowman (1994) não observaram alterações diárias nos níveis de testosterona em touros, porém a aplicação de DXO promoveu uma redução ($p < 0,05$) nos níveis séricos de testosterona.

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias sobre o comportamento do nível plasmático de testosterona durante o período experimental observou-se efeito da semana ($p < 0,0001$).

Na semana 6 (SE6) observou-se uma diminuição dos níveis séricos de testosterona (Tabela 4), o que pode ser explicada pelo aumento de cortisol produzido durante a semana do 7 de setembro (SE5, Tabela 3). Esta redução está de acordo com os achados de literatura (BARTH, 1993; BARTH; BOWMAN, 1994; KUBOKAWA, 1999).

Tabela 4 – Efeito da semana sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do nível plasmático de testosterona (ng/dL) de cães da raça rotweiller durante o primeiro período experimental

Semana	Testosterona
Prev ¹	140,73±26,22 ^D
Suple ²	216,31±16,02 ^{BCD}
DXO ³	232,86±14,21 ^{BCD}
SE1 ⁴	312,55±26,05 ^B
SE2 ⁴	267,39±25,30 ^{BC}
SE3 ⁴	374,74±55,42 ^{AB}
SE4 ⁴	535,96±62,05 ^A
SE5 ⁴	232,42±43,54 ^{BCD}
SE6 ⁴	167,54±26,12 ^{CD}
SE7 ⁴	226,25±29,27 ^{BCD}
SE8 ⁴	237,91±29,11 ^{BCD}

A,B,C...letras diferentes numa mesma coluna indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tuckey, $\alpha=5\%$

1...Prev...semana prévia

2...Suple...semana de suplementação

3...DXO...semana de aplicação da DXO

4...SE...semana

Retana-Márquez et al. (2003) observaram que a intensidade dos efeitos do estresse sobre o nível plasmático de testosterona é dependente do agente estressor. Em geral, observa-se uma diminuição logo após a exposição, seguida de um aumento nos níveis plasmáticos de testosterona. Todavia, segundo os autores, ratos submetidos ao estresse crônico de imobilização não apresentaram diminuição nos níveis de testosterona, o que parece sugerir que o estresse prolongado provavelmente atua de maneira diferente sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

Entretanto, neste experimento observou-se o inverso, um aumento dos níveis séricos de testosterona. Como este aumento foi observado em todos os animais (não houve efeito de tratamento) não se pode afirmar que o nível plasmático de testosterona foi influenciado pela administração de DXO (fator estressante), mas sim, pelo manejo aos quais os animais foram submetidos durante o protocolo de indução de estresse.

Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão da média do nível plasmático de testosterona (ng/dL) de cães da raça rotweiler segundo o tratamento

Tratamento	Estresse	Vitamina E	Média $\pm$ erro padrão
1	Sim	Sim	305,54 $\pm$ 29,36 ^A
2	Sim	Não	261,58 $\pm$ 25,66 ^A
3	Não	Sim	257,77 $\pm$ 25,04 ^A
4	Não	Não	244,28 $\pm$ 19,27 ^A

A, B, C...letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença ($p < 0,05$) segundo o teste de Tuckey

A suplementação com vitamina E não alterou os níveis plasmáticos de testosterona (Tabela 5). Rekkas et al. (2000) não observaram alterações nos níveis séricos de testosterona de carneiros decorrentes da suplementação com vitamina E, tanto na primavera quanto no outono, que é a estação de cobertura das ovelhas no hemisfério norte.

Kubokawa et al. (1999) observaram uma relação inversa entre cortisol e testosterona em salmão macho. O estresse de confinamento promoveu um aumento nos níveis de cortisol associado a uma redução dos níveis de testosterona.

Di Luigi et al. (2002) observaram que homens submetidos ao estresse de treinamento apresentaram menores concentrações plasmáticas de testosterona e testosterona livre circulante, quando comparados a homens sedentários.

Em machos, a supressão da testosterona durante o estresse tem sido atribuída ao aumento dos níveis de corticosteróides e a administração exógena de corticosteróides pode suprimir os andrógenos circulantes (COLBORN et al., 1991). Porém Retana-Márquez et al. (2003) observaram que a administração de diferentes doses de corticosterona em ratos machos, com experiência sexual prévia, durante 4 ou 8 dias consecutivos não diminuiu os níveis de testosterona.

A variação nos efeitos do estresse sobre o nível plasmático de testosterona pode ser explicada pela grande variedade de estímulos utilizados. Todavia, como esta hipótese não explica completamente os resultados obtidos, o mecanismo pelo qual o estresse interfere na secreção de testosterona têm sido continuamente estudado.

A hipótese mais aceita a respeito do efeito do estresse sobre os níveis hormonais considera que a redução dos níveis plasmáticos de testosterona provocada pelos glicocorticóides deve-se à redução nas enzimas esteroidogênicas presentes nas células de Leydig (JAKOBOVITS; SZEKERES, 2002). Entretanto Retana-Márquez et al (2003) sugerem que outros mecanismos, possivelmente envolvendo o CRH e opióides, especificamente as β -endorfinas, podem estar envolvidos na diminuição da testosterona em animais estressados.

6.2 Avaliação física dos animais

Consideraram-se os parâmetros peso, consumo, escore corporal (EC) e a consistência testicular na avaliação física dos animais.

6.2.1 Peso

O peso dos animais não diferiu entre os tratamentos ($p>0,05$).

Yousef, Abdallah e Kamel (2003) verificaram que em coelhos a suplementação oral com vitamina E ou a sua associação com o ácido ascórbico promoveram um aumento, de 24,5% e 16,9% respectivamente, no ganho de peso corpóreo, porém este aumento não foi significativo ($p>0,05$).

Shetaewi (1998) avaliou o efeito da suplementação com vitamina E e C em coelhos Nova Zelândia e Califórnia. Este autor observou que a suplementação com vitamina E aumentou o ganho de peso corpóreo ($p<0,05$).

Baptista Sobrinho (2002) verificou que cães da raça rotweiller submetidos ao estresse de treinamento apresentaram um aumento do peso corpóreo com relação aos animais controle. Entretanto, o autor afirma que este aumento do peso corpóreo pode ser explicada por dois fatos, os animais tratados apresentavam um maior peso inicial, além disso os animais tratados foram submetidos a uma carga intensa de exercícios o que levaria à um ganho de massa muscular.

6.2.2 Consumo alimentar

O consumo alimentar não diferiu entre os grupos. Com algumas exceções, não foram observadas sobras na quantidade de ração oferecida.

Yousef, Abdallah e Kamel (2003) verificaram que a suplementação oral com ácido ascórbico, vitamina E ou a sua combinação promoveu um aumento significativo ($p<0,05$) na ingestão de matéria seca em coelhos.

Por outro lado, Shetaewi (1998) observou que a suplementação com vitamina E e C em coelhos Nova Zelândia e Califórnia diminuiu ($p<0,05$) a ingestão alimentar em 3%.

Se neste trabalho a ração fosse oferecida “ad libitum”, talvez observássemos diferenças no consumo entre os animais suplementados ou não com vitamina E.

6.2.3 *Escore corporal*

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a variável escore corporal (EC), observou-se uma tendência ao efeito da interação estresse*vitamina E ($p=0,0973$) e efeito de período ($p=0,0213$) e da interação estresse*vitamina E*período ($p<0,001$), por isso analisou-se cada período separadamente.

No período 1 somente foi possível detectar efeito estatístico da vitamina E ($p<0,0001$). Os animais não suplementados apresentaram um maior escore corporal médio de $3,60 \pm 0,02$ contra $3,39 \pm 0,19$ dos animais suplementados.

No período 2 demonstrou-se efeito estatístico da vitamina E ($p<0,0001$) e da interação estresse*vitamina E ($p=0,0005$).

Tabela 6 – Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do escore corporal (EC, 1-5) de cães da raça rotweiller durante o segundo período experimental

Com vitamina E			Sem vitamina E		
Com Stress	Sem Stress	p^*	Com Stress	Sem Stress	p^{**}
3,61 $\pm$ 0,03	3,48 $\pm$ 0,05	0,0172	3,28 $\pm$ 0,03	3,38 $\pm$ 0,03	0,0102

*referente à comparação entre com e sem estresse dos animais suplementados com vitamina E

** referente à comparação entre com e sem estresse dos animais não suplementados com vitamina E

A redução esperada no EC dos animais estressados foi evitada com a suplementação de vitamina E (Tabela 6). Nos animais não suplementados o estresse promoveu uma redução no EC, corroborando os achados de Case, Carey e Hirakawa (1995).

Tabela 7 – Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do escore corporal (EC, 1-5) de cães da raça rotweiller durante o segundo período experimental

Com Estresse			Sem Estresse		
Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
3,61 $\pm$ 0,03	3,28 $\pm$ 0,03	<0,0001	3,48 $\pm$ 0,05	3,38 $\pm$ 0,03	0,0692

*referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais com estresse

** referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais sem estresse

A vitamina E promoveu um aumento no escore corporal, tanto dos animais estressados, quanto dos não estressados, sendo que nos estressados esse aumento foi significativo (Tabela 7).

Shetaewi (1998) observou que, em coelhos, a suplementação com vitamina E aumentou a eficiência alimentar em 14% ($p < 0,05$). O aumento na eficiência alimentar poderia explicar o aumento do EC dos animais suplementados, uma vez que o consumo não foi *ad libitum*.

Baptista Sobrinho (2002) não observou efeito do estresse de trabalho sobre o escore corporal de cães.

6.2.4 Consistência testicular

Os testículos direito (ESCTD) e esquerdo (ESCTE) foram avaliados separadamente quanto à variável consistência testicular.

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a variável consistência do testículo direito (ESCTD) observou-se efeito de período ($p=0,0044$) e das interações estresse*vitamina E ($p=0,0211$) e estresse*vitamina E*período ($p<0,0001$).

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a variável consistência do testículo esquerdo (ESCTE) observou-se efeito de estresse ($p=0,0003$), do período ($p=0,0074$), da interação estresse*vitamina E ($p=0,0409$) e estresse*vitamina E*período ($p<0,0001$).

Como se demonstrou efeito estatístico significativo da interação estresse*vitamina E*período nas variáveis ESCTD e ESCTE procedeu-se à análise de cada período separadamente.

Na variável ESCTD observaram-se em ambos os períodos os mesmos efeitos, da interação estresse*vitamina E ($p=0,0054$ e $p<0,0001$, para período 1 e 2 respectivamente) e uma tendência de efeito da vitamina E ($p=0,0801$ e $p=0,0659$, períodos 1 e 2 respectivamente).

Na variável resposta ESCTE observaram-se os mesmos efeitos nos dois períodos: estresse ($p=0,0018$ no período 1; $p=0,0136$ no período 2) e vitamina E ($p<0,0001$ em ambos os períodos).

Tabela 8 – Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da consistência do testículo direito (ESCTD, 1-5) de cães da raça rotweiler durante o primeiro e segundo períodos experimentais

	Com Estresse			Sem Estresse		
	Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
Período 1	2,91 $\pm$ 0,03	2,95 $\pm$ 0,02	0,3816	2,99 $\pm$ 0,01	2,84 $\pm$ 0,05	0,0071
Período 2	2,92 $\pm$ 0,03	2,78 $\pm$ 0,05	0,0304	2,68 $\pm$ 0,06	2,98 $\pm$ 0,01	<0,0001

*referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais com estresse

** referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais sem estresse

A variável ESCTD apresentou um comportamento variável nos dois períodos (Tabelas 8 e 9) indicando que provavelmente esta variável seja mais suscetível à outros fatores que não a vitamina E ou o estresse.

Tabela 9 – Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da consistência do testículo direito (ESCTD, 1-5) de cães da raça rotweiler durante o primeiro e segundo períodos experimentais

	Com vitamina E			Sem vitamina E		
	Com Stress	Sem Stress	p^*	Com Stress	Sem Stress	p^{**}
Período 1	2,91 $\pm$ 0,03	2,99 $\pm$ 0,01	0,0450	2,95 $\pm$ 0,02	2,84 $\pm$ 0,05	0,0496
Período 2	2,92 $\pm$ 0,03	2,68 $\pm$ 0,06	0,0010	2,78 $\pm$ 0,05	2,98 $\pm$ 0,01	0,0005

*referente à comparação entre com e sem estresse dos animais suplementados com vitamina E

** referente à comparação entre com e sem estresse dos animais não suplementados com vitamina E

Suárez et al. (1996) verificaram que ratos submetidos ao estresse crônico de contenção apresentavam um menor peso testicular, quando comparados aos

animais controle. Esta redução no peso pode ser devida à uma menor produção de testosterona, observada nos quadros de estresse (BARTH, 1993; BARTH; BOWMAN, 1994; KUBOKAWA, 1999). A proliferação e a diferenciação das células testiculares são dependentes de testosterona (WEINBAUER; WESSELS, 1999). Baixos níveis deste hormônio poderiam acarretar diminuição do peso, tamanho e consistência testiculares.

Tabela 10 – Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da consistência do testículo esquerdo (ESCTE, 1-5) de cães da raça rotweiller durante o primeiro e segundo períodos experimentais

	Vitamina E			Estresse		
	Com	Sem	p^*	Com	Sem	p^{**}
Período 1	2,91 $\pm$ 0,02	3,08 $\pm$ 0,03	<0,0001	3,05 $\pm$ 0,03	2,95 $\pm$ 0,02	0,0050
Período 2	2,82 $\pm$ 0,03	3,01 $\pm$ 0,03	<0,0001	2,97 $\pm$ 0,03	2,87 $\pm$ 0,03	0,0396

*referente à comparação entre os animais com e sem suplementação com vitamina E

** referente à comparação entre os animais com e sem estresse

Na variável ESCTE observou-se um comportamento semelhante nos dois períodos experimentais (Tabela 10). Contrariando os resultados esperados, os animais estressados apresentaram maior consistência testicular em ambos os períodos e a vitamina E exerceu um efeito deletério sobre este parâmetro.

As diferenças verificadas para ESCTD e ESCTE foram mínimas, porém significantes. Contudo devemos ressaltar alguns pontos.

Este é um parâmetro subjetivo que leva em consideração a experiência prévia do técnico responsável em aferi-lo. Para evitar interferências do fator humano, somente um técnico foi responsável pela tomada deste parâmetro durante todo o experimento.

Os valores brutos obtidos apresentam no máximo variações de 0,5 entre as classificações. Por maior sensibilidade e treinamento apresentados pelo técnico, as diferenças matemáticas obtidas neste trabalho não seriam diagnosticadas.

Os resultados demonstram que, apesar de serem observadas diferenças entre os grupos experimentais, este parâmetro tem a sua utilização prática reduzida e inviabilizada na avaliação dos efeitos do estresse e da vitamina E sobre a consistência testicular uma vez que as diferenças não poderiam ser verificadas na prática.

6.3 Avaliação do ejaculado

Na avaliação do ejaculado consideraram-se os parâmetros relativos ao sêmen fresco e ao plasma seminal.

6.3.1 Volume do ejaculado

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a variável volume do ejaculado (VOL) verificou-se que foi possível demonstrar efeito estatístico do estresse ($p < 0,0001$) e das interações estresse*vitamina E*período ($p < 0,0001$) e estresse*vitamina E*período*semana ($p = 0,0246$) sobre o volume do ejaculado. Observou-se também uma tendência estatística de efeito da

semana ($p=0,0900$), período ($p=0,0906$) e da interação estresse*vitamina E ($p=0,0811$)

No período 1 e 2 verificou-se efeito do estresse ($p<0,0001$ para ambos os períodos) e da vitamina E ($p=0,0143$ e $p=0,0144$, para o período 1 e 2 respectivamente).

Tabela 11 – Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) do volume da segunda fração do ejaculado (VOL, mL) de cães da raça rotweiler durante o primeiro e segundo período experimental

	Vitamina E			Estresse		
	Com	Sem	p^*	Com	Sem	p^{**}
Período 1	2,93 $\pm$ 0,14	3,39 $\pm$ 0,15	0,0060	2,74 $\pm$ 0,10	3,61 $\pm$ 0,17	0,0002
Período 2	2,93 $\pm$ 0,14	3,39 $\pm$ 0,15	0,0060	2,74 $\pm$ 0,10	3,61 $\pm$ 0,17	0,0002

*referente à comparação entre os animais com e sem suplementação com vitamina E

** referente à comparação entre os animais com e sem estresse

Contrariando os resultados obtidos por Baptista Sobrinho (2002) observou-se que o estresse promove uma redução do volume do ejaculado. Esta diferença nos resultados encontrados pode ser devida ao tipo de estresse aplicado aos cães, no presente experimento avaliou-se o efeito do estresse induzido pela DXO, enquanto que Baptista Sobrinho (2002) avaliou os efeitos do estresse de trabalho.

A suplementação com vitamina E não alterou o volume do ejaculado de galos (DANIKOWSKI et al., 2002), homens (KESSOPOULOU et al., 1995) e coelhos (CASTELLINI et al., 2003), o que contrariou os resultados obtidos durante o segundo período deste experimento (Tabela 11).

Yousef, Abdallah e Kamel (2003) verificaram que em coelhos, a suplementação oral com vitamina E promoveu um aumento significativo ($p > 0,05$) no volume do ejaculado.

O volume do ejaculado apresenta grandes variações devido, principalmente, à diferenças individuais como idade ou tamanho da próstata, e à alterações fisiológicas comuns inerentes à espécie canina (CUNHA, 2002). Associado a este fato, neste experimento optou-se por avaliar somente a segunda fração do ejaculado, que é a fração rica em espermatozóides. Em humanos, coelhos e galos não é possível a separação da fração rica e por isso coleta-se todo o ejaculado. Talvez se todo o ejaculado fosse coletado a atuação da vitamina E poderia ser melhor evidenciada.

6.3.2 Motilidade e vigor espermáticos

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a motilidade espermática observou-se o efeito do estresse ($p < 0,0001$), da semana ($p = 0,0483$) e da interação estresse*vitamina E*período ($p < 0,0001$) sobre a motilidade espermática do sêmen fresco (MOT); e do estresse ($p = 0,0089$), da semana ($p = 0,0172$) e da interação estresse*vitamina E*período ($p < 0,0001$) sobre o vigor espermático do sêmen fresco (VIG). Como em ambas variáveis observou-se o efeito da interação estresse*vitamina E*período, avaliou-se o efeito das variáveis classificatórias em cada período separadamente.

