PAOLA ALMEIDA DE ARAÚJO GÓES

Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio

São Paulo
2008

PAOLA ALMEIDA DE ARAÚJO GÓES

Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio

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:

Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe

São Paulo
2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1966
FMVZ

Góes, Paola Almeida de Araújo

Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio / Paola Almeida de Araújo Góes. – São Paulo : P. A. A. Góes, 2008.
114 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.

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

Orientador: Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe.

1. Sêmen animal. 2. Sêmen Animal (coleta). 3. Perdizes. 4. Animais de cativeiro. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio", protocolado sob o nº1191/2007, utilizando 30 (trinta) perdizes, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research "Enzymatic antioxidant levels and resistance to oxidative stress in semen of Red-winged Tinamou (*Rhynchotus rufescens*) kept in captivity under selenium supplementation", protocol number 1191/2007, utilizing 30 (thirty) red-winged, under the responsibility Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 19 de outubro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome : GÓES, Paola Almeida de Araújo

Título: Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Epígrafe

o girino é o peixinho do sapo

o silêncio é o começo do papo

o bigode é a antena do gato

o cavalo é pasto do cartapato

o cabrito é o cordeiro da cabra

o pescoço é a barriga da cobra

o leitão é um porquinho mais novo

a galinha é um poucochinho do ovo

o desejo é o começo do corpo

engordar é a tarefa do porco

a cegonha é a girafa do ganso

o cachorro é um lobo mais manso

o escuro é a metade da zebra

as raízes são as veias da seiva

o camelo é um cavalo sem sede

tartaruga por dentro é parede

o potrinho é o bezerro da égua

a batalha é o começo da trégua

papagaio é um dragão miniatura

bactérias num meio é cultura

(Arnaldo Antunes, "Cultura", Album "Nome", 1993)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e meu esposo pelo apoio, paciência e o amor que a mim dedicam.

Ao meu filho, Christian Júnior, que é a razão do meu viver, meu tesouro e minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha família Christian e Christian Júnior, por serem o motivo da minha força de vontade em me tornar uma pessoa produtiva e uma boa profissional podendo sempre lhes dar orgulho. Obrigado por vocês serem os amores de minha vida.

À minha família de Salvador, meus pais, Raimundo e Eliana, pelo inesgotável amor, meus irmãos, Claudia, Júnior e Tássia, por estarem sempre me apoiando, minha avó Elisabeth e meu tio Jackson, por se preocuparem comigo, minha prima Larissa, por ser uma irmã, minha tia Rejane, por ser uma mãe, aos agregados Luciano, Léo, André, Lucas e Mirella, por completarem a felicidade da família e meus sobrinhos Raíssa, Bernardo e Víctor por me fazerem querer voltar pra Salvador toda hora.

À minha família de São Paulo, meus sogros Christiando e Kathryn, por me fazerem sentir protegida, meu cunhado John pelas descontrações das discussões, meus co-sogros, Susan e Celso, por estarem sempre quebrando meus galhos.

Dra. Valquíria e ao Dr. Renato por estarem sempre me ajudando profissionalmente e por me darem a oportunidade de senti-los como pais. Orgulho-me de tê-los como orientadores e poder sempre estar aprendendo com eles para, quem sabe um dia, chegar à metade do que eles são.

Ao Prof. Dr. Marcelo Guimarães pela amizade e por estar sempre disponível para à pós-graduação desse curso.

À Kari, por ser, mais que, uma amiga sempre presente, mesmo estando tão longe fisicamente.

Ao Marcílio...mais uma vez o espaço é pouco para elogiá-lo. Obrigado por sempre estar me ajudando, você é um excelente profissional. Sem você esse trabalho não estaria completo.

Agradeço a Thaís e Roberto pela amizade sincera e por ter me dado a oportunidade de construir essa família maravilhosa. Obrigado, cupidos!!!!

À Profa. Sandra Aida de Queiroz, por proporcionar essa parceria de trabalho entre as instituições, USP e UNESP, campus Jaboticabal.

À Aline, Leticia, Erika e Lívia por colaborarem nas coletas das amostras e pelos sorvetes deliciosos...

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal pela atenção, colaboração e carinho.

Aos meus colegas de pós graduação pelas conversas e momentos de descontração.

Às meninas da secretaria: Harumi, Thaís e Alice por sempre estarem dispostas a ajudar a todos.

A Miguel e Maria Amélia, pelos bate papos e ajuda no laboratório.

Ao pessoal da biblioteca e pós graduação pela ajuda e paciência.

Às perdizes por colaborarem, as vezes, com a realização desse trabalho. Espero com isso estar ajudando, de alguma forma, com o bem-estar da espécie. À vocês meu imenso respeito.

Um agradecimento especial a minha mãe e minha sogra por ajudarem a cuidar de meu filhote durante esse período, me proporcionando tranquilidade e confiança que foram essenciais para eu concluir esse trabalho.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Finalmente, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes durante meu doutorado e que colaboraram de alguma forma na conclusão dessa tese.

GÓES, P. A. A. **Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio** [Enzymatic antioxidant activity and resistance against the oxidative stress in semen of captive partridges (*Rhynchotus rufescens*) supplemented with selenium]. 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Considerando a importância comercial da perdiz (*Rhynchotus rufescens*), implantou-se algumas biotecnologias reprodutivas. Trinta animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (sem selênio orgânico) e tratamento (com 0,2 a 0,8mg de selênio em 1000kgs de ração), provenientes da FCAV-UNESP/Jaboticabal (2007-2008). Coletou-se sêmen por excitação manual que foram aliqüotados em *pools* com 150µL. Após a avaliação do volume, motilidade, vigor, números de espermatozóides, concentração e morfologia espermática, diluiu-se 20µl de sêmen em 300µl de solução fisiológica para testar a Integridade das membranas acrossomal e plasmática e avaliação da atividade mitocondrial. Uma outra alíquota de 20µl foi utilizada para testar a resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo, induzido (vitamina C + sulfato ferroso), por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A amostra restante foi congelada diretamente em nitrogênio líquido para a realização do teste da integridade do DNA espermático e para medir a atividade das enzimas antioxidantes Catalase e Glutathione Peroxidase. Contou-se 200 células, para avaliação da integridade acrossomal e de membrana, atividade mitocondrial e ensaio cometa e classificou-as: 1) Acrossomo Íntegro: cor lilás e Não-Íntegro: róseo; 2)Células Vivas (não coradas) e Mortas (coradas), 3) Classes de I a IV, sendo Classe I (todas as mitocôndrias íntegras) com a peça intermediária totalmente corada e Classe IV (todas as mitocôndrias comprometidas) com a peça intermediária totalmente descorada e 4) Cometa I a IV, sendo Cometa I (DNA íntegro): células com halo ao seu redor e núcleo corado, porém sem cauda de cometa evidente e Cometa IV (DNA altamente fragmentado): célula com núcleo completamente descorado e apenas a cauda do cometa, respectivamente. Os dados foram analisados pelo SAS, System for Windows. Nenhuma diferença foi encontrada para volume, motilidade, vigor, número de espermatozóides,

concentração, integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática, Classes I e III da atividade mitocondrial, Cometa I,II e IV, TBARS e atividade da Glutathione Peroxidase. Foram encontradas diferenças nas Classes II (Se=33,39±2,93 e Controle=44,39±2,59, $p=0.0125$ e IV (Se=3,44±0,09 e Controle=1,50±0,38, $p=0.0401$) e Cometa III (Se=16,00 ± 0,82 e Controle=34,75 ± 1,44, $p<.0001$), respectivamente. A diferença encontrada no DAB II pode ser devido aos danos causados na arquitetura da peça intermediária pela deficiência de selênio, o que compromete a mobilidade e a capacidade de fecundação do espermatozóide. Para o DAB IV, não era esperado esse resultado, que pode ser devido aos pequenos valores encontrados para essa variável (Se=3,44% e Controle=1,50%) em relação ao total das classes e que poderia não ser significativa se levássemos em consideração as classes juntas. Em relação a porcentagem mais baixa de espermatozoides do grupo suplementado com selênio para a classe III do Ensaio Cometa, pode sugerir um efeito de proteção desta substância, possivelmente devido a um índice mais elevado da Glutathione Peroxidase.

Palavras-chave: Sêmen animal. Sêmen Animal (coleta). Perdizes. Animais de cativeiro.

GÓES, P. A. A. **Enzymatic antioxidant activity and resistance against the oxidative stress in semen of captive partridges (*Rhynchotus rufescens*) supplemented with selenium** [Dosagem dos níveis de anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio]. 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Considering the commercial value of the partridges (*Rhynchotus rufescens*), the employment of reproductive biotechnologies has been attempted. Thirty animals were randomly assigned into two groups: control group (no selenium) and treatment group (supplemented with 0,2 a 0,8mg selenium/ 1000kgs ration). Animals were allocated at the FCAV – UNESP/Jaboticabal (2007-2008). Semen collections were performed by digital manipulation and divided in pools of at least 150µL. After the immediate evaluation of volume, motility, vigour, concentration and morphology, an aliquot of 20µL was diluted in 300µL of physiologic solution in order to test acrosome and membrane integrities and mitochondrial activity. Another aliquot of 20 µL was used to test the resistance of sperm against the induced oxidative stress (Vitamin C + ferrous sulphate), followed by the measurement of TBARS. The remaining semen sample was frozen directly in liquid nitrogen in orther to perform the comet assay and to measure the activity of the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase. Cells were evaluated respectively for acrosome and membrane integrities, mitochondrial activity and comet assay as follows: 1) Intact acrosome: lilac acrosome; Non-intact acrosome: pink acrosome; 2) Live cells: non stained; Dead: stained; 3) Classes I to IV, being Class I (full mitochondrial potential): midpiece totally stained and class IV (no mitochondrial potential): midpiece not stained; 4) Classes I to IV, being Class I (intact DNA): nucleus with intense fluorescence with no comet tail; Class IV (highly fragmented DNA): no nucleus, only a comet tail. Data was statistically anlysed using the SAS System for Windows. No differences were found on volume, motility, vigour, number of spermatozoa, concentration, acrosomal and membrane integrity, Classes I and III of mitochondrial activity, Comets I, II and IV, TBARS and Glutathione activity. Differences were found on as DAB Classes II

(Se=33.39±2.93 and control=44.39±2.59, p=0.0125) and IV (Se=3.44±0.09 and control=1.50±0.38, p=0.0401) and comet class III (Se=16.00 ± 0.82 and control=34.75 ± 1.44, p=<.0001), respectively. The difference found on DAB II may be due to the damages caused by the selenium deficiency to the architecture of the midpiece, which compromises sperm mobility and fertilization capacity. On the other hand, the unexpected difference found on DAB IV may be due to the small values found for this variable in all animals (Se=3.44% and control=1.50%), which would be not significant taking into account all classes. The decreased percentage of sperm showing DNA fragmentation Class II found on the selenium supplemented group may suggest a protective effect of this substance on sperm DNA, possibly due to a higher GPx content.

Key words: Animal Semen. Animal sêmen (collection). Partridge. Captive animals.

LISTA DE SIMBOLOS

r coeficiente de correlação de Pearson

g força centrípeta

° graus

°C graus Celsius

= igual

Log₁₀ logaritmo na base 10

> maior que

□ mais ou menos

® marca registrada

< menor que

μM micromolar

μg micrograma

μL microlitro

mg miligrama

mL mililitro

mm milímetros

mM milimolar

M molar

ng nanograma

nm nanômetro

p nível de significância

% porcentagem

pH potencial hidrogênio iônico

kg quilograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Vista frontal e lateral do Galpão de Recria de Perdizes da FCAV/UNESP.....	53
Figura 2	- A - Vista frontal dos boxes.....	53
Figura 2	- B – Vista lateral dos boxes	53
Figura 2	- C – Interior do Box com água e ração <i>ad libidun</i>	53
Figura 2	- D – Corredor do Galpão de Recria de Perdizes da FCAV/UNESP.....	53
Figura 3	- A - Corte das penas laterais.....	54
Figura 3	- B - Contenção	54
Figura 4	- A – Comportamento Reprodutivo.....	54
Figura 4	- B- Tentativa de cópula.....	54
Figura 5	- A - Coleta de sêmen.....	55
Figura 5	- B - Detalhe da técnica de coleta de sêmen.....	55
Figura 6	- Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>), (1000x), com Cauda Fortemente Dobrada.....	75
Figura 7	- Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>), (1000x), com Cauda Fortemente Dobrada.....	75
Figura 8	- Fotomicrografia de célula espermáticas de perdiz (<i>Rhynchotus rufescens</i>), (1000x), com Cauda Fortemente Enrolada.....	75
Figura 9	- Fotomicrografia de célula espermática de perdiz(<i>Rhynchotus rufescens</i>), (1000x), Todo Enrolado.....	75
Figura 10	- Fotomicrografia de célula espermática de perdiz (<i>Rhynchotus rufescens</i>), (1000x), com Cauda Enrolada.....	75
Figura 11	- Fotomicrografia de célula espermática de perdiz (<i>Rhynchotus rufescens</i>), (1000x), com Cabeça Enrolada.....	75

Figura 12 - Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) coradas com Eosina-nigrosina (1000x). Membrana Plasmática Íntegra.....	77
Figura 13 - Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) coradas com Eosina-nigrosina (1000x). Membrana Plasmática não-Íntegra.....	77
Figura 14 - Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) coradas pela técnica da coloração simples para acrossomo (1000x). Acrossomo Íntegro.....	77
Figura 15 - Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) coradas pela técnica da coloração simples para acrossomo (1000x). Acrossomo não-Íntegro.....	77
Figura 16 - Figs. 16: Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) corados por DAB (1000x). 1-Classe I, 2-Classe II, 3-Classe III e 4-Classe IV.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade do número de animais por <i>pool</i> , volume seminal (μl), número de espermatozóides por ejaculado ($\times 10^9$), concentração ($\times 10^9$ spz/ml) e volume do ejaculado de cada animal (μl), dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008.....	70
Tabela 2	Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade da motilidade (%) e vigor (0-5), dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008.....	71
Tabela 3	Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade das alterações morfológicas de espermatozóides, dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008.....	74
Tabela 4	Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), e espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007.....	77
Tabela 5	Média, erro padrão da média (EPM),e teste de probabilidade de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008.....	78
Tabela 6:	Média, erro padrão da média (EPM),e teste de probabilidade de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação de integridade do DNA (COMETAI, II, III e IV), , dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007.....	81
Tabela 7	Média, erro padrão da média (EPM),e teste de probabilidade das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ng/30 milhões de células espermáticas), dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007.....	83

Tabela 8	Média, erro padrão da média (EPM), e teste de probabilidade da atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx) (UI/mL), dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008.....	85
Tabela 9	Coefficientes de correlação (significância) entre as variáveis: número de animal por <i>pool</i> (ANIM), volume (VOL), número de espermatozoides por ejaculado (SPTZ), concentração (CONC), volume de espermatozoides por animal (VOL. P), motilidade (MOT), vigor (VIG), avaliação da integridade de membrana plasmática (E/N), integridade do acrossomo, integridade (POPE), avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx), concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), morfologia espermática: normais (NORM), cauda fortemente dobrada (CAUFD), peça intermediária fortemente dobrada (PIFD), cabeça fortemente dobrada (CABFD), cabeça enrolada (CABE), peça intermediária dobrada (PID), cauda dobrada (CAUD), cauda enrolada (CAUE), cauda fortemente enrolada (CAUFE), gota proximal (GOTP), todo enrolado (TODOE) e avaliação de integridade do DNA (COMETAI, II, III e IV). dos <i>pools</i> de sêmen de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008.....	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	HIPÓTESE	24
3	OBJETIVOS	25
4	REVISÃO DE LITERATURA	27
4.1	Características gerais	27
4.2	Características reprodutivas	28
4.3	Coleta e avaliação do sêmen	29
4.4	Testes funcionais	32
4.4.1	Integridade da membrana plasmática.....	32
4.4.2	Integridade acrossomal.....	34
4.4.3	Atividade citoquímica mitocondrial.....	35
4.4.4	Integridade de DNA espermático.....	36
4.5	Estresse oxidativo	37
4.5.1	Espécies reativas ao oxigênio (EROS).....	38
4.5.2	Mecanismos de proteção antioxidante no sêmen.....	41
4.5.2.1	<i>Superóxido dismutase (SOD) e catalase</i>	42
4.5.2.2	<i>Glutathione peroxidase (GPx)</i>	43
4.5.3	Selênio.....	45
4.5.4	Avaliação do estresse oxidativo.....	46
5	MATERIAIS E MÉTODOS	51
5.1	Delineamento experimental	51
5.2	Animais e alojamento	52
5.3	Coleta do sêmen	54

5.4	Experimento piloto	55
5.4.1	Análise do sêmen.....	56
5.4.2	Provas bioquímicas.....	57
5.4.2.1	<i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	57
5.4.3	Atividades das enzimas antioxidantes.....	59
5.4.3.1	<i>Catalase</i>	60
5.4.3.2	<i>Glutathione peroxidase (GPx)</i>	60
5.5	Experimento	61
5.5.1	Análise da integridade acrossomal.....	62
5.5.2	Análise da integridade da membrana plasmática.....	62
5.5.3	Avaliação da atividade mitocondrial.....	63
5.5.4	Avaliação da integridade do DNA espermático.....	64
5.5.5	Provas bioquímicas.....	66
5.6	Análise estatística	67
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.1	Variáveis: número de animais, volume, número de espermatozóides por ejaculado, concentração e volume do ejaculado por animal	70
6.2	Variáveis: motilidade e vigor	71
6.3	Variável: morfologia espermática	74
6.4	Variáveis: integridade das membranas plasmática e acrossomal	77
6.5	Variáveis: avaliação da atividade mitocondrial	78
6.6	Variáveis: avaliação da integridade do DNA	80
6.7	Variável: concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	82
6.8	Variável: atividade da enzima antioxidante glutathione	84

	peroxidase (GPx).....	
6.9	Variável: atividade da enzima catalase.....	86
6.10	Correlações.....	87
6.11	Considerações finais.....	92
7	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXOS.....	114

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A perdiz, (*Rhynchotus rufescens*) é uma ave nativa do Brasil que pertence à ordem *Tinamiformes* classificada em 1815 por Temminck, com distribuição restrita ao continente americano, denominada popularmente perdiz ou perdigão (MARTÍNEZ et al., 2002).

Em decorrência das queimadas, da caça e do uso indiscriminado de inseticidas o número de perdizes vêm diminuindo e uma das soluções para garantir sua sobrevivência seria a criação desses animais em cativeiro e a aplicação de biotécnicas reprodutivas (SICK, 1997). Essa espécie tem mostrado um ótimo potencial para sua exploração zootécnica com a utilização de sua carne como fonte alternativa de proteínas (MORO et al., 2000). Para tanto, o desenvolvimento de pesquisas com esta espécie torna-se necessário para viabilizar a exploração racional. A obtenção do sucesso de criadouros, não depende apenas do conhecimento comportamental e do manejo adequado dos animais, mas principalmente da reprodução (CARRER; KORNFIELD, 1999).

Um importante coadjuvante da reprodução animal tem sido a biotecnologia, que visa o desenvolvimento de técnicas ligadas à inseminação artificial e à criopreservação de sêmen que hoje são uma realidade (RUTZ et al., 2007). Outro fator relevante para o bom desempenho reprodutivo diz respeito à suplementação alimentar melhorando a qualidade seminal, nesse aspecto pode-se destacar o selênio. Em muitos lugares do mundo, a dieta com selênio para animais é limitada, e uma suplementação dessa substância traria um efeito benéfico como antioxidante do sêmen e vários tecidos, como cita Surai et al.(1998).

Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática mostram-se limitados em relação à capacidade do potencial de fertilidade do sêmen. Apenas um teste não é suficiente, pois cada célula espermática apresenta vários compartimentos subcelulares com diferentes funções para serem avaliadas (SANTOS, 2003). Por isso, análises da função espermática têm obtido importância nas últimas décadas com o desenvolvimento de técnicas que buscam a avaliação do status funcional das organelas espermáticas (acrossomo, mitocôndria), ou a

integridade de muitos componentes celulares permitindo um diferente acesso para o problema (GRAHAM, 2001). Assim como a utilização de provas bioquímicas para maiores informações à respeito da associação entre as espécies reativas ao oxigênio e a função das células germinativas, já que tem sido reportada a ocorrência de radicais livres do oxigênio no sêmen, afetando adversamente a viabilidade dos espermatozóides.

Para tanto, é necessário conhecer mais profundamente os mecanismos que regem a reprodução, portanto esse trabalho visa a utilização de ferramentas biotecnológicas que melhorem o desempenho produtivo dessas aves em geral, colaborando dessa forma com o aprimoramento da criação comercial e conservação da espécie.

2 HIPÓTESE

A suplementação com selênio, importante antioxidante não enzimático, melhora os parâmetros seminais e aumenta a resistência ao estresse oxidativo em perdizes machos.

3 OBJETIVOS

Verificar e quantificar a resistência ao estresse oxidativo em amostras seminais de perdises suplementadas ou não com selênio na dieta, por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), índice de peroxidação lipídica, e da quantificação da atividade de enzimas antioxidantes, correlacionando os resultados com dados referentes à análise espermática padrão (Número de animal por *pool*, Número de espermatozóides por ejaculado, Volume, Volume de espermatozóides por animal, Motilidade, Vigor, Concentração e Morfologia Espermática) e funcionais (Avaliação da Integridade de Membrana Plasmática, Integridade do Acrossomo, Avaliação da Atividade Mitocondrial e Avaliação de Integridade do DNA espermático).

***REVISÃO
DE
LITERATURA***

4 REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, o mercado de carne de aves domésticas e não domésticas, aumentou significativamente desde 1990, provocando um elevado interesse das agroindústrias para incrementar a produção desta carne como fonte alternativa de proteína e atender os novos consumidores.

4.1 Características gerais

A perdiz, pertence a superordem *Paleognathe* (ratitas), ordem *Tinamiformes*, família *Tinamidae*, gênero *Rhynchotus* e espécie *Rhynchotus rufescens*. Foi classificada em 1815 por Temminck (MARTÍNEZ et al., 2000) e é a maior *Tinamidae* nativa do Brasil, medindo aproximadamente 37,5cm de altura. Por sua semelhança esquelética e cromossômica, a perdiz pode ter ancestrais comuns com o grupo das ratitas (SICK, 1997). Possui coloração parda com pintas pretas no dorso e suas asas são ferrugíneas. Quando desconfiado imobiliza-se imediatamente, e às vezes finge-se de morto quando ouve um barulho muito alto. Alimenta-se de raízes, tubérculos e insetos. Habita campos, pastagens, cerrados, buritizais e planaltos descampados e sua distribuição geográfica consiste da Argentina, Brasil, Peru, Paraguai, Uruguai e Bolívia (JIMENEZ; JIMÉNEZ, 2002). Popularmente denominada de perdiz ou perdigão, essa ave tem mostrado um elevado potencial de exploração zootécnica, na utilização de sua carne como fonte alternativa de proteínas na culinária sofisticada, através da criação racional que também proporciona condições de repovoamento.

4.2 Características Reprodutivas

O sistema genital masculino de aves é formado por: testículos, via seminífera extratesticular (epidídimos e ductos deferentes) e aparelho copulatório (BULL, 1994; HAFEZ; HAFEZ, 2004). Segundo Botino et al. (2003) na perdiz os testículos são estruturas pares que sofrem alterações morfológicas sazonais, e quando fora da fase de reprodução passam por um processo de degeneração com quiescência da espermatogênese.

Em galos, os testículos correspondem a 1% do peso vivo e estão localizados dentro da cavidade abdominal. A temperatura desses órgãos gira em torno de 41-43°C o que não interfere na espermatogênese, viabilizada por um resfriamento testicular pelos sacos aéreos. O ciclo do epitélio seminífero tem uma duração de 13 a 15 dias. (RUTZ et al., 2007). O sêmen fica estocado na sua porção final que é denominada ampola do ducto deferente que facilita a estocagem por ser reta e dilatada (BULL, 1994). Segundo Sick (1997), o órgão reprodutivo masculino das perdizes é denominado falo e, quando ereto, torna-se espiralado, semelhantemente ao dos Ratitae, dos patos, emas e jacus.

De acordo com Cesário (1994), o espermatozóide de galo é composto de cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda.

O ciclo reprodutivo da perdiz sofre alterações sazonais. Cavalcante (2005) cita a estação reprodutiva no período entre agosto e abril, corroborando com Sick (1997) e Moro et al. (2000) que afirmaram que no Brasil, a estação reprodutiva da espécie ocorre no período compreendido entre os meses de agosto e fevereiro, quando os índices de luminosidade e temperatura ambientais são mais elevados. Esse fato pode ser explicado, pois os efeitos somáticos e ambientais influenciam os neurônios hipotalâmicos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que é responsável pela liberação de FSH e LH, influenciando indiretamente a produção de espermatozoides, que fica modulada pelas alterações sazonais (BULL, 1994; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Outro fator relacionado com o desempenho reprodutivo dos animais em geral, é o estresse. François et al. (1998), citaram que as técnicas de criação levando-se em conta a adaptação a uma condição artificial pode interferir nas necessidades básicas dos animais e no repertório comportamental dos

mesmos. O cativeiro é direcionado para a produção em escala de produtos ou subprodutos de origem animal e pode levar os animais a situações de desconforto, induzindo-os ao estresse, com manifestações comportamentais.