Na MOT, em ambos os períodos, observou-se efeito do estresse ($p=0,0003$ no período 1; $p=0,0042$ no período 2), da vitamina E ($p=0,0003$ no período 1; $p=0,0004$ no período 2) e da interação estresse*vitamina E ($p=0,0004$ no período 1, $p=0,0003$ no período 2).

Na variável resposta VIG no período 1 observou-se efeito da interação estresse*vitamina E ($p=0,0039$). No período 2 observou-se efeito do estresse ($p=0,0252$), da vitamina E ($p=0,0008$) e da interação estresse*vitamina E ($p=0,0004$).

Tabela 12 – Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da motilidade espermática (MOT, %) e do vigor espermático (VIG, 1-5) do sêmen fresco de cães da raça rotweiler durante o primeiro e o segundo períodos experimentais

		Com Estresse			Sem Estresse		
		Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
MOT	Período 1	67,72 $\pm$ 1,58	67,56 $\pm$ 0,91	0,1033	67,59 $\pm$ 1,24	54,58 $\pm$ 3,17	0,0005
	Período 2	66,68 $\pm$ 0,89	66,59 $\pm$ 1,83	0,0110	54,49 $\pm$ 3,43	68,04 $\pm$ 0,80	0,0002
VIG	Período 1	2,85 $\pm$ 0,04	2,91 $\pm$ 0,03	0,2090	2,92 $\pm$ 0,03	2,74 $\pm$ 0,06	0,0033
	Período 2	2,89 $\pm$ 0,03	2,89 $\pm$ 0,04	0,4481	2,62 $\pm$ 0,09	2,95 $\pm$ 0,02	0,0002

*referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais com estresse

** referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais sem estresse

Nos animais estressados, a suplementação com vitamina E aumentou a MOT no período 2, nos animais não estressados os efeitos benéficos sobre a MOT não puderam ser evidenciados em ambos os períodos (Tabela 12). Nos animais estressados, a vitamina E não apresentou nenhum efeito sobre o VIG; nos animais não estressados a vitamina E atuou de maneira diferente nos períodos avaliados (Tabela 12).

Suleiman et al. (1996) observaram aumento na motilidade espermática de homens de baixa fertilidade suplementados com vitamina E. No entanto, Kessopoulou et al. (1995) não observaram alterações na motilidade de homens suplementados com 600 mg/dia de vitamina E.

Danikowski et al. (2002) observaram que galos suplementados com 100 UI/kg ração de vitamina E apresentaram maior ($p<0,05$) motilidade espermática quando comparado aos animais não suplementados. O requerimento de vitamina E para galos é de 30UI/kg de ração (MACHLIN, 1984), ou seja, a suplementação foi de aproximadamente 3 vezes o requerimento de vitamina E. Entretanto, nos outros níveis de suplementação (1000, 10000 e 20000 UI/kg de ração) não se observou esta diferença.

Marin-Guzman, Mahan e Whitmoyer (2000) observaram que cachorros suplementados com 220 UI/Kg de ração apresentaram aumento na motilidade ($p<0,01$) quando comparados com animais não suplementados.

Segundo Yousef, Abdallah e Kamel (2003) o aumento na motilidade espermática, em coelhos, observado após a suplementação com vitamina E pode ser atribuído em parte ao aumento da concentração de frutose no plasma seminal cuja síntese e secreção pelas glândulas acessórias é dependente de testosterona.

Verma e Kanwar (1999) observaram um aumento dose dependente na motilidade espermática *in vitro* após a suplementação do meio de manutenção com vitamina E.

Por outro lado, Castellini et al. (2003) não observaram efeito da vitamina E sobre a motilidade espermática de coelhos. E Donnelly, McClure e Lewis (1999) observaram que a suplementação *in vitro* com vitamina E provoca uma redução significativa ($p<0,005$) na motilidade espermática de homens.

Therond et al. (1996) verificaram uma correlação positiva entre motilidade e concentração de vitamina E na célula espermática ($r=0,84$, $p<0,001$). Segundo os autores, essa maior concentração possibilita uma maior proteção da célula espermática contra o estresse oxidativo.

Tabela 13 – Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) da motilidade espermática (MOT, %) e do vigor espermático (VIG, 1-5) do sêmen fresco de cães da raça rotweiller durante o primeiro e o segundo períodos experimentais

		Com vitamina E			Sem vitamina E		
		Com Stress	Sem Stress	p^*	Com Stress	Sem Stress	p^{**}
MOT	Período 1	67,72 $\pm$ 1,58	67,59 $\pm$ 1,24	0,2873	67,56 $\pm$ 0,91	54,58 $\pm$ 3,17	0,0014
	Período 2	66,68 $\pm$ 0,89	54,49 $\pm$ 3,43	0,0077	66,59 $\pm$ 1,83	68,04 $\pm$ 0,80	0,0737
VIG	Período 1	2,85 $\pm$ 0,04	2,92 $\pm$ 0,03	0,0863	2,91 $\pm$ 0,03	2,74 $\pm$ 0,06	0,0163
	Período 2	2,89 $\pm$ 0,03	2,62 $\pm$ 0,09	0,0019	2,89 $\pm$ 0,04	2,95 $\pm$ 0,02	0,3124

*referente à comparação entre com e sem estresse dos animais suplementados com vitamina E

** referente à comparação entre com e sem estresse dos animais não suplementados com vitamina E

Os animais submetidos à condição de estresse e suplementados com vitamina E apresentaram aumento na MOT nos segundo período experimental, porém nos animais não suplementados este aumento somente foi observado no primeiro período experimental (Tabela 13). Os animais submetidos à condição de estresse e suplementados com vitamina E apresentaram aumento no VIG dos animais suplementados no período 2 e dos não suplementados no período 1.

Barth e Bowman (1994) observaram uma redução na motilidade espermática de touros submetidos a insulação testicular e a aplicação de dexametasona. Entretanto, estes autores creditaram esta redução na motilidade ao método de

coleta (eletroejaculação) que facilitou a contaminação por urina de algumas amostras.

Suárez et al. (1996) verificaram que animais submetidos ao estresse apresentam menor motilidade espermática quando comparado aos animais controle. Baptista Sobrinho (2002) encontrou resultados semelhantes em cães.

Di Luigi et al. (2002) avaliaram os efeitos do estresse de treinamento sobre os parâmetros seminais e hormonais. Estes autores não observaram diferenças na motilidade espermática entre homens treinados e homens não treinados.

A motilidade e o vigor espermático são parâmetros altamente suscetíveis à influências externas (como por exemplo temperatura do material utilizado na avaliação, contaminação da amostra por urina, presença de plasma seminal, tempo decorrido entre a coleta e a análise da amostra, etc.) o que explicaria na divergência dos resultados obtidos neste trabalho bem como nos resultados conflitantes observados na literatura (BARTH; BOWMAN, 1994; DI LUIGI et al., 2002; SUÁREZ et al., 1996).

6.3.3 Densidade e pH do ejaculado

Quando avaliou-se o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a variável densidade do ejaculado (DENS) foi possível demonstrar efeito da semana ($p < 0,0001$) e da interação estresse*vitamina E*período ($p = 0,0147$). Na variável pH espermático (PH) foi possível demonstrar efeito de estresse ($p < 0,0001$),

de semana ($p < 0,0001$), de período ($p = 0,0310$) e tendência da interação estresse*vitamina e ($p = 0,0844$).

Nos períodos 1 e 2, em relação a DENS, verificou-se uma tendência de efeito de vitamina E ($p = 0,0518$ para ambos os períodos). Os animais não suplementados apresentaram maior densidade ($0,983 \pm 0,00$) quando comparados aos animais suplementados ($0,978 \pm 0,00$) e essa diferença foi significativa ($p = 0,0446$) no período 1. No período 2 os dois grupos comportaram-se de maneira semelhante.

Danikowski et al. (2002) observaram redução na densidade do ejaculado de galos suplementados com vitamina E.

Os animais sem estresse apresentaram um pH seminal de $6,72 \pm 0,02$, e os com estresse $6,60 \pm 0,02$ sendo essa diferença significativa ($p < 0,0001$). Os valores de pH seminal canino encontrados por Baptista Sobrinho (2002) encontram-se bastante próximos dos valores encontrados neste experimento, entretanto o autor não conseguiu demonstrar efeito do estresse sobre este parâmetro.

Case, Carey e Hirakawa (1995) sugerem que o estresse pode diminuir a ingestão de água pois interfere na homeostase animal. Essa diminuição do pH poderia ser reflexo desta redução no consumo de água. Entretanto, para confirmar esta hipótese seriam necessários a mensuração do consumo hídrico e a realização do hematócrito dos animais experimentais.

Não foi possível demonstrar efeito da suplementação com vitamina E sobre o pH seminal. Danikowski et al. (2002) também não observaram diferenças no pH seminal entre animais suplementados ou não com vitamina E.

Yousef, Abdallah e Kamel (2003) verificaram que em coelhos a suplementação oral com vitamina E promoveu um aumento ($p > 0,05$) no pH do ejaculado.

6.3.4 Concentração espermática

Quando se avaliou os efeitos das variáveis classificatórias e suas interações sobre a concentração espermática (CONC) observou-se efeito do estresse ($p=0,0002$) e da interação estresse*vitamina E*período ($p<0,0001$).

No período 1 observou-se efeito de estresse ($p=0,0065$), da vitamina E ($p=0,0013$) e uma tendência da interação estresse*vitamina E ($p=0,0954$). No período 2 observou-se efeito de estresse ($p=0,0007$), da vitamina E ($p=0,0003$) e da interação estresse*vitamina E ($p=0,0130$).

Tabela 14 – Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da concentração do ejaculado (CONC, $\times 10^6$ espermatozoides/mL) de cães da raça rotweiler durante o primeiro e o segundo períodos experimentais

	Com Estresse			Sem Estresse		
	Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
Período 1	127,92 $\pm$ 13,43	73,19 $\pm$ 9,82	0,0002	78,78 $\pm$ 9,85	61,25 $\pm$ 10,00	0,0281
Período 2	57,36 $\pm$ 8,92	139,32 $\pm$ 18,22	<0,0001	44,58 $\pm$ 11,29	60,17 $\pm$ 10,47	0,0546

*referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais com estresse

** referente à comparação entre com sem suplementação com vitamina E dos animais sem estresse

No período 1 a vitamina E promoveu um aumento na CONC de animais estressados e não estressados. No período 2 observou-se o efeito inverso (Tabela 14).

Yousef, Abdallah e Kamel (2003) verificaram que em coelhos a suplementação oral com vitamina E promoveu um aumento ($p>0,05$) de 12% da concentração espermática. Brzezinska-Slebodzinska et al. (1995) obtiveram resultados semelhantes em cachorros.

Kessopoulou et al. (1995) observaram uma redução de 15% na concentração espermática de homens suplementados com vitamina E.

Danikowski et al. (2002) afirmam que, em galos, altos níveis de vitamina E (acima de 1000UI/kg de ração) promovem uma redução na concentração espermática e que esta redução pode estar associada à diminuição no peso/volume dos testículos.

Tabela 15 – Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) da concentração do ejaculado (CONC, $\times 10^6$ espermatozoides/mL) de cães da raça rotweiler durante o primeiro e o segundo períodos experimentais

	Com vitamina E			Sem vitamina E		
	Com Stress	Sem Stress	p^*	Com Stress	Sem Stress	p^{**}
Período 1	127,92 $\pm$ 13,43	78,78 $\pm$ 9,85	0,0004	73,19 $\pm$ 9,82	61,25 $\pm$ 10,00	0,1107
Período 2	57,36 $\pm$ 8,92	44,58 $\pm$ 11,29	0,0587	139,32 $\pm$ 18,22	60,17 $\pm$ 10,47	0,0001

*referente à comparação entre com e sem estresse dos animais suplementados com vitamina E

** referente à comparação entre com e sem estresse dos animais não suplementados com vitamina E

Contrariando os resultados esperados os animais estressados apresentaram maiores valores para a CONC (Tabela 15).

Di Luigi et al. (2002) não encontraram diferenças na concentração espermática de homens treinados (submetidos ao estresse de treinamento) e homens não treinados (controle). Baptista Sobrinho (2002) também não observou efeito do estresse sobre a concentração espermática de cães. Por outro lado, Barth e Bowman (1994) observaram redução na concentração após a aplicação de DXO, em touros.

6.3.5 Alterações morfológicas

Quando se avaliou os efeitos das variáveis classificatórias e suas interações sobre a variável defeitos maiores (DEFMA) observou-se efeito de estresse ($p < 0,0001$), vitamina E ($p < 0,001$), da semana ($p = 0,0386$) e da interação estresse*vitamina E ($p = 0,0043$). Na variável defeitos menores (DEFME) observou-se efeito de semana ($p < 0,0001$), da vitamina E ($p = 0,0021$). Na variável defeitos totais (DEFTOT) observou-se efeito de estresse ($p < 0,0001$) e da semana ($p < 0,0001$).

Tabela 16 – Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem de defeitos maiores (DEFMA, %) de cães da raça rotweiller durante o experimental

Com Estresse			Sem Estresse		
Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
6,94 $\pm$ 0,78	8,79 $\pm$ 1,03	0,0843	10,00 $\pm$ 1,09	18,14 $\pm$ 1,68	<0,0001

*referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais com estresse

** referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais sem estresse

A vitamina E reduziu a DEFMA de animais sem estresse (Tabela 16).

Tabela 17 – Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem de defeitos maiores (DEFMA, %) de cães da raça rotweiller durante o período experimental

Com vitamina E			Sem vitamina E		
Com Stress	Sem Stress	p^*	Com Stress	Sem Stress	p^{**}
6,94 $\pm$ 0,78	10,00 $\pm$ 1,09	0,0077	8,79 $\pm$ 1,03	18,14 $\pm$ 1,68	<0,0001

*referente à comparação entre com e sem estresse dos animais suplementados com vitamina E

** referente à comparação entre com e sem estresse dos animais não suplementados com vitamina E

Contrariando os resultados esperados, os animais submetidos ao protocolo de estresse apresentaram uma redução dos DEFMA dos animais suplementados e não suplementados (Tabela 17).

Baptista Sobrinho (2002) observou um aumento na porcentagem de DEFMA em cães submetidos ao estresse de trabalho. E este aumento deveu-se principalmente à ocorrência de cabeças soltas e caudas fortemente dobradas e enroladas.

Tabela 18 – Efeito do estresse (stress) e da suplementação com vitamina E (VitE) sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem de defeitos maiores (DEFMA), defeitos menores (DEFME) e defeitos totais (DEFTOT) de cães da raça rotweiler durante o período experimental

	Vitamina E			Estresse		
	Com VitE	Sem VitE	p^*	Com stress	Sem stress	p^{**}
DEFMA	8,47 $\pm$ 0,68	13,02 $\pm$ 1,06	0,0001	7,84 $\pm$ 0,64	13,57 $\pm$ 1,07	<0,0001
DEFME	9,74 $\pm$ 0,63	7,30 $\pm$ 0,52	0,0047	8,44 $\pm$ 0,56	8,79 $\pm$ 0,64	0,3609
DEFTOT	18,22 $\pm$ 1,06	20,33 $\pm$ 1,31	0,1288	16,29 $\pm$ 0,98	22,37 $\pm$ 1,31	0,0002

*referente à comparação entre os animais com e sem suplementação com vitamina E

** referente à comparação entre os animais com e sem estresse

Contrariando os trabalhos da literatura os animais submetidos ao quadro de estresse apresentaram menor porcentagem de DEFMA e DEFTOT (Tabela 18).

Barth e Bowman (1994) observaram redução no percentual de espermatozóides normais a partir do sétimo dia de aplicação da DXO (final das aplicações), redução esta que alcançou o seu ápice na terceira semana e retornaram aos valores pré-tratamento na sexta semana contadas a partir do início das aplicações de dexametasona. Neste experimento touros que sofreram insulação escrotal ou aplicação de dexametasona apresentaram aumento na porcentagem dos

seguintes defeitos: cabeça solta, cabeças piriformes, vacúolos (pouch), gotas proximais e distais (BARTH; BOWMAN, 1994).

Baptista Sobrinho (2002) não observou efeito do estresse sobre a porcentagem de DEFME de cães, contrariando os achados deste trabalho. Contudo este autor verificou um aumento ($p < 0,0001$) da porcentagem de DEFTOT dos cães submetidos ao estresse de trabalho.

Com base nos resultados apresentados na tabela 18 observa-se um efeito benéfico da vitamina E sobre DEFMA.

Yousef, Abdallah e Kamel (2003) verificaram que em coelhos a suplementação oral com vitamina E reduziu ($p < 0,05$) em 29,8% a incidência de espermatozóides com morfologia anormal quando comparado ao grupo controle.

Por outro lado, Marin-Guzman, Mahan e Whitmoyer (2000) não observaram efeito da suplementação com vitamina E sobre as anormalidades estruturais espermáticas em cachorros. Todavia, animais alimentados com dietas com baixos níveis de vitamina E apresentaram maior incidência de gotas citoplasmáticas. Devido a estes achados, os autores concluíram que a vitamina E não apresenta nenhum efeito benéfico sobre a redução na taxa de anormalidades estruturais da célula espermática, mas que provavelmente atua como um antioxidante da célula espermática.

Danikowski et al. (2002) verificaram que, em galos, doses a partir de 1000UI/kg de ração promovem aumento na porcentagem de espermatozóides morfológicamente alterados. E Kessopoulou et al. (1995) observaram aumento de 10% nos defeitos de cabeça, de 8% nos defeitos de peça intermediária e de 3% de defeitos de cauda de homens suplementados com vitamina E.

O efeito da vitamina E sobre as alterações morfológicas ainda é controverso. Entretanto, observando-se os trabalhos da literatura, verifica-se que doses acima de 20 vezes o requerimento diário desta vitamina promovem um efeito deletério sobre a morfologia espermática. O mecanismo pelo qual a vitamina E atua sobre a morfologia espermática ainda é incerto e necessita de maiores estudos.