4.3 Coleta e avaliação do sêmen

A coleta de sêmen em aves pode ser realizada por eletroejaculação, cloaca artificial (MALECKI et al., 1997a), e por massagem forçada com resposta voluntária que é a técnica que vem sendo mais utilizada (CARRER; KORNFIELD, 1999). Para tanto, é necessária a exteriorização do falo que é conseguida através de massagem manual.

Em emas, durante a exposição o falo se apresenta em forma de gancho (GOES, 2004). Com a mão esquerda posicionada ventralmente à abertura da cloaca e cranialmente ao corpo fibroso, desvia-se o falo para evitar o retorno à cloaca. O sêmen pode ser colhido diretamente da base ou da extremidade do falo (DEEMING, 1999; GÓES, 2004).

Em frangos (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758), perus (*Meleagris gallopavo*, Linnaeus, 1758) e galinhas d'angolas (*Numida meleagris*, Linnaeus, 1758), a colheita de sêmen é realizada por meio de massagem abdominal no dorso e movimentos nas laterais da cloaca. Geralmente, três ou quatro sessões são suficientes para condicionar os machos (ETCHES, 1996).

Em avestruzes, a coleta de sêmen é realizada com massagem na base do falo, que é exteriorizado através da manipulação pela cloaca. Algumas avestruzes ejaculam sem estímulos adicionais, em outras se faz necessário a estimulação com massagem digital nas papilas seminais, que são duas aberturas, onde termina o ducto deferente e começa a cloaca, que servem para a ejeção do sêmen (HEMBERGER; HOPES; BOSTED, 2001).

Malecki, Martin e Lindsay (1997a) utilizaram como método de coleta de sêmen em emús, uma cloaca artificial desenvolvida especificamente para a espécie em questão. No trabalho descrito, foram testados dois métodos de estimulação do macho. No primeiro método utilizou-se uma fêmea como

manequim, e quando o macho assumia posição de cópula, introduzia-se a cloaca artificial. No segundo método, o próprio técnico servia de manequim, deixando o macho apoiar-se sobre seu corpo e concomitantemente introduzindo a cloaca artificial para que o macho ejaculasse.

Góes (2004) coletou sêmen de emas introduzindo a mão enluvada, na região cloacal e realizando a eversão do falo, propiciando sua exposição. Após esse procedimento foi exercida uma massagem digital na base do falo para torná-lo ereto. Com a outra mão, também enluvada, segurou uma placa de petri, posicionada na ponta do falo, por onde o sêmen escorreu através do sulco fálico. Eventualmente, realizou massagem na parte ventral do pescoço da ave, a fim de facilitar a ejaculação.

Segundo Cavalcante (2005), a coleta de sêmen de perdizes é realizada após a remoção das penas da região cloacal, procedimento indispensável para a manipulação e exteriorização do falo. Realizando uma compressão de 4 a 5 movimentos digitais nas ampolas dos ductos deferentes e base do falo, obtém-se o sêmen na parte superior da porção fixa do falo.

A maioria das amostras de sêmen de aves apresenta-se contaminada com excretas cloacais, tornando difícil a determinação dos valores de concentração, volume e pH (HICKS-ALLDREDGE, 1996; CARRER; KORNFIELD, 1999).

Um estudo realizado por Hemberger, Hopes e Bostedt (2001) demonstraram que o volume de sêmen coletado em avestruzes variou de 0,1 a 1,5ml, com média de 0,64ml. Pode-se observar uma coloração de branco a marfim com consistência cremosa. O pH variou de 6,4 a 8,0 com valor médio de 7,3. Os valores da concentração espermática oscilaram de 3,9 a 36,0 milhões/ μ l, sendo a média de 7,3 milhões/ μ l. A motilidade espermática ficou entre 42 a 96%, com valor médio de 78%.

Malecki, Martin e Lindsay (1997b) descreveram algumas características seminais do emú. O volume encontrado do ejaculado foi de 0,61ml $\pm$ 0,06ml e a concentração de $1,94 \times 10^9$ sptz/ml $\pm$ $0,14 \times 10^9$ sptz/ml.

Góes 2004 verificou que o volume dos ejaculados de sêmen de emas variou de 0,5 até 1,0ml, sendo que a média alcançada foi de 0,68ml. A concentração espermática variou de 1,24 até $6,88 \times 10^9$ sptz/ml com média final

de $3,29 \times 10^9$ sptz/ml e o sêmen a fresco apresentou motilidade variando de 40 a 80% com média de 61,1%.

Cavalcante 2005 descreveu os valores encontrados na análise do sêmen de perdizes entre eles, as médias do volume (14,13µl), concentração ($0,93 \times 10^9$ sptz/ml) e motilidade (66%).

Os espermatozóides maduros em aves variam muito em relação à morfologia. Geralmente eles se apresentam menores quando comparados aos de mamíferos e medem em média $9,2 \mu\text{m}^3$. O acrossoma é simples e encapsulado pela membrana citoplasmática e a cabeça contém o núcleo. A cauda divide-se em pescoço, peça intermediária, peça principal e peça final (JOHNSON, 1986).

Segundo Celeghini (2000), no início da fase reprodutiva, as amostras seminais podem apresentar índices mais elevados para as alterações morfológicas e mais baixos para a concentração espermática. Também descreveu algumas formas espermáticas anormais em galos, tais como: defeitos de acrossoma, cabeça, peça intermediária, cauda, protusão protoplasmática, cabeça isolada e defeitos teratológicos.

Segundo Góes et al. (2004), as alterações morfológicas mais encontradas em sêmen de emas foi cabeça dobrada, cauda dobrada, cauda fortemente dobrada, cauda fortemente enrolada, cauda enrolada e inserção retroaxial.

As alterações morfológicas mais encontradas em sêmen de perdizes, segundo Cavalcante (2005) foram defeitos de: acrossomo (0,79%), cabeça (10,45%), peça intermediária (16,06%), cauda (14,99%) e outros (1,28%). Dentro desses resultados os defeitos mais encontrados foram: peça intermediária dobrada, cauda dobrada, cauda enrolada e fortemente enrolada e cauda enrolada, entre outras.

Os espermatozóides das emas são caracterizados por apresentarem uma peça intermediária curta entre a cabeça e a peça principal (PHILLIPS; ASA, 1989; GÓES, 2004).

4.4 Testes funcionais

A aplicação de testes funcionais em amostras seminais visa determinar a integridade da membrana citoplasmática do espermatozóide e por consequência, a viabilidade dos gametas masculinos. Diversas metodologias foram descritas e estão disponíveis para uso científico ou comercial, porém, muitas delas são sofisticadas o que dificulta a aplicabilidade em algumas situações (POPE et al., 1991; SILVA et al. 2002; SILVA, 2006).

4.4.1 Integridade da membrana plasmática

Bilgili et al. (1985) sugerem que o corante composto por eosina/nigrosina identifica quase o dobro de espermatozoides anormais quando comparado com filtros de membrana, enquanto que Barth e Oko (1989) utilizaram para diferenciar os vivos dos mortos.

A coloração eosina/nigrosina baseia-se no princípio de que espermatozoides vivos e com membrana plasmática íntegra, têm a capacidade de excluir o corante eosina. Por outro lado, espermatozoides mortos possuem as membranas celulares permeáveis, permitindo a entrada do corante. A nigrosina promove um fundo azul, aumentando o contraste do espermatozóide vivo não corado do espermatozóide morto corado de rosa. A contagem pode ser realizada 24 a 48h após a preparação dos esfregaços, sob microscópio de luz, num aumento de 1000x, em óleo de imersão, contando-se 200 células de cada amostra (SILVA et al., 2002),

Solano et al. (2007) utilizaram o teste de vivos e mortos, por meio do corante eosina/nigrosina, para avaliar 25 ejaculados de cinco touros durante a aplicação de três protocolos de estabilização ao glicerol antes do congelamento demonstrando que a curva de glicerolização durante 3 horas apresentou 71,0% de espermatozoides vivos, sendo melhor que o de 10h (64,6%) e 18h (45%).

Queiroz et al. (2007) avaliaram a integridade de membrana por meio da coloração eosina-nigrosina e o teste hiposmótico, juntamente com os parâmetros: volume, cor, odor, motilidade individual progressiva, percentual espermatozóides móveis, vigor e concentração, em 16 ejaculados de dois ovinos, a fim de testar a influência da distancia entre o nível de nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen ovino durante o processo de congelamento.

O sêmen de três cães foi avaliado de acordo com a motilidade, vigor, concentração, vivos/mortos e morfologia espermática pela coloração eosina-negrosina para avaliar características morfo-funcionais de espermatozóides canino mantidos em containers para transporte refrigerado de sêmen, utilizando o diluente Botu-Sêmen® (NAGAO et al., 2007).

Araújo et al. (2007) preservaram amostras de sêmen de *Cebus apella* em diluidor à base de água de coco a 37 °C e por meio da coloração de eosina-nigrosina encontraram 93±3% e 80±5% de vivos em 1 e 7hs de incubação em diluidor a base de água de coco, respectivamente.

Foi descrito o efeito de três diluentes e de cinco tempos de armazenamento sobre a porcentagem de espermatozóides mortos, na temperatura de 5-7°C, em sêmen de seis perus, por meio da coloração de eosina/nigrosina. No tempo 0 de armazenamento, foram observados em média 6,58; 7,41 e 16,91%; sendo que os valores decresceram com o passar do tempo (SILVA et al., 2002).

Silva (2006) cita que a porcentagem da integridade da membrana (% de espermatozóides vivos) de espermatozóides no ejaculado pode ser facilmente determinada por que a membrana plasmática dos espermatozóides vivos impede a entrada do corante, devido ao grande tamanho das moléculas, que cora de rosa os espermatozóides mortos e mantêm incolores, os vivos. A visualização dos espermatozóides vivos é facilitada pela adição à eosina de um corante de contraste, a nigrosina. A eosina-nigrosina, além de permitir a identificação dos espermatozóides vivos e mortos, permite a avaliação morfológica dos espermatozóides.

A avaliação da porcentagem de espermatozóides vivos e com morfologia normal é efetuada por observação de um esfregaço preparado com duas partes de corante (eosina-nigrosina) para uma de sêmen, para evitar que o esfregaço fique espesso pode-se interromper o percurso da lâmina usada para

estendê-lo e reiniciar imediatamente à frente da linha de interrupção, secar por 1 a 2 min. Conta-se pelo menos 100 células na objetiva 40 ou 100X em microscópio de luz (SILVA, 2006).

4.4.2 Integridade acrossomal

O acrossoma pode ser facilmente identificado em microscopia de luz pelo método da coloração simples proposta por Pope et al. (1991), que é composta de 1% do corante *Fast Green* e do Rosa Bengala. Essa coloração é simples, rápida e foi empregada em felinos selvagens e domésticos.

Outros métodos também são eficientes, porém são caros e de metodologia difícil de ser executada: microscopia de epifluorescência, utilizando o FITC-PNA (aglutinina de amendoim conjugada à fluoresceína) ou mesmo a microscopia eletrônica de transmissão (LONG et al., 1996; PUKAZHENTHI et al., 1999).

Martins (2007) descreveu as perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo espermatozóides obtidos de epidídimo de cães e gatos utilizando como parâmetro a integridade da membrana acrossomal utilizando o corante rosa bengala e *fast Green* para identificar tal variável no microscópio luz, seguindo a metodologia descrita por Pope et al. (1991).

A avaliação das características seminais de macacos pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, antes e após vasectomia bilateral (PAZ; TEIXEIRA; GUIMARÃES, 2006) foi realizada em seis exemplares adultos. Nas amostras obtidas antes da vasectomia, 3ml de sêmen foi depositado em uma lâmina, juntamente com 3ml de corante POPE e um esfregaço foi realizado, posteriormente 100 células/lâmina foram avaliadas em Microscópio de Contraste de Fase quanto à integridade do acrossoma, tendo encontrado 67,4+/-16,3% de acrossoma íntegro.

4.4.3 Atividade citoquímica mitocondrial

Os espermatozóides são células metabolicamente ativas que realizam tanto a glicólise como a respiração mitocondrial, mantendo um adequado balanço energético que é necessário para o transporte e as demais funções celulares (BARBOSA; ESPER, 1997).

Durante o processo da espermatogênese uma das mudanças ocorridas na peça intermediária é a divisão das mitocôndrias em mitocôndrias esféricas e a disposição ponta-a ponta destas em duas hélices contíguas, que as permitem produzir toda a energia requerida durante o processo de fecundação (WOOLLEY, 1971; DE MARTINO; FLORIDI; MARCANTE, 1979).

Um possível aumento no comprimento da peça intermediária poderia estar associado a uma maior taxa de fosforilação oxidativa, e assim com maior atividade metabólica influenciando na motilidade ou vitalidade da célula, já que as mitocôndrias são transformadoras de energia para a célula (EDDY, 1988).

Diante de tais evidências e considerando a alta herdabilidade quanto a esta característica (WOOLLEY, 1971; LUKEFAHR; HOHENBOKEN, 1981) e a possibilidade e necessidade de seleção genética para fertilidade (RAHEJA et al., 1989), é desejável o desenvolvimento de testes e a obtenção de indicadores biológicos que reflitam a habilidade fertilizadora do espermatozóide (CAVALCANTE et al., 2005)

A avaliação da atividade mitocondrial pode ser realizada utilizando-se testes tais como a Rodamina 123, o JC-1 e o Mito-tracker®, entre outros (CELEGHINI et al., 2007), mas o custo desses testes é alto tornando-os pouco práticos para utilização em rotina (CELEGHINI et al., 2007).

Por isso Hrudka, 1987 descreveu uma análise da atividade citoquímica mitocondrial que avalia a respiração celular e o metabolismo energético da célula por meio da citocromo c oxidase que esta correlaciona com a cadeia respiratória.

Esta técnica é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidine (DAB) pela enzima em reação em cadeia, onde o reagente é polimerizado e depositado na bainha mitocondrial ao longo da peça intermediária dos espermatozóides e

esta deposição pode ser identificada pela visualização de uma cor castanha na região da peça intermediária do espermatozóide (HRUDKA, 1987).

4.4.4 Integridade de DNA espermático

As alterações genéticas nos espermatozóides estão sendo citadas como grandes responsáveis na falha do processo de obtenção de embriões ou de gestações (GRECO et al., 2005)

Na espermiogênese dos mamíferos, aves e muitos peixes, as histonas são total ou parcialmente substituídas por nucleoproteínas denominadas protaminas, que dão origem a uma cromatina que apresenta maior ou menor grau de compactação, sendo esse fator de grande relevância, quando avaliamos células espermáticas e a fertilidade nos machos. Sêmen de galos férteis possuem uma pequena quantidade de espermatozóides com baixa compactação de cromatina e alterações morfológicas (BELETTI; SOARES, 2006).

Danos no DNA de espermatozóides, que pode ser causado, inclusive por estresse oxidativo (GRECO et al., 2005), são mais comuns em homens inférteis e podem contribuir com um baixo desempenho reprodutivo. Portanto a integridade da cromatina do DNA é importante para a fertilidade masculina (THE PRACTICE COMMITTEE, 2006; PASQUALOTTO, 2007), pois ainda que com seu material genético fragmentado, o espermatozóide pode vir a fecundar o oócito podendo causar problemas na prole ou mesmo em gerações futuras (HAINES, 2001; HUGES et. al., 1999, apud BARROS, 2007).

Assim sendo, algumas técnicas de investigação são propostas para identificar esses danos. A estrutura da cromatina do espermatozóide pode ser mensurada por alguns métodos, citando: os ensaios TUNEL (“Terminal Uridine Nick End Labelling”) e o SCGE (“Single-Cell Gel Eletrophoresis”), também chamado de Ensaio Cometa (EVENSON; JOST, 2006), assim como citometria de fluxo após tratamento com ácido e coloração dos espermatozóides com laranja de acridina que irão avaliar o grau de fragmentação de DNA que ocorre

após tratamento químico do complexo DNA-cromatina dos espermatozóides e que podem refletir indiretamente a integridade da qualidade do DNA dos espermatozóides (PASQUALOTTO, 2007).

O Ensaio Cometa sob condições alcalinas é uma técnica eletroforética sensível, reprodutível, simples e rápida para a detecção da presença de quebras de fita única de DNA. O Ensaio Cometa tem amplas aplicações em estudos de toxicologia genética onde inicialmente era aplicado e é baseada em princípios da eletroforese associada ao uso de corantes intercalantes fluorescentes, sendo o único capaz de mensurar o grau de fragmentação do DNA de cada célula individualmente (DUTY et al., 2002). A leitura do resultado desse teste é realizada através do parâmetro de que as células apresentam morfologia semelhante à de um cometa, onde a cabeça do cometa representaria o DNA intacto e a cauda os fragmentos causados pela quebra da fita de DNA que migram através da técnica de eletroforese (DONNELLY et al., 2000).

4.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é causado por um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua eliminação por antioxidantes, levando a danos à estrutura das biomoléculas, DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares. Pode ser causado por uma redução na quantidade de antioxidante nos sistemas de defesa celular ou por uma elevada produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs). Em humanos e animais, foi identificado como causa de infertilidade em várias pesquisas.

4.5.1 Espécies reativas ao oxigênio (EROs)

As espécies reativas ao oxigênio são átomos ou moléculas que possuem um ou vários elétrons desapareados, fazem parte dos radicais livres, e quando em altas concentrações podem causar sérios danos à célula espermática. A exposição do espermatozóide humano a altas concentrações de oxigênio resultou em toxicidade, com perda de motilidade devido à peroxidação lipídica. Os efeitos desta reação incluem perda de motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares interferindo na capacidade fertilizante do espermatozóide (STRYER, 1996; VALENÇA; GUERRA, 2007).

Segundo Nordberg e Arner (2001), em condições fisiológicas, o O_2 sofre uma redução tetravalente, resultando em formação de água. Durante esta reação são elaborados reativos intermediários como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2) e hidroxila (OH). Além destes, existe o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Entre as espécies reativas de oxigênio, as mais importantes são o radical hidroxila ($OH^\cdot$), o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as EROs primariamente formadas, sendo que o H_2O_2 é gerado através da dismutase enzimática ou não enzimática do ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Porém, a ERO mais reativa e prejudicial em sistemas biológicos, é o radical hidroxila ($OH^\cdot$), que pode ser formado através do H_2O_2 em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^{++}), denominada de reação de Fenton, do ânion superóxido, e também através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico produzindo o peroxinitrito ($OONO^\cdot$), que então irá se decompor para NO_2 e $OH^\cdot$ (HALLIWELL, 1991).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, porém é extremamente danoso, pois tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (HALLIWELL, 1991; AITKEN et al., 1993b; ARMSTRONG et al., 2001).

Armstrong et al. (2001) sugeriram que o H_2O_2 possui função deletéria em relação aos níveis intracelulares de ATP, atuando na diminuição da motilidade espermática.

Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes como a catalase, a glutathione peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG; ARNER, 2001).

O radical superóxido (O_2^-) é um radical livre formado a partir do oxigênio pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente, na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar em membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

As EROs são produzidas por células espermáticas normais ou não, sendo que os normais possuem mecanismos de defesa para prevenção do dano celular (SULEIMAN et al., 1996).

Os espermatozóides são susceptíveis a danos peroxidativos, devido à alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (AITKEN; FISHEL, 1994; SHARMA; AGARWAL, 1996). Acredita-se que a presença deste citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas de gerar NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), que serve como fonte de elétrons para a produção de EROs (AITKEN; BAKER, 2002).

A grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados na membrana espermática permite a fluidez necessária para eventos ligados à fertilização, porém torna os espermatozóides mais vulneráveis. As EROs atacam as ligações duplas ou ligações insaturadas nas moléculas, enfraquecendo a ligação carbono-hidrogênio no átomo de hidrogênio adjacente, tornando-o susceptível à clivagem (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985).

Estudos recentes com sêmen de galos sugerem que a composição de ácidos graxos e lipídeos do espermatozóide dessa espécie é fator determinante na fertilidade (SURAI et al., 2000). Espermatozóides de galos apresentam um alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (SURAI, 2002). Bongalhardo et al. (2002) avaliaram a estrutura e a composição das membranas da cabeça e

do corpo espermático de galos. A membrana plasmática da cabeça apresentou menos ácidos graxos poliinsaturados que o corpo espermático. E também contém maior nível de esfingomielina e fosfatidilserina e menos fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina que a membrana do corpo espermático. A presença de tais ácidos graxos representa um risco para a ocorrência de peroxidação lipídica nas membranas espermáticas e é considerado causa de redução de fertilidade em machos (RUTZ et al., 2007)

A peroxidação lipídica está geralmente associada a uma diminuição da função e viabilidade espermática. Com a peroxidação lipídica, existe uma perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando o bom funcionamento do espermatozóide e a sua fusão com o oócito, além de danificar a motilidade espermática normal (PASQUALOTTO et al., 2006). Estudos realizados *in vitro* indicam que a perda de motilidade pode também estar relacionada à diminuição nos níveis de ATP espermático, causada pelas EROs (AITKEN et al., 1993a). Em sêmen humano, Kessopoulos et al.¹ (1994 apud NICHI, 2003), sugeriram que a maior fonte de produção de EROs seria os leucócitos, presentes mesmo em homens férteis.

Pérez et al. (2000) encontraram uma correlação negativa entre a atividade da superóxido dismutase e o número de leucócitos em homens. Cita que pode estar relacionada com o efeito danoso que os processos inflamatórios das vias seminais exercem sobre os sítios de produção desta enzima. Wolff (1995) verificou que as EROs, gerados por leucócitos, são deletérios às células espermáticas apenas na ausência de sistemas antioxidantes, como vistos em infecções agudas no testículo e epidídimo.

Iwasaki e Gagnon (1992) detectaram a formação de EROs em 40% dos pacientes tratados em uma clínica de infertilidade masculina. Mazzili et al. (1994) verificaram a presença do ânion superóxido em 87% (115/132) das amostras seminais provenientes de homens normozoospermicos inférteis e em 55% (11/20) das amostras seminais de homens inférteis ($p < 0,05$).

¹ KESSOPOULOU, E.; POWERS, H.J.; SHARMA, K.K.; PEARSON, M.J.; RUSSELL, J.M.; COOKE, I.D.; BARRATT, C.L. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril.*, n. 64, n. 4, p. 825-831, 1995.

Pasqualotto et al. (2000) verificaram que pacientes inférteis possuíam níveis mais altos ($p < 0,005$) de EROs quando comparados a homens com fertilidade comprovada.

4.5.2 Mecanismos de proteção antioxidante no sêmen

Freqüentemente define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, quando comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). O organismo desenvolveu mecanismos de defesa para proteger-se do processo oxidativo. Algumas substâncias, classificadas como antioxidantes, dentre elas podem ser citadas: algumas vitaminas, minerais e enzimas.

Em condições normais, as células somáticas contêm substâncias antioxidantes em seu citoplasma. Porém o espermatozóide, durante o período de maturação, perde a maioria de seu citoplasma, e, com isto, perde parte dos antioxidantes endógenos, ficando vulnerável à ação de EROs (CARVALHO et al., 2002). Porém, o plasma seminal que contém enzimas e moléculas antioxidantes protege as células espermáticas do ataque oxidativo e em homens férteis essa capacidade de proteção é maior de acordo com Pasqualotto et al., (2000).

Um sistema antioxidante é crucial para a manutenção da integridade da membrana espermática e para as propriedades fisiológicas, incluindo fluidez de membrana, flexibilidade e permeabilidade necessária para o processo de fertilização. Assim, um sistema antioxidante eficiente é necessário para proteger as membranas espermáticas da ação peroxidativa (RUTZ et al., 2007).

O sistema enzimático compreende enzimas como a superóxido dismutase, a glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase. Estas enzimas atuam como catalisadoras na reação de redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular. Seu papel antioxidante diminui o risco de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton. Os antioxidantes não enzimáticos incluem a glutathione reduzida (GSH), o urato, o

ácido ascórbico, a vitamina E, a taurina, a hipotaurina, os carotenóides e ubiquinonas (Coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (VALENÇA; GUERRA, 2007).

Para Ferreira e Matsubara (1997), esses sistemas podem atuar em duas direções: como removedor do agente oxidante antes que ele ocasione lesão celular (glutathione reduzida – GSH; superóxido dismutase – SOD; catalase; glutathione peroxidase – GP e a vitamina E), ou ainda como agente reparador da lesão já ocorrida (ácido ascórbico; glutathione redutase – GR e glutathione peroxidase – GPx). Em sua maioria, estes elementos antioxidantes encontram-se no meio intracelular, excluindo-se apenas a vitamina E, que também é constituinte estrutural da membrana espermática.

Halliwell e Gutteridge (1989) citaram que a vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante. Atua na redução de moléculas oxidativas como os peróxidos, prevenindo a elaboração de hidroperóxidos de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo as células espermáticas de danos oxidativos. Porém, quando ingerida em doses elevadas ou na presença de metais como ferro ou cobre, pode atuar como um pró-oxidante levando a lipoperoxidação. A mistura de Cu-ascorbato ou Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos levando à formação de radicais livres que danificam o ácido desoxirribonucléico (DNA), lipídios e proteínas.

Em geral, o sêmen de aves contém vitamina E, vitamina C, glutathione, glutathione peroxidase e a superóxido dismutase (RUTZ et al., 2007).