6.3.6 Teste de expansão hipo-osmótico (HOST)

A análise de variância dos efeitos das variáveis classificatórias e suas interações indicou um efeito estatístico de estresse ($p=0,0002$) e da interação estresse*vitamina E ($p=0,0065$), e uma tendência de efeito da vitamina E ($p=0,0761$) sobre a porcentagem de células íntegras obtidas através do HOST (HIPO).

Tabela 19 – Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da porcentagem (%) de espermatozoides com membrana íntegra pelo HOST (HIPO) de cães da raça rotweiller durante o período experimental

Com Estresse			Sem Estresse		
Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
87,43 $\pm$ 1,09	89,38 $\pm$ 0,69	0,2697	85,89 $\pm$ 1,38	76,93 $\pm$ 3,62	0,0762

*referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais com estresse

** referente à comparação entre com sem suplementação com vitamina E dos animais sem estresse

Não houve efeito da vitamina sobre o HIPO de animais estressados e não estressados (Tabela 19).

Tabela 20 – Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) da porcentagem (%) de espermatozóides com membrana íntegra pelo HOST (HIPO) de cães da raça rotweiller durante o período experimental

Com vitamina E			Sem vitamina E		
Com Stress	Sem Stress	p^*	Com Stress	Sem Stress	p^{**}
87,43 $\pm$ 1,08	85,89 $\pm$ 1,38	0,2748	89,38 $\pm$ 0,69	76,93 $\pm$ 3,62	0,0051

*referente à comparação entre com e sem estresse dos animais suplementados com vitamina E

** referente à comparação entre com e sem estresse dos animais não suplementados com vitamina E

Contrariando os resultados esperados, os animais submetidos ao quadro de estresse e não suplementados apresentaram aumento no HIPO (Tabela 20).

Suárez et al. (1996) não conseguiram demonstrar efeito estatístico do estresse sobre a porcentagem de células com a membrana espermática íntegra.

Kumi-Diaka e Badtram (1994) obtiveram valores de 88,95 $\pm$ 7,11 (% , média $\pm$ desvio padrão) para o HOST de sêmen fresco de cães. Estes valores encontram-se bastante próximos ao deste experimento (Tabelas 19 e 20). Entretanto, estes autores não utilizaram uma solução iso-osmótica com relação ao sêmen (300mOsm) como controle para impedir que os espermatozóides com defeitos de cauda não fossem erroneamente contados como células íntegras. Provavelmente, se este cuidado tivesse sido tomado, os valores encontrados por estes autores seriam menores.

Rodrigues-Gil, Mont Serrat e Rigaut (1994) afirmam que o HOST é um teste simples e prático, podendo ser utilizado na avaliação funcional das células espermáticas na espécie canina

6.3.7 Proteína total do plasma seminal

A curva padrão utilizada para a determinação da concentração de proteína total do plasma seminal (PROT) obedeceu à seguinte equação:

$$\text{PROT} = -3,9462 + 54,29 * \text{Absorbância}, \text{ com } R^2 = 0,9882 \text{ e } p < 0,0000.$$

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações verificou-se que não foi possível demonstrar efeito ($p > 0,005$) de nenhuma das variáveis delas, bem como de suas interações.

Tabela 21 – Média $\pm$ erro padrão da média da concentração de proteínas totais no plasma seminal (ng/mL) de cães da raça rotweiler segundo o tratamento

Tratamento	Estresse	Vitamina E	Média $\pm$ erro padrão
1	Sim	Sim	23,58 $\pm$ 1,83 ^A
2	Sim	Não	25,76 $\pm$ 1,60 ^A
3	Não	Sim	23,80 $\pm$ 1,17 ^A
4	Não	Não	22,82 $\pm$ 1,41 ^A

A, B, C...letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença ($p < 0,05$) segundo o teste de Tuckey.

Souza (2003) observou uma grande variação nas concentrações de proteína total no plasma seminal de cães contrariando os resultados encontrados neste experimento (Tabela 21).

O espermatozóide é uma célula especializada que perde a capacidade de síntese protéica (GLANDER et al., 2002). Alguns trabalhos tem demonstrado correlação entre a concentração de proteínas totais e os parâmetros seminais.

Entretanto, pelos resultados obtidos neste experimento e pelos resultados obtidos por Souza (2003) esta relação não é observada em cães.

6.3.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Quando avaliou-se os efeitos das variáveis classificatórias sobre a concentração de TBARS (TBARS) observou-se efeito de estresse ($p < 0,0001$) e da vitamina E (0,0083).

A curva padrão utilizada para a determinação do TBARS obedeceu à seguinte equação: $TBARS = 1,1638 + 9113,7 \times \text{Absorbância}$, com $R^2 = 0,9992$ e $p < 0,0001$.

Danikowski et al. (2002) observaram que níveis de suplementação crescentes de vitamina E apresentam relação inversa com a concentração de TBARS no plasma seminal de galos. Contudo, a diminuição de TBARS não foi proporcional ao aumento na suplementação de vitamina E.

Tabela 22 – Efeito do estresse (stress) e da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da concentração de TBARS do plasma seminal (TBARS, ng/mL) de cães da raça rotweiller durante o período experimental

Estresse			Vitamina E		
Com stress	Sem stress	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
337,37 $\pm$ 25,33	197,00 $\pm$ 20,67	<0,0001	246,47 $\pm$ 24,38	293,34 $\pm$ 23,69	0,0189

*referente à comparação entre com e sem estresse

** referente à comparação entre com sem suplementação com vitamina E

Os animais submetidos ao estresse apresentaram um aumento do estresse oxidativo das células espermáticas, enquanto que a suplementação com vitamina E reduziu a produção de TBARS (Tabela 22).

Yousef, Abdallah e Kamel (2003) observaram que as concentrações de TBARS foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) no plasma seminal de coelhos suplementados com vitamina E indicando diminuição da peroxidação lipídica.

Kessopoulou et al. (1995) observaram redução na produção de ROS de homens suplementados com vitamina E.

A suplementação do meio de manutenção com 2,0 mmol/L de vitamina E reduziu a formação de MDA pelos espermatozóides após 4 horas de incubação (VERMA; KANCAR, K. C., 1999).

Castellini et al. (2003) observaram que a suplementação oral de vitamina E reduziu ($p < 0,05$) a produção de ROS e TBARS pelos espermatozóides e aumentou a capacidade anti-oxidante do plasma seminal de coelhos.

HSU et al. (1998) observaram que ratos suplementados com 300 mg/kg de vitamina E e submetidos ao desafio com chumbo para indução do estresse oxidativo apresentaram menor produção de ROS ($p < 0,005$) quando comparados com animais não suplementados. Entretanto, em animais não desafiados não se observou essa diferença.

Geva et al. (1996) verificaram que, em homens normospérmicos com baixas taxas de fertilização em ciclos prévios no programa de fertilização *in vitro*, após 1 mês de suplementação de 200mg/dia de vitamina E a peroxidação lipídica foi reduzida ($p < 0,001$) e esta diminuição foi correlacionada ($p < 0,05$) com o aumento na taxa de fertilização.

O estresse aumenta o estresse oxidativo através do aumento da produção de ROS (SIKKA, 1996; TSIGOS; CHROUROS, 2002). Este fato foi observado neste experimento e em outros trabalhos, onde os animais estressados apresentaram maior produção de TBARS que é um indicativo do grau de peroxidação lipídica e conseqüentemente do estresse oxidativo (GIL-GUZMAN et al., 2001).

Corroborando com os dados da literatura observou-se que a vitamina E reduz o estresse oxidativo.

6.3.9 Catalase (E.C. 1.11.1.6)

Não foi possível detectar a presença de catalase no plasma seminal dos animais experimentais.

Nichi (2003) também não encontrou catalase no plasma seminal de bovinos taurinos e zebuínos mantidos à campo. Todavia, esta enzima já foi encontrada no sêmen de humanos, coelhos e cachacos (DADENKAR, et al., 2002; MARIN-GUZMAN; MAHAN; WHITMOYER, 2000; ZINI, et al., 2000).

No caso dos homens existe uma grande discordância quanto a origem da catalase presente no plasma seminal. Vários autores sugerem que a principal fonte de catalase seria os neutrófilos presentes em grandes quantidades no sêmen humano (MIESSEL, et al, 1997; ZINI, et al., 2000).

Supõem-se que a seja principalmente uma enzima intracelular o que explicaria a sua baixa concentração ou inexistência no plasma seminal (CALAMERA et al., 2000; DADENKAR, et al., 2002).

6.3.10 Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)

Quando se analisou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações verificou-se que não foi possível demonstrar efeito ($p>0,005$) de nenhuma delas, bem como de suas interações, mas somente uma tendência de efeito da semana ($p=0,0514$) sobre as concentrações de SOD no plasma seminal.

Tabela 23 – Média $\pm$ erro padrão da média da concentração de superóxido dismutase no plasma seminal (ng/mL) de cães da raça rotweiler segundo o tratamento

Tratamento	Estresse	Vitamina E	Média $\pm$ erro padrão
1	Sim	Sim	69,46 $\pm$ 5,79 ^A
2	Sim	Não	52,15 $\pm$ 3,18 ^A
3	Não	Sim	54,52 $\pm$ 5,08 ^A
4	Não	Não	51,35 $\pm$ 4,08 ^A

A, B,C...letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

Brzezinska-Slebozinska et al. (1995) relataram que a suplementação com vitamina E aumenta a SOD presente no plasma seminal de cachorros.

Hsieh et al. (2002) não observaram diferenças na atividade da SOD do plasma seminal de homens normospermicos e oligospermicos.

Marin-Guzman, Mahan e Whitmoyer (2000) relataram a presença de SOD na célula espermática e no plasma seminal de coelhos e cachorros.

Segundo Aitken et al. (1996) a associação entre altos níveis de SOD e alterações na função espermática podem envolver vários componentes como: 1) a habilidade desta enzima em atuar como um marcador do desenvolvimento

citoplasmático e de indiretamente refletir erros na espermatogênese, caracterizados pela presença de células germinativas no ejaculado e pela ineficiente remoção do citoplasma residual de espermatozóides diferenciados; 2) a direta indução do dano peroxidativo através da produção excessiva de H_2O_2 ; 3) a remoção de O_2^- , que possui importante papel no controle do potencial fertilizante desta célula altamente especializada.

6.3.11 Glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9)

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações verificou-se que não foi possível demonstrar efeito ($p>0,005$) de nenhuma delas, bem como de suas interações, somente uma tendência de efeito da semana ($p=0,0987$) sobre a concentração de GPx no plasma seminal dos animais.

Tabela 24 – Média $\pm$ erro padrão da média da concentração de glutathione peroxidase no plasma seminal (ng/mL) de cães da raça rotweiller segundo o tratamento

Tratamento	Estresse	Vitamina E	Média $\pm$ erro padrão
1	Sim	Sim	231,57 $\pm$ 31,56 ^A
2	Sim	Não	269,97 $\pm$ 35,27 ^A
3	Não	Sim	278,29 $\pm$ 39,07 ^A
4	Não	Não	211,23 $\pm$ 24,75 ^A

A, B, C...letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

Yousef, Abdallah e Kamel (2003) verificaram que em coelhos a suplementação oral com vitamina E promoveu um aumento significativo ($p>0,05$) na atividade da glutathione S-transferase.

6.4 Avaliação do sêmen congelado

Devido à falta de condições para o armazenamento do sêmen congelado de todas as coletas de sêmen, optou-se por congelar o sêmen uma vez por semana e somente em algumas semanas: SUPLE, DXO, SE1, SE3, SE5, SE7.

Durante a realização dos pilotos para a padronização das técnicas utilizadas para avaliar o sêmen congelado, observou-se que após 2 horas de incubação (ROTA et al., 1999) todas as amostras avaliadas apresentavam todos os espermatozoides mortos.

Após alguns testes, o tempo de 1 hora de incubação mostrou os melhores resultados, por isso optou-se por reduzir o tempo de capacitação utilizado por Rota et al. (1999). De acordo com estes autores, para estudar a capacitação no sêmen congelado em maiores detalhes intervalos menores que 2 horas de incubação deveriam ser utilizados.

6.4.1 Motilidade e vigor espermáticos

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre o parâmetro motilidade espermática (MOT), verificou-se efeito da semana ($p=0,0163$) sobre a motilidade pós-descongelamento (MOT 0). Não foi possível demonstrar efeito ($p>0,05$) de nenhuma das variáveis classificatórias e suas interações sobre a motilidade pré-capacitação (MOT 1) e observou-se uma tendência de efeito da vitamina E ($p=0,0857$) sobre a motilidade pós-capacitação (MOT 2).

Quando se analisou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre o parâmetro vigor espermático (VIG), observou-se que não foi possível demonstrar efeito ($p>0,05$) de nenhuma das variáveis classificatórias e suas interações sobre o vigor espermático pós-descongelamento (VIG 0). Verificou-se também efeito da semana ($p=0,0001$) sobre o vigor espermático pré-capacitação (VIG 1); e da interação estresse*vitamina E *semana ($p=0,0346$) e tendência de efeito de semana ($p=0,0727$) sobre o vigor espermático pós-capacitação (VIG 2).

Quando se analisou separadamente a interação estresse*vitamina E*semana sobre o vigor espermático pós-capacitação verificou-se que não foi possível detectar diferenças entre os tratamentos.

De acordo com Rota et al. (1999), a motilidade e a viabilidade espermáticas são afetadas pelo procedimento de lavagem, necessário para a remoção do crioprotetor do sêmen congelado, a motilidade diminuiu de 70 para 40% após a lavagem demonstrando sensibilidade do espermatozóide criopreservado à este procedimento.

A incubação em CCM induz o processo de capacitação com preservação da viabilidade e da motilidade das células, sem induzir a uma alta taxa de reação acrossômica espontânea (GUÉRIN et al., 1999).

Quando se analisaram os efeitos do congelamento e da capacitação espermática sobre a motilidade espermática observou-se efeito do momento da tomada do parâmetro ($p < 0,0001$), da semana ($p < 0,0001$) e da interação estresse*vitamina E* semana*momento ($p = 0,0117$).

Tabela 25 – Efeito do tratamento sobre a média $\pm$ erro padrão da motilidade do sêmen fresco (MOT), do sêmen pós-descongelamento (MOT 0), do sêmen pré-capacitação (MOT 1) e pós-capacitação (MOT 2) de cães da raça rotweiler

Trat	MOT	MOT 0	MOT 1	MOT 2
1	67,17 $\pm$ 0,91 ^{Aa}	63,05 $\pm$ 4,91 ^{Aa}	20,00 $\pm$ 4,38 ^{Ab}	4,72 $\pm$ 1,24 ^{ABc}
2	67,07 $\pm$ 1,02 ^{Aa}	63,33 $\pm$ 6,07 ^{Aa}	32,73 $\pm$ 7,11 ^{Ab}	10,42 $\pm$ 3,56 ^{Ab}
3	61,77 $\pm$ 1,79 ^{Ba}	50,00 $\pm$ 8,23 ^{Aa}	32,73 $\pm$ 6,48 ^{Ab}	4,17 $\pm$ 1,61 ^{ABc}
4	62,06 $\pm$ 1,61 ^{Ba}	59,54 $\pm$ 6,55 ^{Aa}	25,45 $\pm$ 8,80 ^{Ab}	5,45 $\pm$ 2,07 ^{Bc}
Média	64,66 $\pm$ 0,68 ^a	59,43 $\pm$ 3,15 ^a	26,94 $\pm$ 3,25 ^b	6,04 $\pm$ 1,09 ^c

1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação

a, b, c....letras diferentes em uma mesma linha indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon

A, B, C....letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

O tratamento interferiu somente na motilidade do sêmen fresco (MOT) nos momentos seguintes os tratamento se comportaram de maneira semelhante (Tabela 25).

Oettlé (1986) observou redução de 35,13% na motilidade pós-descongelamento do sêmen canino, em relação ao sêmen fresco.

Hammadeh et al. (1999) observaram que em homens a motilidade espermática diminuiu significativamente ($p < 0,0001$) em 17,8% após o processo de congelamento seguido do descongelamento.

Quando se analisaram os efeitos do congelamento e da capacitação espermática sobre o vigor espermático observaram-se efeito do estresse ($p = 0,0188$), da semana ($p < 0,0001$) momento da tomada do parâmetro ($p < 0,0001$) e das interações estresse*vitamina E*momento ($p = 0,0016$) e estresse*vitamina E*semana*momento ($p = 0,0117$).

Tabela 26 – Efeito do tratamento sobre a média $\pm$ erro padrão do vigor espermático (1-5) do sêmen fresco (VIG), do sêmen pós-descongelamento (VIG 0), do sêmen pré-capacitação (VIG 1) e pós-capacitação (VIG 2) de cães da raça rotweiller

Trat	VIG	VIG 0	VIG 1	VIG 2
1	2,87 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	3,22 $\pm$ 0,09 ^{Aa}	2,82 $\pm$ 0,23 ^{Aa}	1,78 $\pm$ 0,44 ^{Ab}
2	2,90 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	3,25 $\pm$ 0,13 ^{Aab}	2,58 $\pm$ 0,42 ^{Ab}	2,62 $\pm$ 0,47 ^{Ab}
3	2,78 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	3,17 $\pm$ 0,13 ^{Aa}	2,83 $\pm$ 0,27 ^{Ab}	1,58 $\pm$ 0,58 ^{Ab}
4	2,85 $\pm$ 0,03 ^{Aa}	3,27 $\pm$ 0,12 ^{Aa}	2,18 $\pm$ 0,42 ^{Aa}	1,73 $\pm$ 0,62 ^{Ab}
Média	2,85 $\pm$ 0,01 ^b	3,23 $\pm$ 0,06 ^a	2,63 $\pm$ 0,16 ^b	1,91 $\pm$ 0,25 ^c

1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação

a, b, c....letras diferentes em uma mesma linha indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon

A, B, C....letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

O vigor espermático não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,005$). Entretanto, observou-se que o VIG 0 foi superior aos outros momentos (Tabela 26), talvez em decorrência da criocapacitação que sofre o sêmen canino.