4.5.2.1 Superóxido dismutases (SOD) e catalase

A SOD e a catalase são as principais enzimas antioxidantes no plasma seminal de mamíferos e protegem o espermatozóide do dano oxidativo, neutralizando as ações das EROs. Estão presentes no plasma seminal e sêmen. São produzidas nos testículos, epidídimos e glândulas acessórias e podem manter a motilidade das células espermáticas por um longo tempo. Um aumento de EROs no plasma seminal causa uma diminuição, principalmente

no que diz respeito à motilidade, da qualidade seminal em homens e cães sendo que baixas atividades da SOD e da catalase no plasma seminal causam um aumento na concentração de EROs (KAWAKAMI et. al., 2006).

Um papel importante da SOD é proteger as desidratases (ácido dihidroxil desidratase, aconitase, 6- phosphogluconase desidratase e fumarases A e B) contra a inativação pelo radical superóxido (BENOV; FRIDOVICH, 1998).

A catalase age na reação que transforma duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de água (H_2O) e uma de oxigênio (O_2) (NORDEBERG; ARNÉR, 2001), além de ter sua eficiência comprovada, pois nenhuma concentração de H_2O_2 pode saturá-la (LLEDÍAS et. al., 1998).

Pasqualotto et. al. (2006) relataram que, em homens, os níveis das enzimas SOD e catalase foram inferiores nos pacientes quando comparados com doadores férteis e também demonstraram uma correlação negativa entre leucospermia e os níveis de SOD, corroborando o conceito de que as EROs talvez estejam aumentadas em infecções crônicas urogenitais associadas com o aumento no número de leucócitos.

Aitken et. al. (1996) verificaram que altos níveis de SOD estavam associados à função espermática defeituosa devido à alta susceptibilidade das células espermáticas aos efeitos citotóxicos do H_2O_2 . Neste experimento, os níveis de SOD 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).

4.5.2.2 *Glutathione peroxidase (GPx)*

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante que contém selênio em sua composição e remove radicais peroxil de vários peróxidos, aumentando assim, a motilidade espermática. Da mesma forma, a glutathione redutase regenera a glutathione reduzida (GSH) de sua forma oxidada (GSSG), com funções já conhecidas no núcleo espermático, assim como na formação de microtúbulos (GRIVEAU; LE LANNOU, 1994).

Sinhá et al. (1996) observaram aumento no percentual de motilidade espermática pós-congelação, após adicionar 5 μ M de Glutathione ao sêmen de caprinos.

As GPx são uma família de enzimas que podem ser divididas em dois grupos: as selênio-dependentes e as selênio independentes. As enzimas do grupo selênio dependentes podem decompor o H₂O₂ em vários hidro ou lipoperóxidos. As glutathionas selênio-dependentes podem ser divididas em quatro formas geneticamente distintas, GPx1, GPx2, GPx3 e GPx4. GPx4 é altamente expressa nas células epiteliais renais e nos testículos. Estudos de Ursini et al. (1999) indicaram que a proteína originada do GPx4 correspondia a 50% da cápsula que sustenta a *helix* da mitocôndria

De fato, sabe-se que o selênio tem papel importante na estrutura dos espermatozoides por estar associado à formulação da glutathione peroxidase. Os dados do efeito do Se no sêmen de aves são extremamente limitados. A GPx foi encontrada no plasma seminal e espermatozoides de galos. Há diferenças espécie-específicas na atividade e distribuição de GPx no sêmen de aves. Por exemplo, em plasma seminal de perus a atividade da glutathione peroxidase era mais elevada quando comparada com o pato e o ganso. Por outro lado, nos espermatozoides de ganso e pato, encontrou-se atividades de GPx mais elevadas em relação a galos, perus ou guiné (DIMITROV et al., 2007).

Os níveis testiculares de glutathione peroxidase foram mensurados em ratos após administração de cocaína. Neste experimento, os índices de estresse oxidativo, medido através dos níveis de malondialdeído, metabólito originado da peroxidação lipídica, aumentaram posteriormente à diminuição dos níveis de glutathione peroxidase. Estes resultados sugerem que a produção de EROs no testículo, provocada pela cocaína, foi controlada pela glutathione peroxidase. Porém, com o consumo deste antioxidante e os níveis ainda elevados de EROs, os índices de peroxidação lipídica testicular aumentaram. Os autores sugerem, portanto, que a glutathione é o mais importante agente antioxidante em nível testicular (NICHII, 2004).

Barros (2007) testou o efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathione reduzida adicionada aos diluidores: Earle[®] TCM 199, HAM F10[®] e Tris-gema-citrato, sobre a motilidade, o vigor, o Índice de

Motilidade Espermática (IME), porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, porcentagem de espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial e porcentagem de espermatozóides com acrossomo íntegro, de amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C e coletadas através de eletroejaculação. Foi verificado que as diferentes concentrações de GSH não influenciaram as variáveis motilidade, vigor, IME, integridade da membrana plasmática dos espermatozóides e porcentagem de espermatozóides classes II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial, porém os resultados indicaram um efeito protetor do GSH na membrana acrossomal apenas para o diluidor TCM.

4.5.3 Selênio

O selênio é um componente da glutathione peroxidase tornando-se um elemento essencial e importante na reprodução animal. Certamente há pelo menos 25 tipos de selênio no corpo humano e animal e que participam da regulação de várias funções fisiológicas, dentre elas a proteção antioxidante e manutenção da integridade da estrutura do espermatozóide (SURAI, 2002).

Em muitos lugares do mundo a dieta com selênio para animais é limitada, e uma suplementação dessa substância traria um efeito benéfico como antioxidante do sêmen e de vários tecidos, como cita Surai et al. (1998).

A inclusão de selênio na dieta de galos aumentou a atividade da glutathione peroxidase no fígado, espermatozóides e plasma seminal desses animais. Em consequência, observou-se uma diminuição da suscetibilidade à peroxidação lipídica dos espermatozóides e tecidos, sendo que esse resultado foi mais expressivo em sêmen armazenado do que a fresco (SURAI et al., 1998).

Surai (2002) relatou que a deficiência de selênio está associada com danos na arquitetura da peça intermediária do espermatozóide, o que compromete a mobilidade e a capacidade de fertilização deste.

A adição direta do selênio nos espermatozóides *in vitro* altera positivamente igualmente a função espermática (BARBER, 2005). Por outro lado, pesquisas mostraram que o sistema reprodutor masculino é extremamente sensível aos níveis excessivos de selênio. (KAUR; PARSHAD, 1994).

4.5.4 Avaliação do estresse oxidativo

Muitas pesquisas têm sido feitas no campo da infertilidade masculina na espécie humana, a fim de desenvolver índices de estresse oxidativo que possam discriminar e quantificar, com acurácia, os efeitos do estresse oxidativo na infertilidade masculina. Visto que, o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a produção de EROs e a proteção oxidativa no sêmen, torna-se concebível que a avaliação do estresse oxidativo seja feita através da mensuração dos níveis de EROs e/ou seus metabólitos, assim como dos níveis de antioxidante no sêmen.

Para a dosagem de EROs no sêmen são necessárias técnicas muito sensíveis, visto que a produção de EROs pelo sêmen, é relativamente baixa quando comparada com a produzida por leucócitos. Além disso, a meia-vida das EROs é muito baixa (LUNEC, 1989). Para mensurá-las são usadas técnicas de quimioluminescência que, mesmo bastante sensíveis, não conseguem dosar certos níveis de EROs (10×10^4 fótons contados por minuto) que ocorrem em amostras seminais de homens normais (SHEKARRIZ et al., 1995a,b).

A mensuração dos níveis de antioxidantes pode ser realizada por quimioluminescência, pela dosagem imunocitoquímica e pela dosagem enzimática. A técnica de quimioluminescência é utilizada para a mensuração da capacidade antioxidante total das amostras (ATA), através de sondas específicas (PASQUALOTTO et al., 2001; SHARMA et al., 1999).

A dosagem imunocitoquímica é realizada através da adição de anticorpos antiantioxidantes específicos, que irão se ligar ao antioxidante presente na amostra, utilizando microscopia de epifluorescência e fotografia, ou citômetro de fluxo para a leitura (LASSO et al., 1994).

A dosagem enzimática é realizada através das propriedades catalizantes dos antioxidantes. Nesta técnica, são utilizados substratos que serão catalizados pelos antioxidantes específicos. A leitura pode ser realizada através de espectrofotometria, medindo-se o consumo destes substratos. Como exemplo, temos o ensaio para a mensuração da catalase, no qual adiciona-se H_2O_2 que será consumido pela enzima presente na amostra. Medindo-se o consumo deste agente oxidante teremos a quantidade de catalase presente na amostra (RICE-EVANS et. al., 1991; MOSTAFA, 2001).

A dosagem de componentes oxidados, que se mantém nos fluidos corporais, é uma técnica mais específica, sendo um destes componentes o malondialdeído (MDA), que pode ser usado como um índice de peroxidação lipídica (SLATER, 1984; JANERO, 1990; AITKEN et. al., 1993; SIDHU et. al, 1998). A ocorrência da peroxidação lipídica em espermatozóides leva a acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática espermática que, posteriormente, se decompõem para formar o MDA. A avaliação dos níveis de MDA tem sido extensivamente utilizada, nas últimas quatro décadas, como marcador da peroxidação lipídica (JANERO, 1990; SLATER, 1984).

Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado. Nesta reação, o composto formado pela reação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de absorbância ou fluorescência.

Estes produtos são, então, chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este método possui algumas desvantagens visto que, a alta temperatura e o baixo pH durante a reação podem causar a formação de alguns produtos de peroxidação relacionados à técnica. Além disso, diferentes substâncias que não o MDA, podem reagir com o TBA, resultando em produtos de similar absorbância (JANERO, 1990). Porém, a correlação entre valores esperados de peroxidação lipídica e a mensuração dos níveis de TBARs é alta. Além disto, experimentos realizados com a mensuração de TBARs e sua

correlação com a capacidade de fusão entre espermatozóide e oócito obtiveram altos coeficientes.

Aitken et al. (1993b), observaram correlação negativa ($r=-0,58$, $p<0,0001$) entre os níveis de TBARs e a capacidade de fusão espermatozóide / oócito em humanos.

Li et al. (1999) administraram cocaína a ratos e verificaram que os níveis de TBARs no testículo foram maiores ($p<0,05$) que os observados em animais controle.

Barros (2007) testou o efeito dos diluidores: meio de cultivo celular de Earle® TCM 199, meio de cultivo celular de HAM F10® e diluidor preparado com Tris-gema-citrato sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o efeito dos tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathione reduzida adicionadas aos diluidores sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras espermáticas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C coletadas através de eletroejaculação e verificou que quanto à resistência dos espermatozoides à peroxidação lipídica, houve diferença significativa entre os diluidores, sendo que os espermatozoides mantidos no TCM apresentaram maior resistência à peroxidação do que nos outros diluidores ($168,61 \pm 31,69$, $552,20 \pm 78,10$ e $1900,19 \pm 341,42$, para TCM, HAM e TGC respectivamente; $p<0,05$) e que não houve diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações de GSH adicionadas aos diluidores e a resistência dos espermatozoides à peroxidação lipídica ($997,9 \pm 421,6$, $950,0 \pm 240,5$ e $959,0 \pm 260,7$, para 0, 0,5, 1,0 e 1,5mM de GSH respectivamente; $p<0,05$).

Uma ferramenta importante e muito utilizada, para a avaliação dos níveis de proteção antioxidante e de peroxidação lipídica, é a geração artificial de EROs. Esta indução aumentaria o poder do ensaio com ácido tiobarbitúrico visto que permitiria avaliar dois aspectos da peroxidação lipídica espermática: a disponibilidade de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática do espermatozóide, através dos quais iria se iniciar a reação peroxidativa em cadeia, e a habilidade do espermatozóide em inibir a propagação deste processo através de mecanismos antioxidantes (AITKEN et al., 1993b).

Uma das formas de se induzir a produção de EROs é através da reação entre a hipoxantina e a xantina oxidase que resultaria em uma redução univalente e bivalente da molécula de oxigênio (O_2) gerando o ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente. Estes radicais irão dar origem ao radical hidroxila (OH^-), que é altamente reativo e especialmente deletério para o espermatozóide (AITKEN et al.; 1993a,b; SIKKA, 1996; ARMSTRONG et al., 1999).

Outra técnica muito utilizada para provocar a peroxidação lipídica, é a indução pelo sistema sulfato de ferro + ácido ascórbico. Esta técnica se baseia na formação de íons de ferro que irão catalisar a quebra de hidroperóxidos pré-existentes iniciando a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica (AITKEN et al., 1993c; GRIVEAU et al., 1995). Assim, ocorrerá a peroxidação promovida pelo ferro, através da reação de Fenton, na qual o ácido ascórbico provocaria a redução do Fe^{2+} para Fe^{3+} , que por sua vez, participaria na produção de OH^- a partir do H_2O_2 (AITKEN et al., 1993b; ENGEL et al., 1999).