Guérin et al. (1999) não observaram a hiperativação espermática durante a incubação com CCM por 1, 3 6 e 24 horas. Entretanto, no presente experimento,

observou-se espermatozóides com movimentação hiperativa após o descongelamento e a incubação com CCM durante 1 hora. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que Guérin et al. (1999) trabalharam com sêmen fresco.

Neste trabalho a hiperativação não apresentou nenhuma relação com o tratamento. Kessopoulou et al. (1995) também não observaram aumento na hiperativação espontânea de espermatozóides de homens suplementados com vitamina E.

Donnelly, McClure e Lewis (1999) observaram que a suplementação *in vitro* com vitamina E não promove nenhum efeito sobre a hiperativação de sêmen humano a fresco.

6.4.2 Teste de expansão hipo-osmótico (HOST)

Quando se analisou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a porcentagem de células com membrana espermática íntegra pós-descongelamento pelo HOST (HIPOC) observou-se uma tendência de efeito da vitamina E ($p=0,0563$) sobre este parâmetro.

Avaliando este fator separadamente verificou-se que os animais suplementados apresentaram menor porcentagem de células íntegras que os animais não suplementados no sêmen pós-descongelamento ($30,42 \pm 3,02$ vs. $38,22 \pm 3,04$, $p=0,0817$).

Quando se avaliou o efeito do congelamento sobre este parâmetro, através da comparação entre a porcentagem de células com membrana espermática íntegra

pelo HOST do sêmen a fresco (HIPO) e do sêmen congelado (HIPOC), observou -se efeito do congelamento ($p < 0,0001$), da interação estresse*vitaminaE*congelamento ($p = 0,0116$) e uma tendência de efeito do estresse ($p = 0,0631$).

Tabela 27 – Efeito do tratamento sobre a média $\pm$ erro padrão da porcentagem (%) de células íntegras pelo HOST do sêmen fresco (HIPO) e do sêmen pós-descongelamento (HIPOC) de cães da raça rotweiler

Trat	HIPO	HIPOC	p^*
1	87,93 $\pm$ 1,02 ^A	33,39 $\pm$ 4,08 ^A	<0,0001
2	89,60 $\pm$ 0,65 ^A	35,63 $\pm$ 4,69 ^A	<0,0001
3	77,98 $\pm$ 3,26 ^B	25,97 $\pm$ 4,32 ^A	<0,0001
4	85,92 $\pm$ 1,31 ^A	40,82 $\pm$ 3,93 ^A	<0,0001
Média	85,75 $\pm$ 0,87	33,72 $\pm$ 2,21	<0,0001

1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação

*...referente a comparação entre HIPO e HIPOC

A, B, C....letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

A porcentagem de células íntegras pelo HOST após o descongelamento foi significativamente menor em todos os tratamentos (Tabela 27) indicando que o congelamento foi extremamente deletério para a membrana espermática. Hammadeh et al. (1999) encontraram resultados semelhantes em humanos.

6.4.3 Coloração com sondas fluorescentes

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a porcentagem de células com membrana íntegra através da coloração com as sondas fluorescentes IP/CDF verificou-se efeito da semana ($p < 0,00001$) sobre este parâmetro pré (FLUO 1) e pós-capacitação (FLUO 2). Verificou-se uma tendência de efeito da interação estresse*vitamina E ($p = 0,0770$) sobre a porcentagem de células com membrana íntegra através da coloração com sondas fluorescentes pós-capacitação (FLUO 2).

Tabela 28 – Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) em função do estresse sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) porcentagem de células com membrana íntegra através da coloração com sondas fluorescentes pré (FLUO 1) e pós-capacitação (FLUO 2) de sêmen congelado de cães da raça rotweiller

	Com Estresse			Sem Estresse		
	Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
FLUO 1	30,64 $\pm$ 5,35	34,24 $\pm$ 7,61	0,7609	36,99 $\pm$ 6,08	34,57 $\pm$ 8,09	0,6668
FLUO 2	26,63 $\pm$ 4,92	17,95 $\pm$ 4,99	0,023	18,32 $\pm$ 5,54	22,82 $\pm$ 3,57	0,1751

*referente à comparação entre com e sem suplementação com vitamina E dos animais com estresse

** referente à comparação entre com sem suplementação com vitamina E dos animais sem estresse

A vitamina E promoveu um aumento na porcentagem de células íntegras pós-capacitação espermática (FLUO 2) em animais submetidos à condição de estresse (Tabela 28).

Tabela 29 – Efeito do estresse (Stress) em função da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão (Md $\pm$ EP) porcentagem de células com membrana íntegra através da coloração com sondas fluorescentes pré (FLUO 1) e pós-capacitação (FLUO 2) de sêmen congelado de cães da raça rotweiller

	Com vitamina E			Sem vitamina E		
	Com Stress	Sem Stress	p^*	Com Stress	Sem Stress	p^{**}
FLUO 1	30,64 $\pm$ 5,35	36,99 $\pm$ 6,08	0,3420	34,24 $\pm$ 7,61	34,57 $\pm$ 8,09	0,9131
FLUO 2	26,63 $\pm$ 4,92	18,32 $\pm$ 5,54	0,2295	17,95 $\pm$ 4,99	22,82 $\pm$ 3,57	0,1713

*referente à comparação entre com e sem estresse dos animais suplementados com vitamina E

** referente à comparação entre com e sem estresse dos animais não suplementados com vitamina E

Cunha (2002) observou que, em cães, o processo de congelamento com meio TRIS e descongelamento rápido (8 segundos a 72°C) não provocou alterações na porcentagem de células com membrana espermática íntegra da através da coloração com sondas fluorescente IP/CDF.

Tabela 30 – Efeito da capacitação espermática sobre a média $\pm$ erro padrão da porcentagem de células íntegras segundo a coloração com sondas fluorescentes IP/DCF de cães da raça rotweiller antes (FLUO 1) e após (FLUO 2) a capacitação espermática segundo o tratamento

Tratamento	FLUO 1	FLUO2	p^*
1	30,64 $\pm$ 5,35 ^A	26,63 $\pm$ 4,92 ^A	0,7420
2	34,24 $\pm$ 7,61 ^A	17,95 $\pm$ 4,99 ^A	0,1686
3	36,99 $\pm$ 3,08 ^A	18,32 $\pm$ 5,54 ^A	0,4217
4	34,57 $\pm$ 8,09 ^A	22,82 $\pm$ 3,57 ^A	0,0140
Média	33,71 $\pm$ 3,23	21,58 $\pm$ 2,42	0,0093

1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação

* ...referente a comparação FLUO 1 e FLUO 2

A, B, C...letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Avaliando o efeito da capacitação sobre a porcentagem de células com membrana íntegra através da coloração com as sondas fluorescentes IP/CDF através da comparação entre FLUO 1 e FLUO 2, observou-se que valores pré (FLUO 1) e pós (FLUO 2) capacitação diferiram ($p=0,0054$).

6.4.4 Coloração acrossomal simples

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a porcentagem de células com a membrana acrossomal íntegra através da coloração acrossomal simples (POPE), observou-se efeito da semana ($p=0,0170$) e da vitamina E ($p=0,0214$) sobre esta porcentagem pós-capacitação (POPE 2) e uma tendência de efeito ($p=0,0656$) da vitamina E sobre a porcentagem pré-capacitação (POPE 1).

Tabela 31 – Efeito da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) porcentagem de células espermáticas com membrana acrossomal íntegra pela coloração acrossomal simples de sêmen congelado pré (POPE 1) e pós-capacitação (POPE 2). de cães da raça rotweiler

	Vitamina E		p^*
	Com	Sem	
POPE 1	44,98 $\pm$ 2,07	51,92 $\pm$ 2,33	0,0306
POPE 2	41,57 $\pm$ 2,49	49,31 $\pm$ 2,17	0,0283

*...referente a comparação entre com e sem vitamina

A suplementação oral com vitamina E reduziu os danos na membrana acrossomal antes (POPE 1) e após (POPE 2) a capacitação espermática (Tabela 31).

Através da análise de variância verificou-se se havia efeito do congelamento sobre a porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra pela coloração acrossomal simples através da comparação entre os valores pré (POPE 1) e pós (POPE 2) congelamento. Entretanto, observou-se que os valores não diferiram ($p=0,1956$), indicando que a perda acrossomal decorrente do processo de capacitação foi mínima (Tabela 32).

Tabela 32 – Efeito da capacitação espermática sobre a média $\pm$ erro padrão da porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra (POPE) de sêmen congelado de cães da raça rotweiller segundo o tratamento

Trat	Antes (POPE 1)	Depois (POPE 2)	p*
1	44,54 $\pm$ 2,83 ^A	41,15 $\pm$ 2,81 ^A	0,4011
2	53,73 $\pm$ 3,15 ^A	52,17 $\pm$ 3,27 ^A	0,7351
3	45,63 $\pm$ 3,09 ^A	42,21 $\pm$ 4,75 ^A	0,4013
4	49,95 $\pm$ 3,53 ^A	46,18 $\pm$ 2,64 ^A	0,5532
Média	47,99 $\pm$ 1,60	44,93 $\pm$ 1,76	0,2022

1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação

*...referente a comparação entre POPE 1 e POPE2

A, B, C...letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença segundo o teste de Tuckey

Utilizando a coloração Spermac®, Oettlé (1986) observou redução de 31,75% na integridade acrossomal do sêmen canino pós-descongelamento quando comparado com os valores pré-congelamento.

Marin-Guzman, Mahan e Whitmoyer (2000) observaram que cachorros alimentados com baixos níveis de vitamina E (menos que 4,4 mg/kg de dieta)

durante a desmama até a maturidade sexual, não apresentaram nenhum efeito aparente sobre a integridade estrutural do acrossoma.

6.4.5 Viabilidade espermática

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre a viabilidade espermática observou-se efeito da semana ($p=0,0240$) sobre este parâmetro pré capacitação (EOSI 1), e da vitamina E ($p=0,0041$) e da semana ($p=0,0141$) sobre a viabilidade espermática pós capacitação (EOSI 2).

Tabela 33 – Efeito da suplementação com vitamina E sobre a média e o erro padrão ($Md \pm EP$) da viabilidade (porcentagem de células vivas) espermática pré (EOSI 1) e pós (EOSI 2) capacitação espermática do sêmen congelado de cães da raça rotweiler

	Vitamina E		p^*
	Com	Sem	
EOSI 1	19,48 $\pm$ 3,60	23,50 $\pm$ 4,18	0,2059
EOSI 2	7,45 $\pm$ 0,93	12,96 $\pm$ 2,22	0,0084

*...referente a comparação entre animais com e sem suplementação de vitamina E

Os animais suplementados com vitamina E apresentaram menor viabilidade espermática quando comparados aos animais não suplementados (Tabela 33).

Avaliou-se o efeito da capacitação espermática sobre a viabilidade espermática através da comparação entre EOSI 1 e EOSI 2 e observou-se que houve diferença ($p=0,0002$) entre eles.

Tabela 34 – Efeito da capacitação espermática sobre a média $\pm$ erro padrão da viabilidade espermática (EOS) de cães da raça rotweiler segundo o tratamento

Trat	Antes (EOS 1)	Depois (EOS 2)	p*
1	16,38 $\pm$ 4,21 ^A	7,56 $\pm$ 1,01 ^{AB}	0,0578
2	26,43 $\pm$ 5,86 ^A	13,47 $\pm$ 4,08 ^{AB}	0,0565
3	24,15 $\pm$ 6,42 ^A	7,30 $\pm$ 1,82 ^A	0,4680
4	20,30 $\pm$ 6,10 ^A	12,42 $\pm$ 1,66 ^B	0,0519
Média	21,23 $\pm$ 2,72	9,70 $\pm$ 1,14	0,0005

1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação

*...referente a comparação entre EOSI 1 e EOSI 2

A, B, C...letras diferentes em uma mesma coluna indicam que houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

O processo de capacitação espermática induziu a redução na viabilidade espermática em todos os tratamentos (Tabela 34).

Observando os dados observa-se que o sêmen pós descongelamento (EOSI 1) não apresentou boa viabilidade, indicando que o processo de criopreservação foi altamente lesivo para as células.

De acordo com Rota et al. (1999), a morte “precoce” dos espermatozóides congelados pode ser reflexo de danos ocorridos durante o processo de criopreservação e estes danos promovem alterações semelhantes ao processo de capacitação no espermatozóide criopreservado.

6.4.6 Coloração tripla (*Triple stain*)

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre os resultados da coloração tripla pré-capacitação espermática observou-se efeito da semana ($p=0,0043$) sobre a classe 1 (TRI 1-1); efeito da semana ($p<0,0001$), da interação estresse*vitamina E*semana ($p=0,0043$) e uma tendência de efeito do estresse ($p=0,0594$) sobre a classe 2 (TRI 2-1); efeito da semana ($p<0,0001$) sobre a classe 3 (TRI 3-1); efeito da semana ($p=0,0251$) sobre a classe 4 (TRI 4-1).

Quando se avaliou o efeito das variáveis classificatórias e suas interações sobre os dados provenientes da coloração tripla pós-capacitação espermática demonstrou-se tendência de efeito de estresse ($p=0,0948$) e vitamina E ($p=0,0962$) sobre a classe 1 (TRI 1-2); efeito de estresse ($p=0,0466$) e tendência de efeito da semana ($p=0,0571$) sobre a classe 2 (TRI 2-2); efeito da semana ($p=0,0492$) sobre a classe 3 (TRI 3-2); efeito de estresse ($p=0,0209$) sobre a classe 4 (TRI 4-2).

Tabela 35 - Efeito do estresse (stress) sobre a média e o erro padrão (M±EP) da porcentagem de células pertencentes às classes obtidas através da coloração tripla de espermatozóides congelados pré e pós capacitação espermática

Classe	Pré-capacitação			Pós-capacitação		
	Com stress	Sem stress	p^*	Com stress	Sem stress	p^{**}
1	25,06±2,92	26,34±3,62	0,7645	4,98±1,22	2,16±0,51	0,0362
2	37,73±4,13	30,26±4,48	0,3123	22,59±3,34	13,04±2,16	0,0556
3	26,65±4,18	26,46±4,36	0,1892	35,78±2,75	35,64±3,12	0,9739
4	13,79±2,16	16,93±2,91	0,1595	36,99±2,47	49,06±3,55	0,0058

Classes: 1 – espermatozóide vivo com membrana acrossomal íntegra, 2 – espermatozóide vivo com membrana acrossomal não íntegra (reação de acrossoma), 3 – espermatozóide morto com membrana acrossomal íntegra, 4 – espermatozóide morto com membrana acrossomal não íntegra (reação acrossomal degenerativa)

*...referente a comparação entre os animais com e sem estresse antes da capacitação espermática

**...referente a comparação entre os animais com e sem estresse após a capacitação espermática

A condição de estresse exerceu efeito somente nos valores obtidos após a capacitação espermática (Tabela 35). Verificou-se aumento da porcentagem de espermatozóides classe 1 (espermatozóides vivos com acrossoma intacto) e redução da porcentagem de espermatozóides classe 4 (espermatozóides mortos com reação de acrossoma degenerativa).

Tabela 36 - Efeito da suplementação com vitamina E (VitE) sobre a média e o erro padrão ($M \pm EP$) da porcentagem de células pertencentes às classes obtidas através da coloração tripla de espermatozóides congelados pré e pós capacitação espermática

Classe	Pré-capacitação			Pós-capacitação		
	Com VitE	Sem VitE	p^*	Com VitE	Sem VitE	p^{**}
1	25,95 $\pm$ 3,13	25,18 $\pm$ 3,32	0,9397	2,97 $\pm$ 1,22	2,17 $\pm$ 0,51	0,0712
2	32,56 $\pm$ 4,11	37,02 $\pm$ 4,61	0,3990	17,90 $\pm$ 3,28	19,44 $\pm$ 2,80	0,0941
3	26,50 $\pm$ 4,09	22,74 $\pm$ 4,50	0,2463	38,06 $\pm$ 3,02	32,53 $\pm$ 2,44	0,1847
4	15,22 $\pm$ 2,42	15,06 $\pm$ 2,59	0,4186	39,33 $\pm$ 3,19	45,86 $\pm$ 2,79	0,1467

Classes: 1 – espermatozóide vivo com membrana acrossomal íntegra, 2 – espermatozóide vivo com membrana acrossomal não íntegra (reação de acrossoma), 3 – espermatozóide morto com membrana acrossomal íntegra, 4 – espermatozóide morto com membrana acrossomal não íntegra (reação acrossomal degenerativa)

*...referente a comparação entre os animais com e sem estresse antes da capacitação espermática

**...referente a comparação entre os animais com e sem estresse após a capacitação espermática

Houve uma tendência de efeito da suplementação com vitamina E sobre as classes obtidas através da coloração tripla somente após a capacitação espermática (Tabela 36). A suplementação oral com vitamina E promoveu aumento dos espermatozóides classe 1 (espermatozóides vivos com acrossoma intacto) e redução dos espermatozóides de classe 2 (espermatozóides vivos com reação de acrossoma).

Quando se avaliaram o efeito do procedimento de capacitação sobre as classes de células segundo a coloração tripla, através da comparação entre os valores obtidos antes e após este procedimento, demonstraram-se a existência de efeito do procedimento em todas as classes, classe 1 ($p < 0,0001$), classe 2 ($p < 0,0001$), classe 3 ($p = 0,0003$) e classe 4 ($p < 0,0001$). Entretanto, o tratamento não influenciou na distribuição dos espermatozóides dentro das classes.