Em modelo proposto por Twigg et al. (1998), a adição de NADPH exógeno em amostras espermáticas humanas foi capaz de gerar EROs *in vitro*, causando efeitos prejudiciais na motilidade e no DNA espermáticos. Este sistema baseia-se no fato de que a produção de EROs intracelular pelo espermatozóide é dependente do NADPH, que geraria elétrons para a produção inicial do ânion superóxido (AITKEN et al., 1993b).

Sharma et al. (1999) criaram um índice de determinação do estresse oxidativo que levaria em conta a relação entre os níveis de EROS e de antioxidantes. Resultados obtidos por estes pesquisadores indicaram que este índice é uma ferramenta importante na discriminação entre pacientes férteis e inférteis, quando se compara a dosagem de EROS ou de antioxidantes avaliadas individualmente.

MATERIAIS
E
MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *campus* de Jaboticabal (FCAVJ/UNESP) e no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. As atividades foram realizadas em três ciclos de reprodução compreendidos nos anos de 2005-2006-2007 e 2008 e foi dividido em três partes: primeiro ciclo – seleção dos animais; segundo ciclo – Experimento Piloto e terceiro ciclo – Experimento.

Para a seleção dos animais foram realizados os seguintes procedimentos: contenção do animal, remoção de penas, limpeza da região da cloaca, coleta e análise imediata do sêmen.

O Experimento Piloto incluiu coleta e avaliação de sêmen de perdizes suplementadas ou não com selênio, através da mensuração do volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e determinação da atividade das enzimas antioxidantes Catalase e Glutathione Peroxidase.

No Experimento, além dos procedimentos inclusos no Experimento Piloto foi realizado testes funcionais (avaliação da integridade de membrana plasmática, integridade do acrossomo, integridade do material genético e atividade mitocondrial da peça intermediária) no sêmen de perdizes dos grupos com e sem suplementação de selênio.

5.1 Delineamento experimental

Para o experimento, as aves foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Grupo Controle, aves não suplementadas com selênio e Grupo Selênio, aves suplementadas com selênio.

5.2 Animais e alojamento

Os animais do experimento são provenientes do criatório experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *campus* de Jaboticabal (FCAVJ/UNESP), localizado numa altitude média de 583m, na latitude de 21°15'20" S e longitude de 48°19'16" O, ficando distante da capital paulista cerca de 344Km (FUNDAÇÃO SEADE).

As aves foram escolhidas ao acaso, receberam água e ração peletizada *ad libidun*, desenvolvida por pesquisadores da FCAV, de acordo com o sugerido por Moro (1996). Com o início da fase reprodutiva, a ração de manutenção dada para os animais adultos foi trocada para a de postura (Anexo A).

Selecionou-se 30 machos, que foram mantidos em boxes de 2m de comprimento por 1m de largura, com piso de alvenaria forrado com cama de feno de gramínea, e laterais delimitadas por base de alvenaria de 10cm, lona azul (20cm) sobre essa base e tela metálica de malha fina, localizados no Galpão de Recria de Perdizes da FCAV/UNESP (Figuras 1 e 2 A, B, C e D).

Figura 1- Vista frontal e lateral do Galpão de Recria de Perdizes da FCAV/UNESP

A

B

C

D

Figura 2- A – Vista frontal dos boxes, B – Vista lateral dos boxes, C – Interior do Box com água e ração *ad libitum*, D – corredor do Galpão de Recria de Perdizes da FCAV/UNESP

5.3 Coleta do sêmen

Anteriormente às coletas, realizou-se a montagem dos equipamentos e materiais necessários para os procedimentos.

Para a coleta de sêmen foi necessário o corte das penas laterais e a remoção das penas da região pericloacal para não haver perda nem contaminação das amostras, de acordo com Cavalcante (2005) (Fig. 3 A e B).

Figura 3- A – Corte das penas laterais, B – Contenção

Para a detecção do início da estação reprodutiva, foram observados alguns parâmetros comportamentais tais como: agressividade, emissão de piados, inquietude e tentativas de cópula. A comprovação da estação reprodutiva era realizada com a presença de células espermáticas nas amostras coletadas. Na tentativa de amenizar o estresse térmico, o que poderia alterar o comportamento reprodutivo, foi realizado aspersões de água nos corredores e laterais do galpão nos dias em que a temperatura ultrapassava 36°C e verificação constante do nível de água dos bebedouros (Figuras 4 A e B).

Figura 4- A – Comportamento Reprodutivo, B – Tentativa de cópula

Para a técnica de colheita de sêmen, realizou-se a exposição do falo com as mãos enluvadas. Logo após esse procedimento realizou-se um rápido exame de inspeção clínica do órgão.

As amostras de sêmen foram coletadas através de pressão digital na base do falo e nas ampolas dos ductos deferentes abdominal seguindo a metodologia proposta por Cavalcante (2005) (Figuras 5 A e B).

Figura 5- A – Coleta de sêmen, B – Detalhe da técnica de coleta de sêmen (fotografias cedidas por Ana Karina Cavalcante)

5.4 Experimento piloto

O grupo das 30 aves selecionadas foi subdividido em dois grupos, para o protocolo de suplementação de selênio. O primeiro grupo foi o controle onde não foi realizada a suplementação. Para o segundo grupo foi utilizado um selênio orgânico¹ é retirado da levedura derivada da cepa *Saccharomyces cerevisiae*, durante o período de outubro de 2006 a março de 2007, numa dosagem de 0,05mg em 100kg de ração.

Foram coletadas amostras de sêmen do grupo com e sem selênio, separadamente, que foram aliquotadas em *pools* de 100µl e depositadas em criotubos com capacidade de 1,5ml, sendo congeladas em botijão de nitrogênio líquido e encaminhadas para o laboratório de Andrologia da FMVZ-USP para a

¹ Sel Plex® da empresa Alltech do Brasil

análise da atividade das enzimas antioxidantes (catalase e glutathione peroxidase).

Seguindo esse procedimento novas amostras foram coletadas e avaliadas quanto ao volume, motilidade, vigor e morfologia espermática individualmente. Em seguida elas foram aliquotadas em *pools* com volume de 100µl de sêmen que foram homogeneizados e analisados novamente quanto ao vigor e motilidade. Esses *pools* foram processados para a análise da resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

As análises imediatas (volume, cor, motilidade, vigor) das amostras seminais foram feitas no Galpão de Recria da FCAV/UNESP, enquanto que as laboratoriais (concentração, morfologia espermática e provas bioquímicas) foram realizadas no Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

5.4.1 Análise do sêmen

Imediatamente após a colheita do sêmen, realizou-se o exame visual da amostra. Observou-se a coloração e possíveis contaminações com fezes e urina. O volume foi descrito através de observação direta em tubo capilar graduado.

A motilidade e vigor espermático foram mensurados através do depósito de uma gota de sêmen (5µl) diluída em solução fisiológica na proporção de 1:10, entre lâmina e lamínula, observadas em microscópio de luz².

A motilidade foi classificada subjetivamente, numa escala de 0 a 100%, segundo a proporção de espermatozóides móveis nos campos observados, sendo 0% para nenhum dos espermatozóides móveis e 100% para todos eles móveis.

² Taimin, modelo TN212B

O vigor foi analisado através da intensidade do movimento da cauda espermática numa escala de 0-5, onde no 0 havia ausência de movimento e 5 movimentos intensos e contínuos.

A concentração espermática foi determinada através da contagem em câmara de hematimetria (Neubauer), utilizando-se as recomendações usuais para contagem de células sangüíneas. Para tanto, uma alíquota de 2µl de cada amostra foi colocada em microtubo plástico identificado, contendo 998µl da solução de formol salino a 37°C, em seguida os tubos foram estocados em geladeira a 5°C para análise posterior.

Para avaliação da morfologia espermática, utilizou-se a técnica da preparação úmida, que consiste de uma alíquota de 5-10µl de sêmen diluído em formol salino depositada entre lâmina e lamínula, que posteriormente foram vedadas com esmalte e avaliadas 200 células em microscópio de interferência diferencial de fases (1000X)³.

5.4.2 Provas bioquímicas

As provas bioquímicas seguiram as descrições abaixo relacionadas.

5.4.2.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARs

O primeiro passo da seqüência para a análise da resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo, por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, foi verificar a motilidade e vigor de cada amostra dos *pools* de sêmen com suplementação de selênio e sem suplementação de selênio.

³ Olympus Optical Co. Ltd., modelo BX50F4

Após esses exames foi aferida a concentração espermática e então através de uma regra de três foi ajustado e padronizado o número de 30 milhões de espermatozóides/ml, para serem submetidos à prova do TBARS.

As determinações basearam-se na metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979), que tem como fundamento a 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 à temperatura entre 90 e 100°C, em pH ácido.

Com o ajuste de 30 milhões de espermatozóides já calculado, acrescentou-se à amostra solução fisiológica a 0,9%, chegando ao volume diluído de 1,0ml. Esse procedimento foi realizado para diluir a amostra que, no caso das perdizes, é muito concentrada e possui pouco plasma seminal.

Adicionou-se a essa amostra diluída 250µl de ácido ascórbico e 250µl de sulfato ferroso. Da amostra misturada (1,5ml), foi retirado 500µl e depositado em um tubo eppendorf de 1,5ml acrescentado a 250µl de formol salino para nova averiguação da concentração para equiparar com a concentração calculada anteriormente. O restante da amostra (1,0ml) ficou incubado em banho-maria a 37°C durante 1 hora e 30 minutos para a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS).

Após o período de incubação, adicionou-se 2,0ml de solução de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%), previamente mantido a 5°C, e a amostra foi centrifugada durante 15 minutos a 5000 rpm, para a precipitação de proteínas.

Terminado o processo de centrifugação, o sobrenadante foi retirado através de pipeta automática, acondicionado em criotubos identificados e em seguida, congelados em botijão de nitrogênio líquido. Ao fim da coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Andrologia FMVZ-USP para serem processadas.

Para a análise de TBARs, adicionou-se em tubos de ensaio 500µl das amostras previamente descongeladas, juntamente com 500µl de ácido

tiobarbitúrico a 1% (TBA 1%)⁴, dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH) 0,05N⁵; preparado instantes antes de ser utilizado.

Alíquotas de 500µl do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 500µl de TBA 1%, incubadas em banho fervente (90-100°C) por 15 minutos e resfriadas em banho de gelo (0°C) para cessar a reação.

Os TBARs foram quantificados em espectrofotômetro⁶ em um comprimento de onda de 532nm, sendo os resultados comparados com uma curva padrão, feita previamente com malondialdeído (MDA)⁷.

O MDA é uma das principais substâncias que reage 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 MDA, sendo que a resistência à peroxidação lipídica no sêmen se expressa em nanogramas de TBARS/ml de sêmen.

5.4.3 Atividade das enzimas antioxidantes

As alterações no metabolismo oxidativo foram estudadas determinando-se a atividade das enzimas antioxidantes: catalase e glutathione peroxidase nos *pools* de sêmen congelado direto no botijão de nitrogênio líquido.

Para a análise das enzimas antioxidantes, as amostras de sêmen que foram congeladas no Galpão de Recria da FCAV/UNESP, foram submetidas ao choque frio e após descongelamento em banho-maria a 37°C, realizou-se dois ciclos de congelamento e descongelamento. O congelamento foi realizado através da imersão das amostras em nitrogênio líquido e o descongelamento realizado em banho-maria a 37°C.

O choque frio se faz necessário para que ocorra a liberação das enzimas antioxidantes intracelulares, através do rompimento das membranas celulares

⁴ Sigma T 5500

⁵ Sigma S 8045

⁶ Ultrospec 3300pro, Amersham Pharmacia

⁷ Sigma 10,838-3

(MENNELLA; JONE, 1980). Após esse processo, as amostras de sêmen foram centrifugadas⁸, por 15 minutos, com temperatura de 4°C e 10.000g, para obtenção do plasma seminal (sobrenadante).

Todas as determinações foram realizadas em espectrofotômetro⁹ nas temperaturas e comprimentos recomendados para cada enzima.

5.4.3.1 Catalase

Sua atividade é determinada através da mensuração do peróxido de hidrogênio consumido (H_2O_2), durante 8 minutos, pela leitura espectrofotométrica a 230nm e 30°C. O meio de reação deve conter 10µl de amostra (plasma seminal), adicionados a 90µl de Tris-aminometano¹⁰/EDTA¹¹ solução de buffer (50mM e 250mM, respectivamente), pH 8,0 e 900µl de H_2O_2 (concentração final de 9,0mM).

A absorbância foi mensurada a cada 5 segundos e a curva de consumo de H_2O_2 comparada ao branco.