Tabela 37 – Efeito da capacitação espermática sobre a média $\pm$ erro padrão da porcentagem de espermatozóides classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4 através da coloração tripla do sêmen congelado de cães da raça rotweiller

Tratamento	Classe 1		Classe 2		Classe 3		Classe 4	
	TRI 1-1	TRI 1-2	TRI 2-1	TRI 2-2	TRI 3-1	TRI 3-2	TRI 4-1	TRI 4-2
1	24,72	6,03	38,12	22,98	23,72	36,40	13,83	35,14
	$\pm 3,83$	$\pm 1,96$	$\pm 5,45$	$\pm 5,08$	$\pm 5,76$	$\pm 4,20$	$\pm 2,87$	$\pm 3,86$
2	25,58	3,39	37,16	22,01	23,53	34,85	13,72	39,75
	$\pm 4,70$	$\pm 0,73$	$\pm 6,59$	$\pm 3,71$	$\pm 6,20$	$\pm 2,98$	$\pm 3,40$	$\pm 2,07$
3	27,80	3,38	24,21	10,28	30,67	40,55	17,31	45,62
	$\pm 5,47$	$\pm 0,74$	$\pm 5,65$	$\pm 1,55$	$\pm 5,53$	$\pm 4,28$	$\pm 4,32$	$\pm 5,14$
4	24,75	0,69	36,86	16,35	21,87	29,76	16,52	53,20
	$\pm 4,91$	$\pm 0,33$	$\pm 6,76$	$\pm 4,26$	$\pm 6,83$	$\pm 4,00$	$\pm 4,08$	$\pm 4,75$
M	25,62	5,03	34,49	18,26	24,87	35,09	15,15	41,36
d ¹	$\pm 2,26$	$\pm 1,45$	$\pm 3,05$	$\pm 2,19$	$\pm 3,01$	$\pm 2,10$	$\pm 1,75$	$\pm 2,29$
p*	<0,0001		<0,0001		0,0007		<0,0001	

Tratamento: 1 -com estresse com suplementação; 2 -com estresse sem suplementação; 3 -sem estresse com suplementação; 4 -sem estresse sem suplementação

1... média geral da classe estabelecida pela coloração tripla

*...referente a comparação antes e depois da capacitação dentro de uma mesma classe

Classes pré capacitação: TRI 1-1 – espermatozóide vivo com membrana acrossomal íntegra, TRI 2-1 – espermatozóide vivo com membrana acrossomal não íntegra (reação de acrossoma), TRI 3-1 – espermatozóide morto com membrana acrossomal íntegra, TRI 4-1 – espermatozóide morto com membrana acrossomal não íntegra (reação acrossomal degenerativa)

Classes pós capacitação: TRI 1-2 – espermatozóide vivo com membrana acrossomal íntegra, TRI 2-2 – espermatozóide vivo com membrana acrossomal não íntegra (reação de acrossoma), TRI 3-2 – espermatozóide morto com membrana acrossomal íntegra, TRI 4-2 – espermatozóide morto com membrana acrossomal não íntegra (reação acrossomal degenerativa)

Os dados da tabela 37 demonstram que houve uma redução de espermatozóides classificados como classe 1 (espermatozóide vivo com acrossoma intacto) e classe 2 (espermatozóide íntegro com acrossoma reagido) e um aumento

dos espermatozoides classificados como classe 3 (espermatozoide morto com acrossoma íntegro) e classe 4 (espermatozoide morto com degeneração do acrossoma) após o procedimento de capacitação.

Kawakami et al. (1993) observaram que, em cães, a coloração tripla com “tripan blue” não oferece uma leitura fácil uma vez que há dificuldade em diferenciar espermatozoides viáveis e não viáveis. Segundo estes autores algumas células apresentam diferenças muito sutis na sua coloração possibilitando diferentes classificações quando avaliadas por técnicos diferentes.

Esta dificuldade também foi observada neste experimento. As células que se apresentassem com uma coloração que gerasse dúvidas foram desprezadas e não foram utilizadas na contagem.

6.5 Correlações

Todas as correlações encontram-se no ANEXO L. Para o cálculo das correlações utilizaram-se os dados originais e transformados. A classificação das correlações obedeceu ao seguinte critério: abaixo de 30% - correlação baixa; de 30 à 80% – correlação média; acima de 80% - correlação alta. As correlações que apresentaram $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas, quando o valor de p encontrado estava entre $0,05 < p < 0,10$ considerou-se como tendência de efeito da correlação.

Para melhor avaliação, as alterações morfológicas além de serem agrupadas em defeitos maiores (DEFMA), menores (DEFME) e totais (DEFTOT); também foram agrupadas em defeitos de cabeça (CAB), acrossomo (ACRO) e cauda (CAUDA).

A testosterona plasmática (TESTO) apresentou correlações com as alterações morfológicas DEFMA ($r=-0,161$; $p=0,023$), DEFME ($r=-0,166$; $p=0,018$), DEFTOT ($r=-0,209$; $p=0,003$), CAUDA ($r=-0,236$; $p=0,001$), confirmando a sua importância em todas as fases da espermatogênese (KRESTER, 1995), a TESTO também correlacionou-se com a concentração de glutathione peroxidase no plasma seminal (GLUT, $r=0,204$; $p=0,012$).

A motilidade espermática (MOT) apresentou correlação com as alterações morfológicas (DEFMA, $r=-0,421$; $p<0,0001$; DEFME, $r=-0,354$; $p<0,0001$; CAB $r=-0,164$; $p=0,014$; ACRO, $r=-0,343$; $p<0,0001$; CAUDA, $r=-0,283$; $p<0,0001$). Essas correlações são esperadas uma vez que muitas destas alterações reduzem a capacidade do espermatozóide em se movimentar.

Baptista Sobrinho (2002) observou, em cães, correlação entre a motilidade e DEFMA ($r=-0,4578$, $p<0,0001$) e DEFTOT ($r=-0,40899$, $p<0,0001$). A correlação encontrada por este autor assemelha-se a encontrada neste trabalho indicando que tanto o estresse de trabalho quanto o estresse induzido pela DXO atuam de maneira semelhante sobre a produção de espermatozoides (espermatogênese).

Kawakami et al. (1993) observaram correlação ($r=0,86$, $p<0,05$) entre motilidade e porcentagem de células viáveis segundo a coloração tripla (classes 1 e 2). Neste trabalho, esta correlação foi mais baixa ($r=0,218$; $p=0,028$). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que os autores não aplicaram nenhum tratamento sobre os animais o que não ocorreu neste experimento.

Oettlé (1986) não observou correlação entre motilidade e integridade acrossomal (avaliada através da coloração Spermac®) no sêmen pós-descongelamento. Contrariando este achado verificou-se neste trabalho correlação entre a motilidade e as classes 1 e 3 da coloração tripla que identificam acrossoma íntegro ($r=0,26162$; $p=0,0082$) e entre motilidade e células com membrana acrossomal íntegra pela coloração simples ($r=0,32410$, $p=0,0009$).

Entretanto, Kumi-Diaka e Badtram (1994) também não observaram correlação entre motilidade e defeitos de acrossomo.

A porcentagem de células com membrana íntegra pelo HOST (HIPO) apresentou correlação de grau variável com as diferentes alterações morfológicas (DEFMA, $r=-0,58251$; $p < 0,0001$; DEFME, $r=-0,33382$, $p < 0,0001$; DEFTOT, $r=-0,610$; $p < 0,0001$; CAB, $r=-0,263$; $p=0,0001$; ACRO, $r=-0,509$; $p < 0,0001$; CAUDA, $r=-0,514$; $p < 0,0001$). Estas correlações eram esperadas, pois muitas vezes as alterações morfológicas espermáticas podem estar associadas a alterações na integridade e funcionalidade da membrana espermática.

Kumi-Diaka e Badtram (1994) não observaram correlação entre HOST e defeitos de acrossoma no sêmen canino.

O HIPO apresentou ainda, correlações com FLUO 2 ($r=-0,322$; $p=0,033$), MOT ($p=0,607$; $p < 0,0001$), VIG ($r=0,348$; $p < 0,0001$), PH ($r=0,220$; $p=0,001$), CONC ($r=0,179$; $p=0,009$).

Dadenkar et al. (2002) observaram correlação positiva entre HOST e a peroxidação lipídica e entre HOST e a atividade da SOD e da GPx em humanos. Contudo, neste experimento essas correlações não mostraram-se significantes.

Kumi-Diaka e Badtram (1994) observaram uma correlação positiva entre HOST e motilidade ($r=0,98$, $p<0,0002$); HOST e reação de acrossoma ($r=0,83$; $p<0,04$) do sêmen canino fresco.

Souza (2003) verificou correlações entre HOST e a motilidade espermática ($p=0,96$, $p<0,0001$), o vigor espermático ($r=0,87$, $p<0,0001$), a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais ($r=0,87$, $p<0,0001$) e a porcentagem de defeitos de cauda ($r=-0,84$, $p<0,0001$).

Al-Mogazy et al. (1993) observaram correlação positiva entre HIPO e motilidade e negativa entre HIPO e a concentração espermática.

A porcentagem de células íntegras pelo HOST pós-congelamento (HIPOC) apresentou correlação com a SOD ($r=-0,417$; $p=0,024$), com a motilidade (MOT 0, $r=0,359$; $p=0,009$ e MOT 2, $r=0,542$; $p<0,0001$), com a porcentagem de células íntegras (FLUO2 $r=-0,302$; $p=0,037$) e viabilidade espermática (EOSI 2, $r=0,414$; $p=0,002$) pós capacitação. Também detectou-se correlação da variável HIPOC com a porcentagem de células com acrossoma reagido da coloração tripla pré capacitação (classe 2, TRI 2-1 $r=0,307$; $p=0,027$; e classe 4, TRI 4-1 $r=-0,518$; $p<0,0001$).

No sêmen resfriado, Kumi-Diaka e Badtram (1994) observaram correlações entre HOST e motilidade ($r=0,87$, $p<0,05$) e HOST e reação de acrossoma ($r=0,56$; $p<0,05$), corroborando com os achados do sêmen em congelado deste experimento.

A peroxidação lipídica (TBARS) apresentou correlação com SOD ($r=0,147$; $p=0,017$), GLUT ($r=0,157$; $p=0,011$) e ACRO ($r=0,189$, $p=0,015$).

Aitken et al. (1996) encontraram correlação entre TBARS e SOD ($r=-0,545$; $p<0,05$).

Rhemrev et al. (2001) observaram correlação entre TBARS e a motilidade ($p=-0,67$, $p<0,005$) em humanos. Segundo os autores, as células com movimento progressivo apresentavam também um competente sistema de defesa contra o estresse oxidativo. Os autores também consideraram que somente a sub-população de espermatozóides imóveis é que produziam quantidades significantes de TBARS.

Gil-Guzman et al. (2001) observaram que, em humanos, a produção de ROS é maior em espermatozóides imaturos com defeitos de cabeça ($r=0,64$; $p=0,002$) e que há uma correlação inversa entre os níveis de ROS e a capacidade anti-oxidante total do plasma seminal ($r=-0,55$; $p=0,02$).

A SOD apresentou correlação com a GLUT ($r=0,132$; $p=0,026$) e com a concentração espermática ($r=0,172$; $p=0,010$).

Hsieh et al. (2002) não observaram, em humanos, correlação entre SOD da célula espermática e do plasma seminal e a concentração espermática. Aitken et al. (1996) encontraram correlações entre a atividade da SOD e a morfologia ($r=-0,559$; $p<0,001$) e a motilidade ($r=-0,528$; $p<0,001$).

Beconi et al. (1991) observaram uma relação direta entre a atividade da SOD e a motilidade de sêmen bovino tanto fresco quanto congelado. Segundo os autores, a qualidade do sêmen pré-congelamento não interferiu nesta relação.

A GLUT apresentou correlação com os defeitos de cauda ($r=-0,166$; $p=0,030$) e com a classe 4 da coloração tripla pré capacitação espermática (TRI 4-1, células mortas com acrossoma reagido, $r=0,400$; $p=0,028$).

Dadenkar et al. (2002) observaram correlação entre a concentração espermática e a GPx.

A MOT 0 apresentou correlação com EOSI 1 ($r=0,455$; $p=0,001$), POPE 1 ($r=0,352$; $p=0,001$). A MOT 1 apresentou correlação com EOSI 1 ($r=0,842$; $p<0,0001$), EOSI 2 ($r=0,493$; $p=0,0003$), POPE 1 ($r=0,412$; $p=0,003$).

SOUZA (2003) observou que a porcentagem de células íntegras avaliadas através da coloração com sonda fluorescentes com IP/DC, em cães, correlacionou-se positivamente com a motilidade espermática ($r=0,92$; $p<0,0001$), com o vigor espermático ($r=0,84$; $p<0,0001$) e com a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais ($r=0,83$; $p<0,0001$); e negativamente aos defeitos de cabeça ($r=-0,41$, $p=0,04$) e defeitos de cauda ($r=0,86$, $p<0,0001$).

Observou-se correlação entre HOST e a classe 4 - espermatozóides mortos com acrossoma degenerado ($r=-0,518$, $p<0,0001$), e a porcentagem de células vivas pela coloração tripla – classes 1 e 2 ($r=0,372$, $p=0,007$), e a porcentagem de espermatozóides vivos com acrossoma reagido, classe 2 coloração tripla ($r=0,345$, $p=0,012$). Essas correlações são um indicativo de que o HOST também poderia ser utilizado para avaliar a capacitação espermática do sêmen canino.

Observou-se correlação ($r=0,312$; $p=0,001$) entre a porcentagem de células íntegras pela coloração fluorescente com IP/DCF e a porcentagem de espermatozóides vivos pela coloração tripla (classes 1 e 2).

Kawakami et al. (1993) observaram correlação positiva ($r=0,97$, $p<0,05$) entre a taxa de reação acrossômica determinada pela coloração FITC-PSA (sondas fluorescentes) e pela coloração tripla.

As correlações entre a coloração eosina/nigrosina (viabilidade espermática, EOSI) e porcentagem de espermatozóides vivos pela coloração tripla (classes 1 e 2) e a porcentagem de células com membrana íntegra pela coloração fluorescente com

IP/DCF (FLUO) foram não significantes ($r=0,112$, $p=0,256$ e $r=-0,080$, $p=0,425$, respectivamente).

A porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra pela coloração simples (POPE) e a porcentagem de células com acrossoma íntegro pela coloração tripla (classes 1 e 3) não se mostraram correlacionadas ($r=-0,049$, $p=0,617$).

Estes achados indicam que a coloração acrossomal simples e a coloração de eosina/nigrosina (viabilidade espermática) não podem ser utilizadas conjuntamente em substituição da coloração tripla.

Observa-se também correlação entre a coloração eosina/nigrosina (viabilidade espermática, EOSI) e a coloração simples da membrana acrossomal (POPE) na qual $r=0,342$ e $p=0,0003$.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infertilidade masculina é uma condição multi-fatorial que compreende uma variedade de etiologias, que incluem as mutações genéticas, anormalidades cromossômicas, doenças infecciosas, varicocele, radiação, quimioterapia, estresse, causas nutricionais, entre outros. Diminuição na concentração espermática bem como alterações morfológicas são achados freqüentes nas análises de sêmen de machos com infertilidade ou com sub-fertilidade (ONG; SHEN, CHIA, 2002). Determinar novos parâmetros para identificar os casos de sub-fertilidade tem sido o objetivo de vários grupos de pesquisa.

Vários testes que avaliam a integridade da membrana espermática foram utilizados neste trabalho, e o que demonstrou ter o melhor desempenho foi o HOST. Este é um teste simples de ser realizado, as soluções utilizadas são de fácil preparo, os equipamentos necessários para a sua realização são um banho-maria e um microscópio de luz e a sua leitura não necessita ser imediata. Associada a todas estas vantagens o HOST apresentou um grande número de correlações com outros parâmetros já estabelecidos como indicadores de fertilidade. Em razão disto pode-se dizer que o HOST demonstrou ser um excelente meio diagnóstico da integridade e funcionalidade da célula espermática canina.

A inexistência de correlação entre viabilidade espermática e HOST no sêmen pós descongelamento poderia ser explicada por alguma hipóteses. A membrana espermática poderia estar fisicamente intacta e o espermatozóide poderia não estar bioquimicamente funcional ou viável. A determinação da viabilidade através da coloração de eosina/nigrosina avalia somente se a membrana espermática está

fisicamente desestruturada devido a morte celular. Contudo, a membrana espermática poderia estar fisicamente intacta (podendo excluir o corante), mas quimicamente inativa, o que torna o HOST um teste mais sensível que a coloração de vivos e mortos (KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994).

A despeito da validade e utilização de diferentes testes para avaliação da integridade, tanto funcional como estrutural, da célula espermática, devemos lembrar que eles devem ser utilizados conjuntamente com a avaliação dos parâmetros seminais comumente utilizados, com o intuito de se aumentar a possibilidade de acerto da estimativa da fertilidade *in vivo* de cães.

Segundo Hammadeh et al. (1999), o sêmen de homens férteis com parâmetros seminais normais resiste melhor à crioinjúria que o de homens inférteis com valores seminais moderadamente baixos. Os cães utilizados neste experimento apresentavam parâmetros seminais normais, contudo o processo de congelamento e descongelamento foi altamente prejudicial para a célula espermática, indicando que talvez o espermatozóide canino seja mais sensível à crioinjúria que o humano.

Devemos lembrar também que as condições de congelamento não foram as ideais e sim as condições encontradas e, trabalhos de campo, o que poderia ter prejudicado a qualidade do material congelado.

O procedimento de lavagem mostrou-se deletério para a célula espermática. Rhemrev et al. (2001) afirmam que sub-populações de espermatozóides caracterizadas pela baixa motilidade e baixa fertilidade poderão produzir ROS como uma resposta ao estímulo mecânico da centrifugação aumentando a lesão da célula espermática.

Todos estes fatores associados contribuíram para explicar a baixa qualidade seminal pós descongelamento e os resultados insatisfatórios conseguidos na

capacitação espermática. Para se eliminar o efeito do congelamento sobre os parâmetros avaliados dever-se-ia ter realizado os mesmos testes no sêmen a fresco. No entanto esta alternativa tornou-se inviável uma vez que são necessários vários equipamentos que não poderiam ser deslocados para o local de coleta das amostras. Como o intuito deste experimento não era avaliar o procedimento de congelamento e todas as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento tomou-se como premissa que o efeito do congelamento foi comum a todos os tratamentos.

Neste trabalho observou-se que o estresse atua de maneira negativa sobre a maioria dos parâmetros seminais. Contudo, em alguns parâmetros observou-se um efeito benéfico do estresse.

O estresse em pequenas quantidades mostra-se benéfico para o organismo animal. É ele quem “prepara” todo o organismo nas situações de alerta e fuga. O grande problema é quando o estresse torna-se crônico e o sistema neuroendócrino é constantemente estimulado. Nesta condição toda a fisiologia animal é alterada e aí os efeitos deletérios do estresse tornam-se visíveis e deletérios.

A vitamina E demonstrou ser eficiente na prevenção e controle dos efeitos deletérios do estresse. Todavia, em alguns parâmetros ela mostrou ser mais deletéria que o próprio estresse. Isso pode ser devido ao seu poder pró-oxidante (BOLLE; EVANDRI; SASO, 2002). O grande desafio está em determinar qual a dose de vitamina E cujos benefícios superem os aspectos negativos.

Alguns trabalhos têm apresentado melhores resultados com a associação da vitamina E com a vitamina C (ASKARI et al., 1994; CASTELLINI et al., 2003; DONOGHUE.; DONOGHUE, 1997; HSU et al., 1998; ROLF et al., 1999). Nesta condição utilizam-se doses menores de vitamina E, pois uma das funções da

vitamina C é a de recuperar a vitamina E oxidada e assim mimetizar uma condição fisiológica. O único problema deste tipo de suplementação é que não se consegue isolar os efeitos, benéficos e deletérios, de cada uma das vitaminas.

8 CONCLUSÕES

- estresse altera de maneira negativa a célula espermática e a composição do plasma seminal.
- a suplementação oral com vitamina E modifica estes efeitos.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829-843, 2003.
- AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, n. 4, p. 191-194, 2002.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D. S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 4, p. 495-504, 1996.
- AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1037-1046, 1998.
- AL-MOGAZY, H. M.; AL-KHADRA, S.; KENAWY, G.; AL-ZEFTAWY, A.; MOSTAFA, T.; ATTIA, A.; ATTIA, A. M. Correlation between human sperm hypo-osmotic swelling test and other semen parameters **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 7, n. 4, p. 243-246, 1993.
- ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 5, p. 338-348, 1987.
- ASKARI, H. A.; CHECK, J. H.; PEYMER, N.; BOLLENDORF, A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. **Archives of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 11-15, 1994.
- AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in Lipid Research**, v. 39, n. 3, p. 231-255, 2000.
- BAPTISTA SOBRINHO, C. A. **Efeito do estresse de trabalho sobre os parâmetros seminais de cães**. 2002. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- BARTH, A. D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 4, p. 1-14, 1993. Suplemento.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, n. 2, p. 93-102, 1994.

BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHANG, L. M.; BEORLEGUI, N. B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; BERNADINA, W.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W.; MOL, J. A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. **Physiology & Behaviour**, v. 66, n. 2, p. 243-254, 1999.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; BERNADINA, W.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W.; MOL, J. A. Behaviour, salivary cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 58, p. 365-381, 1998.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; De VRIES, H. W. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 52, p. 307-319, 1997.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism**. 2. ed. Greene & Straton, 1975. p. 89-90.

BLATT, D. H.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G. Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 799-805, 2001.

BOLLE, P.; EVANDRI, M. G.; SASO, L. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. **Contraception**, v. 62, n. 4, p. 313-315, 2002.

BRADFORD, A.; ATKINSON, J.; FULLER, N.; RAND, R. O. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 10, p. 1940-1945, 2003.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 951-965, 1999.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A. B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. 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.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radical and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effect of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.

CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. Performance and stress. In: _____. **Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals**. St. Louis, ed. Mosby, 1995. p. 243-250.

CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A.; BEGHELLI, D. Effect of supranutritional level of dietary α -tocopherol acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1723-1732, 2002.

CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A.; MINELLI, A.; MUGNAI, C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 43, n. 1, p. 91-103, 2003.

COLBORN, D. R.; THOMPSON, D. L.; ROTH, L. H.; CAPEHART, J. S.; WHITE, K. L. Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 6, p. 2556-2562, 1991.

CUMMINS, J. M. Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviducts of mated ewes. **Gamete Research**, v. 6, n. 1, p. 53-63, 1982.

CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002, 149 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D.; ZUCCARI, C. E. S. N. Padronização da técnica fluorescente para a avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15. 1996, Campo Grande. **Proceedings...** Campo Grande, 1996. p. 411.

DANDEKAR, S. P.; NADKARNI, G. D.; KULKARNI, V. S.; PUNEKAR, S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 48, n. 3, p. 186-190, 2002.

DANIKOWSKI, S.; SALLMANN, H. P.; HALLE, I.; FLACHOWSKY, G. Influence of high levels of vitamin E on semen parameters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 86, n. 11-12, p. 376-382, 2002.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 15-21, 1995.

DI LUIGI, L.; GUIDETTI, L.; BALDARI, C.; FABBRI, A.; MORETTI, C.; ROMANELLI, F. Physical stress and qualitative gonadotropin secretion: LH biological activity at rest and after exercise in trained and untrained men. **International Journal of Sports Medicine**, v. 23, n. 5, p. 307-312, 2002.

DIPLOCK, A. T. The nutritional and metabolic roles of selenium and vitamin E. **Proceedins of Nutrition Society**, v. 33, n. 3, p. 315-322, 1974.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 451-461, 1995. Supplement.

DONNELLY, E. T.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 484-495, 1999.

DONOGHUE, A. M.; DONOGHUE, D. J. Effects of water-and liquid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. **Poultry Science**, v. 76, n. 10, p. 1440-1445, 1997.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. 785 p.

FELDMAN, S.; WEIDENFELD, J. Neural mechanisms involved in the corticosteroid feedback effects on the hypothalamic-pituitary-adrenomedullary axis. **Progress in Neurobiology**, v. 45, n. 2, p. 129-141, 1995.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Formation or removal of oxygen radicals. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 92-104, 1984.

FOOTE, R. H.; SWIERSTRA, E. E.; HUNT, W. L. Spermatogenesis in the dog. **Anatomy Record**, v. 173, n. 3, p. 341-352, 1972.

GEVA, E.; BARTOOV, B.; ZABLUDOVSKY, N.; LESSING, J. B.; LERNER-GEVA, L.; AMIT, A. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. **Fertility and Sterility**, v. 66, n. 3, p. 430-434, 1996.

GIBLIN, P. T.; POLAND, M. L.; MOGHISSI, K. S.; AGER, J. W.; OLSON, J. M. Effects of stress and characteristic adaptability on semen quality in healthy men. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 1, p. 127-132, 1988.

- GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; ALVAREZ, J. G.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1922-1930, 2001.
- GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector actions in biological systems. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 8, p. 1529-1542, 1998.
- GLANDER, H.J.; LAMMERT, A.; PAASCH, U.; GLASOW, A.; KRATZSCH, J. Leptin exist in tubuli seminiferi and in seminal plasma. **Andrologia**, v. 34, n. 4, p. 227-233, 2002.
- GUÉRIN, P.; FERRER, M.; FONTBONNE, A.; JACQUET, M.; MÉNÉZO, Y. In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chortetracycline staining. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 617-628, 1999.
- GURAYA, S. S. **Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals**. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1987. 430 p.
- HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB Journal**, v. 1, n. 4, p. 358-364, 1987.
- HAMMADEH, M. E.; ASKARI, A. S.; GEORG, T.; ROSENBAUM, P.; SCHMIDT, W. Effect of freeze-thawing procedure on cromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in infertile and subfertile men. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 155-162, 1999.
- HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBUSH, P. **Small animal clinical nutricion**. 4th ed. Nova York: Topeka, 2000.
- HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of goat epididymal spermatozoa to undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the egg plasma membrane. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 239-246, 1993.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 1329-1342, 1990.
- HENDIN, B. N.; KOLETTIS, P. N.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. T.; AGARWAL, A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 6, p. 1931-1834, 1999.

HOLLAND, M. K.; STOREY, B. T. Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididimal spermatozoa. **Biochemistry Journal**, v. 198, n. 2, p. 273-280, 1981.

HSIEH, Y. Y.; SUN, Y. L.; CHANG, C. L.; LEE, Y. S.; TSAI, H. D.; LIN, C. S. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 3, p. 127-131, 2002.

HSU, P. C.; LIU, M. Y.; HSU, C. C.; CHEN, L. Y.; GUO, Y. L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, v. 128, n. 3, p. 169-179, 1998.

IMAI, H.; SUMI, D.; HANAMOTO, A.; ARAI, M.; SUGIYAMA, A. Molecular cloning and functional expression of cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: 3'-untranslated region of the gene is necessary for functional expression **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 118, n. 5, p. 1061-1067, 1995.

IMAI, H.; SUZUKI, K.; ISHIZAKA, K.; ICHINOSE, S.; OSHIMA, H.; OKAYAEN, I.; EMOTO, K.; UMEDA, M.; NAGAWA, Y. Failure of the expression of fospholipid glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 674-683, 2001. Supplement 2.

IUCN. **The 2000 IUNC red list of threatened animals** (In the World Conservations Monitoring Center Animals Database). IUCN Publications service Unit, Cambridge, 2000.

JAKOBOVITS, A. A.; SZEKERES, L. Interactions of stress and reproduction – a personal view. **Zentralblatt für Gynäkologie**, v. 124, n. 4, p. 189-193, 2002.

JAMES, R. W.; HEYWOOD, R.; STREET, A. E. Biochemical observations on beagle dog semen. **Veterinary Record**, v. 104, n. 21, p. 480-482, 1979.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B. G.; ZANEVELD, L. J.D. Development of an assay to assess the funcnional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertiltity**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E.; SMITH, T. L.; KEILLOR, G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n. 2, p. 471-480, 2000.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, n. 2, p. 261-268, 1977.

KAWAKAMI, E.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Frequencies of semen collection in dogs with both asthenozoospermia and teratozoospermia. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 60, n. 5, p. 607-614, 1998.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C. A.; MAHI-BROWN, C. A.; TOLLNER, T. L.; OVERSTREET, J. W. Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 265, n. 5, p. 599-603, 1993.

KESSOPOULOU, E.; POWERS, H. J.; SHARMA, K. K.; PEARSON, M. J.; RUSSELL, J. M.; COOKE, I. D.; BARRATT, C. L. R. A double-blind randomized placebo cross-over trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 4, p. 825-831, 1995.

KRETZER, D. M. The testis. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Hormonal control of reproduction**, 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 76-90.

KUBOKAWA, K.; WATANABE, T.; YOSHIOKA, M.; IWATA, M. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormones and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. **Aquaculture**, v. 172, n. 3, p. 335-349, 1999.

KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 154-172, 2002.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.

KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v. 41, p. 1355-1366, 1994.

LENZI, A.; CULASSO, F.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; DONDERO, F. Placebo controlled double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1657-1662, 1993.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 3, p. 246-256, 1996.

LEWIS, S. E. M.; STERLING, E. S. L.; YOUNG, I. S.; THOMPSON, W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 1, p. 142-147, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACHILIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, v. 1, n. 5, p. 441-445, 1987.

MACHLIN, L. J. Vitamin E. In:_____. **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 99-145.

MAHI, C. A.; YANAGIMACHI, R. Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. **Gamet Research**, v. 1, p. 101-109, 1978.

MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzimology**, v. 113, p. 490-495, 1985.

MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; WHITMOYER, R. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extender semen on sperm motility. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1544-1550, 2000.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in phatophysilogic process. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, n. 4, p. 339-345, 1999.

MEDEIROS, C. M.; PARRISH, S. S. Changes in lectin binding to bovine sperm uring heparin-induced capacitation. **Molecular Reproduction Development**, v. 44, n. 4, p. 525-532, 1996.

MIESEL, R.; JEDRZEJCZAC, P. ; SANOCKA, D.; KURPISZ, M. K. Severe antioxidase deficiency in human semen samples with pathological spermiogram parameters. **Andrologia**, v. 29, n. 2, p. 77-83, 1997.

MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Neuroendocrine aspects of to response to stress. **Metabolism**, v. 51, n. 6, p. 5-10, 2002.

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

NRC **National Research Council**: nutrient requirements of dogs. Washington: National Academy Press, 1985. p. 78.

OETTLÉ, E. E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p. 145-150, 1986.

OETTLÉ, E. E.; SOLEY, T. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. **Veterinary Medicine Reviews**, v. 59, p. 28-70, 1988.

OHKAWA, H.; OHISH, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

ONG, C-N.; SHEN, A-M.; CHIA, S-E. Biomarkers for male reproductive health hazards: Are they available?. **Toxicology Letters**, v. 134, n. 1-3, p. 17-30, 2002.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 459-464, 2000.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

PURWELL, B. J.; FREEMAN, L. E. Reproduction in the canine male: anatomy, endocrinology and spermatogenesis. **Canine Practice**, v. 18, n. 3, p. 4-8, 1993.

QUINN, P. J. Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions?. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2004.

REICHMANN, M. L. A. B.; SANDOVAL, M. R. C.; AMADO, M. H. D.; TAKAOKA, N. Y. **Estratégias de controle da raiva canina – experiência do Estado de São Paulo** Disponível em:
<http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/anais/seminario_internacional/resumo_4_3.htm>. Acesso em: 30 ago. 2003.

REKKAS, C.; KOKOLIS, N.; BELIBASAKI, S.; TSANTARLIOTOU, M.; SMOKOVITIS, A. Effect of α -tocopherol on plasma testosterone and plasminogen activator activity or inhibition in ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 751-780, 2000.

RETANA-MÁRQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; MARTÍNEZ-GARCÍA, R.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 44, n. 4, p. 327-337, 2003.

RHEMREV, J. P. T.; VERMEIDEN, J. P. W.; HAENEN, G. R. M. M.; DE BRUIJNE, J. J.; REKERS-MOMBARG, L. T. M.; BAST, A. Progressively motile human

spermatozoa are well protected against *in vitro* lipid peroxidation imposed by induced oxidative stress. **Andrologia**, v. 33, n. 3, p. 151-158, 2001.

ROBERTI, J. W. Biological responses to stressors and the role of personality. **Life Science**, v. 73, n. 20, p. 2527-2531, 2003.

RODRIGUEZ-GIL, J. E.; MONT SERRAT, A.; RIGAUT, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, n. 5, p. 815-829, 1994.

ROLF, C.; COOPER, T.G.; YEUNG, C. H.; NIESCHLAG, E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1028-1033, 1999.

ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa**. 1998. 43 f. Tese (Doutorado em Animal Reproduction) Swendish University of Agricultural Sciences, Upsala, 1998.

ROTA, A.; PEÑA, A. I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. In vitro capacitation on fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 3-4, p. 199-215, 1999.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SANTOS, S. E. C. **Comparação entre cinco diluidores na congelação do sêmen de cães**. 1997. 64 f., Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SAS. **The statistical analyze systems for windows**: version 8. Cary, 1999-2001. CD-Rom.

SCHAFER, F. Q.; WANG, H. P. KELLEY, E. E.; CUENO, K. L.; MARTIN, S. M.; BUETTNER, G. R. Comparing β -carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. **Biology of Chemistry**, v. 383, n. 3-4, p. 671-661, 2002.

SEAGER, S.W.J.; PLATZ, C.C. Collection and evaluation of canine semen. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, n. 4, p. 757-764, 1977.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SHETAEWI, M. M. Efficacy of dietary high levels of antioxidant Vitamins C and E for rabbits subjected to crowding stress. **Egyptian Journal of Rabbit Science**, v. 8, n. 2, p. 95-112, 1998.

SHUPNIK, M. A.; SHCREIHOFER, D. A. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 341-344, 1997.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 78-86, 1996.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação artificial em cães. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002, p. 69-95.

SOUZA, F. F. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. 2003, 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

SUÁREZ, M.; FIOL DE CUNEO, M.; VICENTI, L.; RUIZ, R. D. Changes in corticosterone levels and sperm functional activity by chronic stress in rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 104, n. 3, p. 351-356, 1996.

SULEIMAN, S. A.; ELAMIN ALI, M.; ZAKI, Z. M. S.; EL-MALIK, A. M. A.; NASR, M. A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 530-537, 1996.

SURAI, P. F.; BRILLARD, J. P.; SPEAKE, B. K.; BLESBOIS, E.; SERGNEURIN, F.; SPARKS, N. H. C. Phospholipid fatty acid composition, vitamin e content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1025-1039, 2000.

SURAI, P. K., KUTZ, E., WISHART, G. J., NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. The relationship between the dietary provision of alpha-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, n. 1, p. 47-51, 1997.

SURAI, P., KOSTJUK, I., WISHART, G., MACPHERSON, A., SPEAKE, B., NOBLE, R., IONOV, I.; KUTZ, E. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biological Trace Elements Research**, v. 64, n. 1-3, p. 119-132, 1998.

TALBOT, P.; CHACON, R. S. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 215, n. 2, p. 201-208, 1981.

TEN, J.; VENDRELL, F. J.; CANO, A.; TARÍN, J. J. Dietary antioxidant supplementation did not affect declining sperm function with age in the mouse but did increase head abnormalities and reduced sperm production. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 37, n. 5, p. 481-492, 1997.

THEROND, P.; AUGER, J.; LEGRAND, A.; JOUANNET, P. Alpha-tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationship with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 10, p. 739-744, 1996.

THIEBIER, M.; ROLAND, O. The effect of dexamethasone (DXM) on circulating testosterone (T) and luteinizing hormone (LH) in young postpubertal bulls. **Theriogenology**, v. 5, n. 2, p. 53-60, 1976.

TIZABI, Y.; AGUILERA, G. Desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following prolonged administration of corticotrophin-releasing hormone or vasopressin. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 5, p. 611-618, 1992.

TSANTARLIOTOU, M. P.; TAITZOGLU, I. A.; GOULAS, P.; KOKOLIS, N. A. Dexamethasone reduces acrosin activity of ram spermatozoa. **Andrologia**, v. 34, n. 3, p. 188-193, 2002.

TSIGOS, C.; CHROUROS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 53, n. 4, p. 865-871, 2002.

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHÉ, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 27, n. 5432, p. 1393-1396, 1999

VERMA, A.; KANWAR, K. C. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. **Asian Journal of Andrology**, v. 1, n. 3, p. 151-154, 1999.