Para os cálculos, utilizou-se $0,071M^{-1}cm^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $0,071M^{-1}cm^{-1}$ (ϵH_2O_2). Seguindo a fórmula:

$$\text{Atividade da catalase} = \frac{\Delta \text{ de absorbância da amostra}}{0,071 \times \text{diluições}}$$

5.4 3.2 Glutathione peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da (GPx) é baseada na mensuração do consumo de NADPH. A reação entre um hidroperóxido e glutathione reduzida é catalisada pela GSPH-Px em conjunto com a enzima glutathione redutase

⁸ Centrífuga Eppendorf 5804R

⁹ Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences

¹⁰ Sigma 25,285-9

¹¹ Sigma E9884

(GSSGr). Esta reação causa a conversão do dissulfato de glutathiona (GSSH-glutathiona oxidada) para GSH, que consome NADPH (medido por espectrofotômetro).

A mistura para o ensaio consistiu de NADPH (0,12nM, 1ml) GSH (1nM, 100µl), GSSGr (0,25U/ml, 20µl) e azida sódica (0,25mM, 20µl) adicionados a um volume de 100µl de plasma seminal.

A célula do espectrofotômetro foi ajustada para um volume de 1,9ml com buffer de fosfato 143mM, EDTA 6,3mM (pH 7,5), isto também foi utilizado para dissolver o NADPH.

A GSH foi dissolvida em ácido metafosfórico a 5, em seguida adicionou-se a azida sódica para inibir a ação da catalase. Esta reação foi iniciada com a adição de 1,2M de tert-butil-hidroperóxido (TBHP, 100µl) e o consumo de NADPH foi detectado com um comprimento de onda de 340nm, por 10 minutos a 37°C (mensurações realizadas a cada 5 segundos).

Os resultados da GSH-Px foram expressos em GSH-Px/ml de sêmen, e os cálculos utilizados de $6,22\text{nM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ como a rarefação do coeficiente de NADPH.

5.5 Experimento

Seguindo o procedimento similar ao Experimento Piloto, as aves foram divididas em dois grupos. O grupo controle recebeu apenas a ração tradicional, cujo premix de vitaminas e minerais continha 70mg de selênio/100kg de ração. Enquanto o grupo suplementado recebeu a ração tradicional adicionada de 0,2 a 0,8mg do mesmo selênio orgânico utilizado no Experimento Piloto, durante o período de setembro a dezembro de 2007. Esperou-se um mês para o início das coletas, para que as aves estivessem adaptadas ao novo manejo.

Para as análises do Experimento foram coletadas amostras de sêmen do grupo com e sem selênio, separadamente, que foram aliqüotadas em *pools* de 150µl e depositadas em criotubos com capacidade de 1,5ml.

Imediatamente após a coleta dos *pool/s* foram medidos os volumes e realizados os testes convencionais (motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática), seguindo o mesmo protocolo descrito no Experimento Piloto.

Após a captação de amostras para a análise dos testes convencionais, foram retiradas do mesmo *pool* 20µl de sêmen que foram diluídas em 300µl de solução fisiológica, para a realização dos testes funcionais, seguindo os passos abaixo descritos:

5.5.1 Análise da Integridade Acrossomal

Para análise da integridade acrossomal, uma alíquota de 10µl de sêmen fresco foi adicionada em 10µl do Corante Simples de Pope - Fast Green/Rosa Bengala (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991) e incubada durante 70 segundos. Após esse período, uma alíquota desta mistura foi depositada em uma lâmina e, com auxílio de uma lâmina lapidada, foi preparado um esfregaço, que foi avaliado em microscópio de luz (1000X). Foram contadas 200 células que foram classificadas em:

- Acrossomo Íntegro: região acrossomal de coloração lilás.
- Acrossomo Não-Íntegro: região acrossomal de coloração rosa.

5.5.2 Análise da integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a combinação dos corantes eosina e nigrosina (E/N) em esfregaço de sêmen fresco. A porcentagem de espermatozóides vivos no ejaculado pôde ser determinada através da característica que a membrana plasmática dos

espermatozóides vivos tem de ser impermeável a corantes (moléculas grandes). Este corante confere cor rosa aos espermatozóides mortos, mantendo-se incolores os espermatozóides vivos (DOTT; FOSTER, 1972).

Para a realização do teste, uma contagem de 200 espermatozóides foi realizada em microscópio de luz, sob aumento de 1000x de forma a diferenciar as células vivas (não coradas) das mortas (coradas). Para a preparação das lâminas, uma alíquota de sêmen (10µl) foi misturada ao corante na proporção de 1:1. Essa mistura ficou incubada por 45 segundos e executaram-se esfregaços sobre lâminas de microscopia.

5.5.3 Avaliação da atividade mitocondrial

Os espermatozóides são células metabolicamente ativas que realizam tanto a glicólise como a respiração mitocondrial, mantendo um adequado balanço energético necessário para o transporte e as demais funções celulares (BARBOSA; ESPER, 1997).

A atividade citoquímica foi determinada usando o método descrito por Hrudka (1987), que cita que a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) é uma das responsáveis pela respiração celular e metabolismo energético das células. A técnica baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO. Através de uma reação em cadeia, o DAB é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, nas mitocôndrias, que é identificada através de uma coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos a que os espermatozóides são submetidos.

Para o processamento da técnica, amostras de sêmen de cada *pool* foram incubadas em meio contendo DAB. Uma alíquota de 200 µL da amostra diluída em solução fisiológica foi adicionada a 200 µL do meio de incubação,

homogeneizada em tubo tipo *Eppendorf* cor âmbar, colocada em banho-maria a 37°C, durante 60 minutos, na ausência de luz.

Foi realizado um controle negativo obtido com duração e condições idênticas, tendo sido previamente adicionado formol salino para inibir sua atividade mitocondrial. Após incubação foram preparados dois esfregaços de cada suspensão, fixados em formaldeído 10% por 10 minutos, lavados e secos ao ar.

As avaliações dos espermatozóides foram feitas em objetiva 100x, sob imersão em óleo, usando microscopia de contraste de fase. Foram classificados 200 espermatozóides por *pool*. A avaliação da atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozóides obedeceu escala de quatro classes propostas por Hrudka (1987), onde:

- Classe I: Quase todas as mitocôndrias são ativas (coradas), ou seja, contém um produto de reação colorida dando à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente.
- Classe II: A bainha mitocondrial aparece fragmentada, isto é, consiste em segmentos ativos (corados) e inativos (não corados) com predominância dos ativos.
- Classe III: Espermatozóides com menos da metade da bainha mitocondrial ativa (não-corados) e com poucas mitocôndrias ativas (corados) dispersas.
- Classe IV: Espermatozóides completamente inativos (não-corados), sem atividade mitocondrial.

5.5.4 Avaliação da integridade do DNA espermático

Para avaliar a integridade do DNA espermático foi utilizada a técnica do Ensaio Cometa Alcalino de acordo com Donnelly et al. (2000).

Para o processamento da técnica utilizou-se sêmen de perdiz previamente aliquotados em *pools* que foram mergulhados em nitrogênio líquido nos tempos 2, 12 e 24 horas (DUTTY et al., 2002).

Foram preparadas duas lâminas por amostra com 1000µl de Agarose de ponto de fusão normal – *Normal Melting Point* (NMPA) a 1% em TBE (0,089M Tris; 0,089M Borato; 0,002M EDTA), um dia antes de realizar o protocolo, mantidas fora da geladeira secando no fluxo a temperatura ambiente. Foi diluída uma alíquota da amostra em Agarose de ponto de fusão baixo – *Low Melting Point* (LMPA) a 0,75% em TBE para ajustar a concentração final em 1×10^6 /ml, e 100µl da diluição foi adicionado no centro e por todo o comprimento de cada lâmina que eram cobertas por lamínulas e mantidas a 4°C por 10 minutos para solidificação.

Após esse período observou-se se as lâminas estavam solidificadas, em caso negativo, levou-se à geladeira para solidificar completamente. Estando as lâminas solidificadas, eram retiradas da geladeira e adicionados 300µl de LMPA 0,75% em TBE. Novamente, as lâminas eram cobertas por lamínulas e mantidas, dessa maneira, a 4°C por 10 minutos.

As lamínulas foram retiradas e as lâminas cobertas com 2ml de solução de lise gelada (100mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 2,5M NaCl, 2% Triton X-100, 4mM DTT, pH=11,0) por, no mínimo, 2 horas a 4°C. Utilizando-se 1ml para cada lâmina. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram então lavadas com água Milli-Q 2 vezes por 10 minutos para remover o excesso de sais. Esse procedimento tem que ser feito dentro da geladeira.

Em seguida elas foram imersas em solução alcalina de eletroforese (300mM NaOH, 1mM Na₂-EDTA, pH>13.0) por 20 minutos para soltar a dupla fita do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 1,5V/cm e à uma intensidade de corrente até 270 mA, sendo que a amperagem deve ser sempre a mesma e a voltagem dependerá do comprimento da cuba. Posteriormente, as lâminas foram retiradas da cuba e lavadas com TBE (2X /5 min), com água Milli-Q (1X /5 min) e fixadas (3X /2 min) em etanol.

Em seguida, as lâminas foram coradas com Brometo de Etídeo (1µL de EtBr - 10mg/ml diluído em 1,5ml de TBE por lâmina ou 20µg/ml) durante 15 minutos. Após esse tempo, as lâminas eram novamente lavadas com TBE (3

vezes, por 15 minutos) para remover a coloração de fundo e então avaliadas utilizando-se um microscópio de epifluorescência¹² contando 200 espermatozóides/lâmina.

A classificação se deu de acordo com a intensidade do dano no DNA observado pela cauda e intensidade nuclear, sendo divididos nas seguintes classes:

- Classe I: Células com halo ao seu redor e núcleo corado, porém sem cauda de cometa evidente, indicando pouca fragmentação no DNA (COMETA I).
- Classe II: Célula com formação de cauda e com núcleo pouco descorado, indicando danos leves no DNA (COMETA II).
- Classe III: Célula com cauda de cometa já formada, porém com núcleo ainda parcialmente corado, indicando danos evidentes no DNA (COMETA III).
- Classe IV: Célula com núcleo completamente descorado e apenas a cauda do cometa, indicando fragmentação intensa do DNA (COMETA IV).

5.5.5 Provas Bioquímicas

Dando sequência ao processamento das amostras dos *pools* contidos nos criotubos, foram retiradas alíquotas de 20µl de cada pool separadamente para a execução da análise da resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, para tanto, se seguiu o mesmo protocolo descrito no Experimento Piloto.

O restante das amostras dos *pools*, que já estava acondicionado em criotubos, foi congelado diretamente em botijão de nitrogênio líquido e encaminhado para o Laboratório de Andrologia da FMVZ-USP para serem

¹² G-2A, Nikon, Japão

processados e analisados quanto à atividade das enzimas antioxidantes (catalase e glutathione peroxidase), também seguindo o protocolo descrito no Experimento Piloto.

5.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000).

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

Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões das médias e as médias (média $\pm$ desvio padrão) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (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 resposta foram analisadas através da correlação de Pearson e Spearman para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Os resultados de correlação foram expressos através do coeficiente de correlação (r) e seu nível de significância (p).

As variáveis resposta: porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra, número de animais por *pool*, concentração espermática, motilidade espermática, número de espermatozóides por ejaculado, volume do ejaculado por animal, vigor espermático, avaliação da atividade mitocondrial Classes I (quase todas as mitocôndrias são ativas), Classe II (bainha mitocondrial aparece fragmentada) e resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo, por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), obedeceram às premissas, tendo sido analisadas através do procedimento paramétrico.

As variáveis resposta porcentagem de células com membrana plasmática espermática íntegra, porcentagem de células com morfologia normal, porcentagem de células com atividade mitocondrial Classe III (com menos da metade da bainha mitocondrial ativa) e determinação da atividade da enzima Glutathione Peroxidase não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para logaritmo na base 10 de seus valores.

As variáveis resposta porcentagem de células com defeitos de cauda fortemente dobrada, peça intermediária fortemente dobrada, cabeça fortemente dobrada, peça intermediária dobrada, cauda dobrada, cauda enrolada, cauda fortemente enrolada, porcentagem de células com presença de gota proximal e porcentagem de células toda enrolada não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-las. Estas variáveis foram, então, analisadas como variância não paramétrica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises das amostras coletadas para o experimento estão apresentados nas tabelas abaixo.

6.1 Variáveis: número de animais, volume, número de espermatozóides por ejaculado, concentração e volume do ejaculado por animal

Na tabela 1 estão apresentados os resultados das variáveis número de animais, volume, número de espermatozóides por ejaculado, concentração e volume do ejaculado por animal encontrados no experimento.

Tabela 1 – Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade do número de animais por *pool*, volume seminal (μ l), número de espermatozóides por ejaculado ($\times 10^9$), concentração ($\times 10^9$ spz/ml) e volume do ejaculado de cada animal (μ l), dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

Variáveis	C/ Se	S/ Se	P
Animais	5,44 $\pm$ 0,52	6,77 $\pm$ 0,72	0.1561
Volume	145,33 $\pm$ 4,87	153,44 $\pm$ 5,82	0.3016
Sptz/ejac	95,26 $\pm$ 11,78	69,16 $\pm$ 14,43	0.1800
Concentração	3,44 $\pm$ 0,41	2,72 $\pm$ 0,41	0.2317
Volume/Perdiz	28,30 $\pm$ 2,34	24,66 $\pm$ 2,58	0.3122

(sptz/ejac: número de espermatozóides por ejaculado)

Diferenças estatísticas (p<0,05)

6.2 Variáveis: Motilidade e Vigor

Na tabela 2 estão apresentados os resultados das variáveis motilidade e vigor encontrados no experimento.