VÉZINA, D.; MAUFFETTE, F.; ROBERTS, K. D.; BLEAU, G. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. **Biological Trace Elements Research**, v. 53, n. 1, p. 65-83, 1996.

VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; BAME, J.H.; DEJARNETTE, J.M.; MCGILLIARD, M. L. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3827-3835, 1991.

WANG, X.; QUINN, P. J. Vitamin E and its function in membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 38, n. 4, p. 309-336, 1999.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase **Methods in Enzimology**, v. 77, p.325-333, 1981.

WEINBAUER, G.F.; WESSELS, J. "Paracrine" control of spermatogenesis. **Andrologia**, v. 31, n. 5, p. 249-262, 1999.

WELSH, T. H.; JOHNSON, B. H. Stress induced alterations in secretions of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone and testosterone bulls. **Endocrinology**, v. 109, n. 1, p. 185-190, 1981.

WHO World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992. p. 120.

WILDT, D. PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD J. G.; ROTH, T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 811-824, 1995.

WOUNG, W. Y.; THOMAS, M. G.; L.; MERKUS, M. W. M.; ZIELHUEIS, G. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 435-442, 2000.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In KNOBIL, E.; NEILL J. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 2004. 2. ed. p. 189-280p.

YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G. A.; KAMEL, K. I. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v. 76, n. 1-2, p. 99-111, 2003.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v. 55, n. 6, p. 922-926, 2000.

ANEXO A – Temperaturas mínimas, máximas e índices pluviométricos da cidade de Osasco, durante os dois períodos experimentais:

ANEXO B – Formulação da ração Must Premium, raças grandes, Socil Guyomarc'h.**Composição básica do produto**

Farinha de vísceras de frango, quirera de arroz, óleo de salmão, gordura de frango, polpa de beterraba, milho integral moído, farelo de trigo, hidrolisado de frango, fosfato monossódico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), premix vitamínico mineral e probiótico

NÍVEIS DE GARANTIA

Umidade (máx.) 10,0%; Proteína Bruta (mín.) 24,0%; Extrato Etéreo (mín.) 15,0%; Matéria Fibrosa (máx.) 4,0%; Matéria Mineral (máx.) 8,0%; Cálcio (Ca) (máx.) 1,3%; Fósforo (P) (mín.) 0,9%.

ANEXO C – Escore corporal**1. MUITO MAGRO**

As costelas são facilmente palpáveis, sem nenhuma cobertura adiposa. A inserção da cauda não apresenta estrutura perceptível entre a pele e o osso. Visto de cima as projeções vertebrais são facilmente visualizadas, particularmente no abdômen.

2. MAGRO

As costelas são facilmente palpáveis com um mínimo de cobertura adiposa. A base da cauda apresenta uma sutil cobertura tecidual entre a pele e o osso; visto de cima o arcabouço lombar não é tão proeminente.

3. IDEAL

As costelas são palpáveis com uma fina cobertura de gordura. As projeções vertebrais não são tão evidentes, visto por cima.

4. SOBREPESO

As costelas são palpadas com certa dificuldade, devido à cobertura de gordura. As proeminências ósseas são cobertas por uma cobertura adiposa moderada.

5. OBESO

As costelas são percebidas com muita dificuldade devido à cobertura acentuada de gordura. As proeminências ósseas são cobertas por cobertura adiposa, não permitindo individualiza-las. Presença de dobras de pele com bastante tecido gorduroso subcutâneo.

ANEXO D – Diuidor Tris-frutose-ácido cítrico

- 3,187g TRIS (hidroximetil-amino metano)
- 1,78g ácido cítrico
- 1,316g frutose
- 80mL de água destilada q.s.p.
- 4% de glicerol

- 20% de gema
- 1000 U.I. de penicilina/mL de diluidor
- 1000µg de estreptomicina/mL de diluidor

ANEXO E – Meio de Capacitação Canino (Canine Capacitation Médium – CCM; MAHI; YANAGIMACHI, 1978

- 4,880g NaCl
- 0,356g KCl
- 0,189g CaCl₂
- 0,162g KH₂PO₄
- 3,159g NaHCO₃
- 0,028g de piruvato de sódio
- 3,380mL de lactato de sódio
- 0,5g de glucose
- 0,020g de fenol red
- 0,050g de estreptomicina
- 0,065g de penicilina
- 2g de BSA
- 1000mL de água MilliQ q.s.p.

Ajustar a pH 7,8 e osmolaridade de 300mOsm. Esterilizar utilizando filtro de 0,2µm e conservar em refrigeração à 4°C.

ANEXO F – Soluções utilizadas no teste hipo-osmótico

- Solução Iso-osmótica (300mOsm/l)
 - 7,35g citrato de sódio di-hidratado
 - 13,51g de frutose
 - 500mL de água bi-destiladaVerificar a osmolaridade após o preparo.

- Solução Hipo-osmótica (60mOsmI)
Diluir a solução iso-osmótica na proporção de 1:5 e aferir a osmolaridade.

ANEXO G – Soluções utilizadas na técnica de coloração fluorescente (HARRISON e VICKERS, 1990)

- Solução estoque de 6-carboxifluoresceína
 - 9,2mg de diacetato de 6-carboxifluoresceína
 - 20mL dimetilsulfóxido (DMSO)
- Solução estoque de iodeto de propídeo
 - 10mg de iodeto de propídeo
 - 20mL solução fisiológica
- Solução estoque de formaldeído
Diluir formalina 40% em solução fisiológica na diluição de 1:80.
- Solução citrato de sódio a 3%
- Solução de trabalho
 - 20µL da solução estoque de diacetato de 6-carboxifluoresceína
 - 10µL da solução estoque de iodeto de propídeo
 - 10µL da solução estoque de formaldeído
 - 960 µL da solução de citrato de sódio a 3%Preparar no momento do uso.

ANEXO H – Coloração tripla (soluções).

- Tripan Blue (2%)
Dissolver 0,5g de “tripan blue” em 25 mL de NaCl 0.85%. Esterilizar utilizando filtro de 0.2µm. Alicotar em 1mL e conservar a –20°C. Previamente a sua utilização descongelar e equilibrar a 37°C.

- Glutaraldehído (3%)

Diluir 120µl de glutaraldehído (25%) com 880 µL do meio utilizado

- Bismarck Brown(0,8%)

Dissolver 2g de “bismarck brown” em 250mL de água destilada e o pH a 1,8 com HCl. Filtrar com papel filtro e guardar a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

- Rosa Bengala (0,8%)

Dissolver 2g de Rosa Bengala em 250mL de tampão Tris 0,1M. Ajustar o pH para 5,6 com HCl. Filtrar com papel filtro e guardar a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

ANEXO I – Coloração eosina/nigrosina (soluções).

Em 10 mL H₂O coloca-se 0,1g eosina Y (amarela). Aquecer sem deixar ferver. Adiciona-se 1g de nigrosina.

ANEXO J – Coloração acrossomal simples (soluções).

➤ Solução Tampão

- 16,5 mL de solução de fosfato dibásico 0,2M (Na₂HPO₄)
- 3,5 mL de solução de ácido cítrico 0,1M

Ajustar o pH para 7 com NaOH e/ou HCl, se necessário.

➤ Solução corante

- 8 mL de álcool etílico
- 12 mL da solução tampão
- 200 mg de corante rosa bengala
- 200 mg de corante “Fast green”

Manter a solução corante à temperatura ambiente e ao abrigo da luz

ANEXO K – Soluções utilizadas na determinação de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951).

- Solução de NaOH 0,1N (estoque, Reagente 1)
 - 0,4g de NaOH
 - 100mL de água bi-destilada
- Alkaline Cooper Reagent

Fazer no momento do uso. Misturar 100mL do reagente 2 com 2mL do reagente 3.
- Reagente 2 (estoque)
 - 2% de Na_2CO_3 (10g de carbonato de sódio)
 - 0,02% $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (0,01g de tartarato de sódio)
 - 500mL de reagente 1
- Reagente 3 (estoque)
 - 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - 0,02% $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (0,01g de tartarato de sódio)
 - 500mL do reagente 1
- Reagente de Folin diluído

Prepara no momento do uso. Diluir o Folin Reagent (Sigma F-4252, mantido sob refrigeração) na proporção de 1:1 com água bi-destilada.
- Solução padrão de proteína (para confecção da curva)

Manter sob refrigeração.

 - 10g de Albumina Sérica Bovina (BSA)
 - 10mL do reagente 1

ANEXO L – Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas

r p	CORT	TESTO	EC	ESCTD	ESCTE	VOL	MOT	VIG	PH	DENS	CONC	DEFMA	DEFME	DEFTOT
CORT	1,0000	0,02294 0,7453	0,00922 0,8946	0,00774 0,9138	0,12578 0,0696	-0,02540 0,7151	0,14721 0,0334	0,02397 0,7305	0,18022 0,0090	0,01707 0,8062	0,18117 0,0090	-0,01642 0,8153	0,24032 0,0005	0,10972 0,1173
TESTO		1,0000	-0,04407 0,5324	0,06316 0,3828	0,11011 0,1179	0,04421 0,5311	0,04248 0,5473	-0,05424 0,4421	0,02975 0,6735	-0,03715 0,5987	0,00780 0,9123	-0,16096 0,0228	-0,16651 0,0184	-0,20862 0,0030
EC			1,0000	0,03675 0,4658	0,05835 0,2339	-0,06885 0,1600	-0,38235 0,0001	-0,26761 0,0001	-0,06675 0,1732	0,06642 0,1753	-0,12827 0,0219	0,21012 0,0016	0,06961 0,2996	0,19280 0,0038
ESCTD				1,0000	0,42823 0,0001	0,01568 0,7558	0,15979 0,0014	0,13169 0,0087	-0,07624 0,1299	-0,02650 0,5991	0,11264 0,0505	-0,09857 0,1527	-0,00485 0,9441	-0,07758 0,2608
ESCTE					1,0000	-0,16993 0,0005	-0,12227 0,0124	-0,08970 0,0669	0,01142 0,8159	-0,08542 0,0811	0,02598 0,6439	0,03272 0,6262	0,25256 0,0001	0,15436 0,0208
VOL						1,0000	0,21611 0,0001	0,21262 0,0001	0,09128 0,0622	0,05856 0,2322	-0,26398 0,0001	-0,10988 0,1009	-0,08160 0,2238	-0,12407 0,0638
MOT							1,0000	0,70737 0,0001	0,13241 0,0067	0,07952 0,1045	0,29719 0,0001	-0,42086 0,0001	-0,07774 0,2465	-0,35443 0,0001
VIG								1,0000	0,06191 0,2065	0,12280 0,0120	0,20439 0,0002	-0,28349 0,0001	-0,08186 0,2223	-0,25392 0,0001
PH									1,0000	0,03066 0,5319	0,05116 0,3624	-0,18352 0,0059	-0,05376 0,4233	-0,16477 0,0135
DENS										1,0000	0,12587 0,0246	-0,05460 0,4161	0,04598 0,4936	-0,01715 0,7986
CONC											1,0000	-0,18666 0,0051	0,03425 0,6102	-0,12185 0,0687
DEFMA												1,0000	0,23060 0,0005	0,86576 0,0001
DEFME													1,0000	0,68662 0,0001
DEFTOT														1,0000

Legenda: Valor de p **Vermelho** – correlação significativa; **Azul**: correlação com tendência de efeito significativo (0,05<p<0,10);
Correlação **Magenta**: – correlação média e alta (maior que 30%) ; **Verde** – correlação baixa (menor que 30%),

continuação

ANEXO L– Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas

r p	CAB	ACRO	CAUDA	HIPO	MDA	PROT	SOD	GLUT	MOT0	VIG0	MOT1	VIG1	MOT2	VIG2
CORT	0,02276 0,7460	-0,09118 0,1935	0,15331 0,0282	-0,00557 0,9388	-0,12001 0,1422	-0,10713 0,1748	-0,01680 0,8351	-0,02973 0,7125	0,09800 0,4851	-0,20913 0,1329	-0,00846 0,9540	0,33340 0,0157	0,13220 0,3453	0,07040 0,6164
TESTO	-0,02046 0,7736	-0,04650 0,5132	-0,23597 0,0008	0,12963 0,0762	0,04259 0,6097	-0,08039 0,3169	-0,10592 0,1955	0,20367 0,0121	0,35809 0,0085	-0,14099 0,3139	0,25892 0,0724	0,27934 0,0449	0,12252 0,3821	0,15776 0,2592
EC	0,02437 0,7168	0,17797 0,0076	0,17430 0,0089	-0,27491 <0,0001	-0,10327 0,0868	0,07161 0,2217	-0,00345 0,9540	-0,01774 0,7668	-0,12590 0,3690	0,02239 0,8736	0,08339 0,5689	0,01641 0,9081	0,06049 0,6670	-0,09342 0,5058
ESCTD	-0,01491 0,8291	-0,07499 0,2771	-0,07048 0,3070	0,15307 0,0309	-0,03673 0,5555	-0,09095 0,1310	0,01206 0,8436	0,05218 0,3931	-0,05220 0,7105	-0,00049 0,9972	-0,19599 0,1771	-0,18770 0,1827	-0,27179 0,0490	-0,14619 0,2962
ESCTE	0,11492 0,0862	-0,07327 0,2748	0,17644 0,0081	0,01682 0,8086	0,04978 0,4100	-0,10993 0,0602	0,02542 0,6708	-0,05764 0,3348	-0,02409 0,8641	0,12621 0,3642	-0,23415 0,1054	-0,29068 0,0366	-0,25553 0,0648	-0,17354 0,2140
VOL	-0,04610 0,4924	0,01398 0,8351	-0,14122 0,0156	0,16136 0,0193	-0,15383 0,0105	-0,14122 0,0156	-0,12637 0,0339	-0,07907 0,1855	0,02811 0,8416	0,11535 0,4108	0,21791 0,1325	-0,17536 0,2137	0,08331 0,5532	0,01906 0,8922
MOT	-0,16365 0,0142	-0,34306 <0,0001	-0,28341 <0,0001	0,60755 <0,0001	-0,05692 0,3462	0,09055 0,1220	0,01866 0,7551	0,03314 0,5795	0,08242 0,5574	-0,20719 0,1366	0,09124 0,5330	0,32913 0,0172	0,19350 0,1650	0,14097 0,3140
VIG	-0,12305 0,0660	-0,24507 0,0002	-0,20166 0,0024	0,34765 <0,0001	-0,07168 0,2352	0,09446 0,1066	0,02145 0,7199	0,03279 0,5835	0,35490 0,0091	-0,20853 0,1340	-0,04171 0,7760	0,20841 0,1382	0,22627 0,1033	0,07110 0,6129
PH	-0,10351 0,1224	-0,12400 0,0639	-0,13462 0,0441	0,22006 0,0013	0,02403 0,6910	-0,01714 0,7702	-0,08942 0,1341	-0,14588 0,0142	-0,12074 0,3891	-0,04699 0,7383	-0,11516 0,4307	-0,05287 0,7097	0,05083 0,7177	-0,15081 0,2811
DENS	-0,14318 0,0322	-0,04596 0,4937	0,03170 0,6370	0,00436 0,9499	-0,01849 0,7598	0,12535 0,0320	0,21277 0,0003	0,02931 0,6241	-0,03478 0,8047	0,06677 0,6348	0,04943 0,7359	-0,20875 0,1375	-0,02319 0,8691	-0,07544 0,5914
CONC	-0,14183 0,0339	-0,10289 0,1247	-0,07850 0,2419	0,17951 0,0091	0,11476 0,0888	0,25259 <0,0001	0,17206 0,0097	0,04595 0,4928	-0,03570 0,7996	-0,22809 0,1005	0,01073 0,9417	0,31191 0,0244	0,03155 0,8225	0,00684 0,9612
DEFMA	0,5813 <0,0001	0,69955 <0,0001	0,69955 <0,0001	-0,58251 <0,0001	0,04832 0,5364	0,02583 0,7329	-0,08542 0,2666	-0,10803 0,1596	-0,22494 0,1054	0,07285 0,6042	-0,29705 0,0382	-0,22405 0,1103	-0,12046 0,3902	-0,16942 0,2252
DEFME	0,11019 0,1000	0,01857 0,7822	0,79368 <0,0001	-0,33382 <0,0001	-0,10249 0,1888	0,00979 0,8971	0,04983 0,5174	-0,10390 0,1762	-0,17552 0,2087	0,08909 0,5258	-0,08525 0,5603	0,11618 0,4121	-0,12417 0,3757	-0,10167 0,4688
DEFTOT	0,49310 <0,0001	0,48822 <0,0001	0,93088 <0,0001	-0,61014 <0,0001	-0,01441 0,8538	0,02440 0,7472	-0,04189 0,5865	-0,13520 0,0779	-0,28034 0,0420	0,11183 0,4253	-0,27221 0,0585	-0,08914 0,5297	-0,16982 0,2241	-0,19123 0,1702

Legenda: Valor de p Vermelho – correlação significativa; Azul: correlação com tendência de efeito significativo (0,05<p<0,10); Correlação Magenta:– correlação média e alta (maior que 30%) ; Verde – correlação baixa (menor que 30%),

continuação

ANEXO L – Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas

r	HIPOC	FLUO1	FLUO2	EOS1	EOS2	POPE1	POPE2	TRI1-1	TRIP2-1	TRIP3-1	TRIP4-1	TRI1-2	TRIP2-2	TRIP3-2	TRIP4-2
p															
CORT	0,12029 0,3956	0,30829 0,0247	0,25587 0,0760	0,01697 0,9040	-0,08919 0,5254	0,09936 0,4790	-0,08919 0,5254	-0,03144 0,8231	-0,00736 0,9583	0,06711 0,6331	-0,11900 0,3960	-0,10384 0,4638	0,33975 0,0137	-0,17069 0,2263	-0,15347 0,2774
TESTO	-0,10799 0,4461	0,18007 0,1970	0,30497 0,0331	0,23439 0,0912	0,17534 0,2092	0,29355 0,0329	0,17534 0,2092	-0,10718 0,4449	-0,06458 0,6459	0,03197 0,8202	0,02451 0,8617	0,06203 0,6622	0,01041 0,9416	0,00594 0,9667	-0,03101 0,8272
EC	-0,15453 0,2740	-0,13851 0,3226	0,02546 0,8621	0,01742 0,9015	0,06361 0,6509	-0,03615 0,7972	0,06361 0,6509	-0,13303 0,3423	-0,09832 0,4837	0,12071 0,3893	0,02892 0,8371	-0,30580 0,0275	-0,12353 0,3830	0,24083 0,0855	-0,00640 0,9641
ESCTD	-0,20205 0,1509	0,09078 0,5180	0,10136 0,4883	-0,19687 0,1577	-0,17796 0,2024	-0,04575 0,7449	-0,17796 0,2024	-0,02570 0,8551	0,04022 0,7749	-0,10198 0,4675	0,10635 0,4485	-0,00017 0,9990	0,01667 0,9066	-0,15210 0,2817	0,12643 0,3718
ESCTE	0,11492 0,0862	0,00451 0,9744	-0,02511 0,8640	-0,19750 0,1563	-0,07795 0,5790	-0,06336 0,6522	-0,07795 0,5790	0,06665 0,7944	0,04399 0,7545	-0,05878 0,6759	0,01042 0,9410	-0,01498 0,9161	-0,02502 0,8603	-0,09159 0,5184	0,11645 0,4110
VOL	0,10065 0,4777	0,22724 0,1018	0,06081 0,6781	0,17873 0,2004	0,30559 0,0261	0,37376 0,0058	0,30559 0,0261	-0,02241 0,8735	0,15719 0,2610	-0,09823 0,4841	-0,01534 0,9132	-0,12701 0,3696	-0,23638 0,0916	-0,06962 0,6238	0,33419 0,0155
MOT	0,12206 0,3887	0,15187 0,2777	-0,03378 0,8177	-0,01698 0,9039	0,01780 0,8993	0,07825 0,5775	0,01780 0,8993	-0,12449 0,3745	0,14678 0,2943	-0,12699 0,3649	0,09886 0,4813	0,25303 0,0703	0,23594 0,0922	-0,20241 0,1501	-0,12418 0,3804
VIG	0,22487 0,1090	0,15041 0,2824	-0,14464 0,3214	0,12596 0,3688	0,02723 0,8465	0,13815 0,3239	0,02723 0,8465	-0,03241 0,8178	0,17518 0,2096	-0,18814 0,1773	-0,00008 0,9995	0,08559 0,5466	0,11481 0,4177	-0,19025 0,1767	0,03515 0,8046
PH	0,07053 0,6193	0,35096 0,0100	0,12725 0,3836	-0,22240 0,1095	-0,27090 0,0498	-0,12076 0,3890	-0,27090 0,0498	0,29967 0,0293	0,25056 0,0704	-0,32957 0,0160	-0,23786 0,0863	0,05703 0,6880	0,20377 0,1474	-0,13435 0,3423	-0,10663 0,4518
DENS	0,01987 0,8888	0,13043 0,3519	0,28539 0,0468	0,08563 0,5421	0,08112 0,5637	0,15093 0,2807	0,08112 0,5637	-0,08431 0,5484	-0,18465 0,1856	0,17440 0,2117	0,09410 0,5027	0,01553 0,9130	0,15729 0,2654	-0,14909 0,2915	-0,02440 0,8636
CONC	0,04563 0,7481	-0,03308 0,6224	0,09549 0,5140	0,07214 0,6077	0,11335 0,4190	-0,06815 0,6278	0,11335 0,4190	-0,21873 0,1156	-0,28774 0,0367	0,32638 0,0171	0,07855 0,5761	-0,19351 0,1693	-0,13221 0,3501	0,14956 0,2899	0,06050 0,6701
DEFMA	-0,04846 0,7330	0,11838 0,3985	0,23178 0,1091	-0,14937 0,2858	-0,03530 0,8019	0,06068 0,6660	-0,03530 0,8019	0,05057 0,7191	0,15653 0,2630	-0,20597 0,1390	0,03786 0,7878	-0,11442 0,4193	0,06854 0,6293	-0,28870 0,0379	0,23088 0,0996
DEFME	-0,12260 0,3866	0,31916 0,0198	0,22154 0,1261	0,02674 0,8492	-0,22003 0,1134	0,03008 0,8207	-0,22003 0,1134	0,02435 0,8626	-0,04532 0,7473	0,01099 0,9378	0,01440 0,9185	-0,08512 0,5485	0,09907 0,4847	-0,06577 0,6432	-0,01454 0,9185
DEFTOT	-0,11551 0,4148	0,29549 0,0317	0,31407 0,0280	-0,09268 0,5092	-0,16956 0,2248	0,06436 0,6471	-0,16956 0,2248	0,05317 0,7054	0,08584 0,5411	-0,14469 0,3013	0,03731 0,7908	-0,13985 0,3227	0,11513 0,4164	-0,25568 0,0673	0,16069 0,2551

Legenda: Valor de p **Vermelho** – correlação significativa; **Azul**: correlação com tendência de efeito significativa ($0,05 < p < 0,10$);
Correlação Magenta – correlação média e alta (maior que 30%) ; **Verde** – correlação baixa (menor que 30%),

continuação

ANEXO L – Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas

r p	CAB	ACRO	CAUDA	HIPO	MDA	PROT	SOD	GLUT	MOT0	VIG0	MOT1	VIG1	MOT2	VIG2
CAB	1,0000	0,31999 <0,0001	0,22973 0,0005	-0,26278 0,0001	0,1477 0,8586	0,02682 0,7372	-0,03042 0,7099	-0,00386 0,9624	-0,22837 0,1000	0,14322 0,3063	-0,23085 0,1105	-0,24728 0,0772	-0,05195 0,7118	-0,01488 0,9158
ACRO		1,0000	0,21089 0,0010	-0,50891 <0,0001	0,18873 0,0149	0,07848 0,2991	0,04827 0,5307	-0,01035 0,8931	0,06278 0,6552	0,13494 0,3354	-0,19299 0,1840	-0,12757 0,3674	-0,18005 0,1970	-0,22807 0,1005
CAUDA			1,0000	-0,51420 <0,0001	-0,08327 0,2862	0,00027 0,9971	-0,05848 0,4474	-0,16644 0,0296	-0,27596 0,0455	0,04412 0,7538	-0,20060 0,1670	0,02729 0,8477	-0,14527 0,2993	-0,15620 0,2640
HIPO				1,0000	0,05751 0,4772	0,0914 0,2409	-0,03364 0,6718	0,11574 0,1467	-0,05992 0,6858	-0,04699 0,7383	0,24502 0,1089	-0,09411 0,5292	0,15057 0,3070	0,16644 0,2582
MDA					1,0000	0,07417 0,2236	0,14745 0,0171	0,15727 0,0109	0,05876 0,7709	-0,33194 0,0907	-0,10497 0,6023	-0,20670 0,3009	0,6191 0,7590	0,10311 0,6088
PROT						1,0000	0,28833 <0,0001	0,27502 <0,0001	-0,10571 0,5519	0,07802 0,6609	-0,17756 0,3151	0,09500 0,5931	0,09312 0,6004	-0,06068 0,7332
SOD							1,0000	0,13233 0,0263	0,07845 0,6803	0,07566 0,6911	-0,32571 0,0790	-0,08162 0,6681	-0,25851 0,1678	-0,20278 0,2825
GLUT								1,0000	0,20044 0,2882	-0,00435 0,9818	0,11000 0,5628	-0,08655 0,6493	-0,01469 0,9386	0,25181 0,1795
MOT 0									1,0000	-0,29489 0,0321	0,39454 0,0050	0,37206 0,0066	0,38878 0,0040	0,27361 0,0474
VIG 0										1,0000	-0,06342 0,6651	-0,35889 0,0091	-0,31731 0,0206	-0,41664 0,0019
MOT 1											1,0000	0,32869 0,0211	0,27576 0,0551	0,41607 0,0029
VIG 1												1,0000	0,38904 0,0044	0,34801 0,0115
MOT 2													1,0000	0,59006 <0,0001
VIG 2														1,0000

Legenda: Valor de p Vermelho – correlação significativa; Azul: correlação com tendência de efeito significativo (0,05<p<0,10); Correlação Magenta:– correlação média e alta (maior que 30%) ; Verde – correlação baixa (menor que 30%),

continuação

ANEXO L – Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas

r p	HIPOC	FLUO1	FLUO2	EOS1	EOS2	POPE1	POPE2	TRI1-1	TRIP2-1	TRIP3-1	TRIP4-1	TRI1-2	TRIP2-2	TRIP3-2	TRIP4-2
CAB	0,02763 0,8458	0,00956 0,9458	-0,00650 0,9646	-0,14446 0,3021	-0,10555 0,4519	-0,01027 0,7746	-0,10555 0,4519	0,07777 0,5799	0,16284 0,2446	-0,20095 0,1491	-0,01492 0,9156	-0,06704 0,6368	0,00381 0,9786	-0,24044 0,0860	0,23159 0,0985
ACRO	-0,06774 0,6333	-0,06416 0,6481	0,12809 0,3804	0,00475 0,9731	0,19236 0,1676	0,17389 0,2130	0,19236 0,1676	-0,20014 0,1507	0,05630 0,6888	-0,04621 0,7425	0,24023 0,0832	-0,01676 0,9061	0,00081 0,9955	-0,12466 0,3797	0,13118 0,3539
CAUDA	-0,14119 0,3181	0,39021 0,0039	0,36774 0,0093	-0,05707 0,6847	-0,22291 0,1086	0,05227 0,7101	-0,22291 0,1086	0,08856 0,5283	0,02393 0,8649	-0,08518 0,5442	-0,01120 0,9366	-0,14489 0,3055	0,14500 0,3051	-0,18851 0,1808	0,06931 0,6254
HIPO	0,14388 0,3346	-0,16515 0,2620	-0,32245 0,0328	0,01903 0,8979	0,07843 0,5962	-0,07214 0,6261	0,07843 0,5962	-0,02213 0,8813	-0,25539 0,0798	0,22761 0,1197	0,10698 0,4692	0,13016 0,3882	-0,11121 0,4568	0,21910 0,1390	-0,13738 0,3571
MDA	-0,16144 0,4308	-0,16029 0,4245	0,34054 0,0822	0,05229 0,7956	0,40607 0,0356	0,23963 0,2286	0,40607 0,0356	-0,32070 0,1029	0,12905 0,5212	-0,10347 0,6075	0,39644 0,0406	0,35202 0,0717	0,23525 0,2375	-0,33512 0,0875	0,09991 0,6200
PROT	0,01381 0,9392	-0,24213 0,1677	-0,17431 0,3242	-0,02315 0,8966	0,00953 0,9573	-0,25371 0,1477	0,00953 0,9573	-0,00525 0,9765	-0,06866 0,6996	-0,02023 0,9096	0,15645 0,3769	-0,07563 0,6708	0,07340 0,6800	0,19594 0,2667	-0,13028 0,4627
SOD	-0,41678 0,0245	0,15866 0,4024	0,33102 0,0740	-0,13350 0,4819	-0,38979 0,0332	-0,11642 0,5401	-0,38979 0,0332	0,14925 0,4312	-0,18553 0,3263	-0,03574 0,8513	0,28788 0,1229	0,16408 0,3863	0,25343 0,1766	0,06980 0,7140	-0,28538 0,1263
GLUT	-0,23233 0,2252	0,00075 0,9969	0,33844 0,0673	0,24945 0,1837	0,20144 0,2858	0,30584 0,1003	0,20144 0,2858	-0,20400 0,2796	-0,21816 0,2468	0,13329 0,4826	0,39994 0,0285	0,50667 0,0043	0,07024 0,7122	0,21430 0,2555	-0,32182 0,0829
MOT 0	0,35883 0,0090	0,00492 0,9721	-0,08504 0,5613	0,45509 0,0006	0,33944 0,0129	0,35173 0,0098	0,33944 0,0129	0,00085 0,9952	0,08299 0,5546	-0,02331 0,8684	-0,19839 0,1544	-0,04657 0,7430	0,01281 0,9282	0,01994 0,8884	0,02002 0,8880
VIG 0	-0,24386 0,0815	0,06797 0,6287	-0,03667 0,7943	-0,05668 0,6869	-0,23570 0,0893	-0,07032 0,6168	-0,23570 0,0893	-0,15485 0,2682	-0,11535 0,4108	0,17236 0,2172	0,11255 0,4223	0,09980 0,4815	-0,07285 0,6042	0,12842 0,3642	-0,07995 0,5732
MOT 1	0,15164 0,3035	-0,07073 0,6291	-0,15694 0,2815	0,84171 <0,0001	0,49327 0,0003	0,41192 0,0033	0,49327 0,0003	-0,10471 0,4740	-0,21201 0,1436	0,25958 0,0715	-0,03826 0,7941	-0,11334 0,4431	-0,27985 0,0540	0,25777 0,0769	0,07147 0,6293
VIG 1	0,20273 0,1537	-0,12875 0,3630	-0,12314 0,3993	0,34060 0,0135	0,15350 0,2773	-0,00678 0,9620	0,15350 0,2773	0,01510 0,9154	-0,04512 0,7508	0,10409 0,4628	-0,30889 0,0259	-0,20055 0,1582	-0,12756 0,3724	0,18936 0,1832	0,00842 0,9532
MOT 2	0,54241 <0,0001	-0,18253 0,1908	-0,19407 0,1815	0,32450 0,0178	0,48454 0,0002	0,11333 0,4191	0,48454 0,0002	0,00187 0,9894	0,30996 0,0239	-0,21262 0,1264	-0,21622 0,1199	-0,18679 0,1849	-0,02833 0,8420	-0,14581 0,3023	0,21945 0,1180
VIG 2	0,32248 0,0197	-0,16040 0,2513	-0,12966 0,3548	0,38851 0,0040	0,35118 0,0099	0,11729 0,4029	0,35118 0,0099	-0,00400 0,9773	0,11751 0,4020	-0,07824 0,5776	-0,06376 0,6501	-0,13136 0,3533	-0,03903 0,7836	-0,00685 0,9616	0,08181 0,5642

Legenda: Valor de p **Vermelho** – correlação significativa; **Azul**: correlação com tendência de efeito significativo (0,05<p<0,10);
Correlação **Magenta** :– correlação média e alta (maior que 30%) ; **Verde** – correlação baixa (menor que 30%),

continuação

ANEXO L – Correlação (r) e nível de significância (p) entre as variáveis resposta mensuradas

r p	HIPOC	FLUO1	FLUO2	EOS1	EOS2	POPE1	POPE2	TRI1-1	TRIP2-1	TRIP3-1	TRIP4-1	TRI1-2	TRIP2-2	TRIP3-2	TRIP4-2
HIPOC	1,0000	-0,20960 0,1364	-0,30165 0,0372	0,19114 0,1747	0,41389 0,0023	0,08188 0,5639	0,41389 0,0023	0,26699 0,0557	0,30683 0,0269	-0,19086 0,1753	-0,51811 <0,0001	-0,17489 0,2196	0,05778 0,6871	-0,18680 0,1893	0,16784 0,2391
FLUO1		1,0000	0,55845 <0,0001	-0,12740 0,3645	-0,37325 0,0059	0,29392 0,0327	-0,37325 0,0059	0,15719 0,2610	0,04049 0,7735	-0,16858 0,2276	0,02207 0,8754	0,09945 0,4830	0,21884 0,1199	-0,30872 0,0260	0,04244 0,7651
FLUO2			1,0000	-0,19244 0,1853	-0,15770 0,2792	0,17284 0,2350	-0,15770 0,2792	0,00420 0,9772	-0,06830 0,6410	-0,01067 0,9420	0,07587 0,6044	0,06091 0,6809	0,18901 0,1982	-0,06556 0,6580	-0,14390 0,3292
EOS1				1,0000	0,56379 <0,0001	0,37221 0,0061	0,56379 <0,0001	-0,04657 0,7406	-0,07435 0,5967	0,13069 0,3509	-0,12709 0,3645	-0,21695 0,1224	-0,14939 0,2905	0,19891 0,1575	0,04054 0,7754
EOS2					1,0000	0,40195 0,0029	0,30200 <0,0001	-0,28762 0,0368	0,12593 0,3689	0,07511 0,5930	0,00378 0,9786	-0,14299 0,3119	-0,20775 0,1394	0,06734 0,6353	0,20159 0,1518
POPE1						1,0000	0,40195 0,0029	-0,10482 0,4551	0,11888 0,3965	-0,07284 0,6042	0,07039 0,6165	0,11961 0,3987	0,06693 0,6373	-0,18317 0,19337	0,06695 0,6372
POPE2							1,0000	-0,28762 0,0368	0,12593 0,3689	0,07511 0,5980	0,00378 0,9786	-0,14291 0,3122	-0,20775 0,1394	0,06734 0,6353	0,20159 0,1518
TRI 1-1								1,0000	0,32734 0,0167	-0,59587 <0,0001	-0,66706 <0,0001	0,05446 0,7014	0,29391 0,0344	-0,11083 0,4341	-0,20693 0,1410
TRI 2-1									1,0000	-0,88350 <0,0001	-0,43044 0,0013	0,11291 0,4255	0,31406 0,0234	-0,48017 0,0003	0,09428 0,5062
TRI 3-1										1,0000	0,37813 0,0052	-0,17645 0,2108	-0,38192 0,0052	0,49771 0,0002	-0,02458 0,8613
TRI 4-1											1,0000	0,21401 0,1276	-0,15590 0,2698	0,05219 0,7133	0,04485 0,7522
TRI 1-2												1,0000	0,26869 0,0541	-0,16796 0,2340	-0,40550 0,0029
TRI 2-2													1,0000	-0,56799 <0,0001	-0,57350 <0,0001
TRI 3-2														1,0000	-0,30650 0,0271
TRI 4-2															1,0000

Legenda: Valor de p Vermelho – correlação significativa; Azul: correlação com tendência de efeito significativa (0,05<p<0,10); Correlação Magenta:– correlação média e alta (maior que 30%) ; Verde – correlação baixa (menor que 30%), conclusão