Tabela 2 – Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade da motilidade (%) e vigor (0-5), dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

Variáveis	C/ Se	S/ Se	P
Motilidade	74,6 ± 2,99	70,65 ± 1,93	0.2831
Vigor	3,43 ± 0,10	3,22 ± 0,17	0.2948

Diferenças estatísticas (p<0,05)

Apesar das análises dos resultados das variáveis descritas nas Tabelas 1 e 2 não demonstrarem diferença estatística significativa, os valores absolutos encontrados no grupo tratado com selênio foram melhores, quando comparados com o grupo não tratado. O Selênio e a Vitamina E promovem uma proteção celular às membranas biológicas (MACARI et al., 1994), podendo esse argumento servir de base para essa diferença encontrada nos valores absolutos apresentados.

Corroborando com esses resultados, Tavian (2005), verificou uma diferença significativa entre os espermatozóides do grupo de perdizes machos tratados com suplementação de selênio e não tratados, nas variáveis: motilidade, vigor e concentração (p<0,01, p<0,01 e p<0,05, respectivamente), sendo que o volume não apresentou diferença significativa (p=0,7087).

Evidenciando as variáveis motilidade e vigor espermático, uma explicação para a vantagem obtida do grupo tratamento sobre o controle pode ser amparada pelo relato de Surai (2002) que diz que a deficiência de selênio está associada com danos na arquitetura da peça intermediária do espermatozóide, o que compromete a mobilidade e a capacidade de fertilização deste.

Por outro lado, Silva et al. (2003), estudaram a suplementação de dietas para galos, contendo Selênio inorgânico com ou sem adição de selênio orgânico e os dados analisados indicaram que o fornecimento de selênio orgânico apresentou uma tendência a reduzir a motilidade e o vigor espermático.

Comparando a média dos valores de volume encontrada no grupo controle (sem selênio) com dados presentes na literatura podemos verificar que a média encontrada nesse experimento (28,30µl), superou a média descrita por Cavalcante (2006), que encontrou um volume seminal de 14,13µl em perdizes. Esta diferença poderia ser explicada pelo tempo de condicionamento mais prolongado utilizado no presente experimento em relação ao descrito por Cavalcante (2006). Isto possibilitaria aos animais uma melhor adaptação em relação à manipulação, o que diminuiria o estresse provocado pelo manejo, que prejudica o desempenho reprodutivo, porque envolve manifestações comportamentais nos animais. Mudanças de comportamento influenciam atividades como corte e acasalamento, aceitação do parceiro, agressividade com o companheiro, dentre outras em emas. (GÓES, 2004).

François et al. (1998) citaram que as técnicas de criação, levando-se em conta a adaptação a uma condição artificial, podem interferir nas necessidades básicas dos animais e no repertório comportamental dos mesmos. O cativeiro é direcionado para a produção em escala de produtos ou subprodutos de origem animal e pode levar os animais a situações de desconforto, induzindo-os ao estresse, com manifestações comportamentais. Um dos colaboradores para isso é o fato desses animais serem mantidos em grupos maiores do que quando em situação de natureza, induzindo-os a um excesso de interações sociais. Pesquisas sobre o bem estar animal podem fazer muita diferença num processo produtivo.

Paranhos da Costa e Cromberg (2001) citam que os animais possuem sistemas funcionais de controle que atuam na manutenção do equilíbrio do organismo. Constantes estimulações do meio, agindo sobre os animais, acionam esses sistemas levando-os a buscar recursos e estímulos necessários para a manutenção de seu controle.

Peixoto e Tischer (2005) analisaram dados à respeito da reprodução de perdizes em zoológicos e verificaram que é bastante baixa, variando de 3,03 a 32,61%, em relação às perdizes mantidas em criadouros comerciais ou conservacionistas, e afirmam que a origem do estresse dos animais nesses sistemas de criação pode estar associada à impossibilidade dos animais executarem seu repertório comportamental, notadamente no que diz respeito à corte e acasalamento.

Podemos utilizar o mesmo argumento acima descrito para tentar explicar também as diferenças dos valores encontrado nesse experimento e os citados por Cavalcante (2006), para as variáveis: motilidade (70,65% e 66%), vigor (3,22 e 2,30) e concentração ($2,72$ e $0,93 \times 10^9$ sptz/ml) respectivamente.

Além disso, devemos levar em consideração a maturidade sexual dos animais que fizeram parte do experimento, em relação à idade, o que pode provocar variação nos valores das variáveis observadas. Nos registros zootécnicos do Galpão de Recria de Perdizes da FCAV/UNESP, a média de vida registrada informalmente é de 5 anos, sendo que há exemplares registrados com mais de 6 anos. No experimento descrito por Cavalcante (2006) utilizou-se aves com idade entre 1 a 2 anos. Para esse experimento foram utilizadas aves com idade entre 3 a 4 anos.

Outro fato interessante de ser comentado é que para esse experimento foi necessário a formação de “pools” de sêmen, pois a quantidade de sêmen coletada por animal é insuficiente para a realização dos protocolos que foram realizados. É importante salientar que na hora da coleta para a formação do “pool” tentamos esgotar ou coletar o máximo de quantidade possível da amostra

o que talvez não fosse necessário se coletássemos de cada animal por separadamente.

6.3 Variável: Morfologia Espermática

Na tabela 3 estão apresentados os resultados da variável morfologia espermática encontrados no experimento.

Tabela 3 – Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade das alterações morfológicas de espermatozóides, dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

Variáveis	C/ Se	S/ Se	P
NORMAIS	39,72 ± 5,20	42,44 ± 4,29	0.5911
CAUDA FORT. DOB	45,61 ± 4,51	32,66 ± 5,75	0.0702
P.I. FORT. DOB.	1,33 ± 0,53	3,78 ± 0,69	0.0107
CAB. FORT. DOB.	2,00 ± 0,64	2,44 ± 0,76	0.3467
CABEÇA ENROLADA	1,00 ± 0,42	1,33 ± 0,49	0.2514
P.I. DOBRADA	0,50 ± 0,14	1,06 ± 0,32	0.1546
CAUDA DOBRADA	3,11 ± 0,95	3,50 ± 0,61	0.3157
CAUDA ENROLADA	0,89 ± 0,50	0,50 ± 0,26	0.3463
CAUDA FORT. ENR.	5,61 ± 1,41	12,44 ± 3,72	0.1516
GOTA PROXIMAL	0,11 ± 0,11	0	0.1932
TODO ENROLADO	0,11 ± 0,11	0,22 ± 0,15	0.2960

(CAUDA FORT. DOB.: cauda fortemente dobrada, P.I. FORT. DOB.: peça intermediária fortemente, CAB. FORT. DOB.: cabeça fortemente dobrada, P.I.DOBADA: peça intermediária dobrada, CAUDA FORT. ENR.: cauda fortemente enrolada.)

Diferenças estatísticas (p<0,05)

Figuras: 6 a 11: Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (*Rhynchotus rufescens*), (1000x); Cauda fortemente dobrada, cauda fortemente dobrada, fortemente enrolada, todo enrolado, cauda enrolada e cabeça enrolada, respectivamente

A morfologia das células espermáticas de perdizes foi observada segundo descrito no item materiais e métodos deste trabalho.

Assim como Phillips e Asa (1989) e Góes (2004) citaram sobre os espermatozoides das emas, os espermatozoides de perdizes também são caracterizados por apresentarem uma peça intermediária curta entre a cabeça e a peça principal assemelhando-se a morfologia espermática encontrada em galos.

As alterações morfológicas encontradas na tabela 3 estavam similares às relatadas por Cavalcante (2006) que cita defeitos de: acrossomo (0,79%), cabeça (10,45%) (Figura 11), peça intermediária (16,06%), cauda (14,99%) (Figuras 6,7,8 e 10) e outros (1,28%) (Figura 9), sendo que dentro desses resultados os defeitos mais encontrados foram: peça intermediária dobrada, cauda dobrada, cauda enrolada e fortemente enrolada e cabeça enrolada, entre outras.

Algumas alterações morfológicas encontradas nos espermatozoides de perdizes já foram descritas para galo doméstico (CAVALCANTE, 2006), entre elas estão: acrossomo intumescido e acrossomo destacado (MAEDA et al., 1986);

cabeça enrolada (BAJPAI, 1963; CLARKE et al., 1984); peça intermediária com gota (BAJPAI, 1963) e peça intermediária dobrada (MAEDA et al., 1986) e de cauda enrolada e cauda dobrada (BAJPAI, 1963; CLARKE et al., 1984).

Segundo Góes (2004), as alterações morfológicas mais encontradas em sêmen de emas foram: cabeça dobrada, cauda dobrada, cauda fortemente dobrada, cauda fortemente enrolada, cauda enrolada e inserção retroaxial.

Observando os resultados descritos na tabela 3 encontrou-se uma menor porcentagem de espermatozóides com peça intermediária fortemente dobrada, nos animais tratados com selênio em relação aos não tratados ($1,33 \pm 0,53$ vs. $3,78 \pm 0,69$, respectivamente; $p= 0.0107$). De fato, sabe-se que o selênio tem papel importante na estrutura dos espermatozóides (DIMITROV et al., 2007). Surai (2002) cita que a deficiência de selênio está associada com danos na arquitetura da peça intermediária do espermatozóide.

Silva et al. (2003) estudaram a suplementação de dietas para galos, contendo Selênio inorgânico com ou sem adição de orgânico e os dados analisados indicaram que o fornecimento de selênio orgânico apresentou uma tendência a reduzir a taxa de espermatozóides anormais e com anomalias morfológicas da peça intermediária e apresentou valores superiores em taxas de espermatozóides normais do ejaculado porém apresentou também valores superiores em taxas para defeitos morfológicos de cabeça.

6.4 Variáveis: Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal

Na tabela 4 estão apresentados os resultados das variáveis integridade das membranas plasmática e acrossomal.

Tabela 4 – Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), e espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

Variáveis	C/ Se	S/ Se	P
E/N	76,69 ± 8,53	67,17 ± 6,32	0.3772
POPE	88,94 ± 1,48	88,28 ± 2,93	0.8494

Diferenças estatísticas (p<0,05)

Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) coradas com Eosina-nigrosina (1000x). Fig 12 – Membrana Plasmática Íntegra, 13 – Membrana Plasmática não-Íntegra

Fotomicrografia de células espermáticas de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) coradas pela técnica da coloração simples para acrossomo (1000x). Fig.14- Acrossomo Íntegro, 15- Acrossomo não-Íntegro

Como pode ser observado na tabela 4, não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados para as porcentagens de células com membrana íntegra (Figura 12) e as células com acrossomo não lesados (Figura 14). No entanto, novamente podemos verificar uma diferença

entre os valores absolutos referentes aos grupos em questão, sendo que houve uma maior porcentagem de células com membrana íntegra e células com acrossomo não lesados no grupo tratado com selênio em relação ao grupo controle. Segundo Surai et al. (2002), o selênio regula uma gama de mecanismos fisiológicos em diversas espécies, entre eles a proteção antioxidante e a manutenção da integridade da estrutura do espermatozóide, o que explicaria a maior porcentagem de espermatozóides com acrossomo e membrana plasmática íntegros.

Ainda no experimento realizado por Silva et al. (2003), quando adicionou-se selênio orgânico à dieta houve uma tendência a reduzir a taxa de espermatozóides mortos (Figura 13).

6.5 Variável: Avaliação da Atividade Mitocondrial

Na tabela 5 estão apresentados os resultados da variável avaliação da atividade mitocondrial encontrados no experimento.

Tabela 5 – Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

Variáveis	C/ Se	S/ Se	P
DAB I	45,33 ± 3,41	43,22 ± 2,66	0.6322
DAB II	33,39 ± 2,93	44,39 ± 2,59	0.0125
DAB III	15,88 ± 3,24	10,88 ± 0,91	0.2438
DAB IV	3,44 ± 0,09	1,50 ± 0,38	0.0401

Diferenças estatísticas (p<0,05)

Figura 16: Fotomicrografia de células espermáticas de perdises (*Rhynchotus rufescens*) corados por DAB (1000x).
1-Classe I; 2-Classe II; 3-Classe III; 4-Classe IV

De acordo com a tabela 5, foi possível verificar diferença estatística significativa entre os grupos estudados para as porcentagens de espermatozoides classe II e IV (Figura 16) para o teste de avaliação da atividade mitocondrial (DAB II e IV).

Na análise desses dados, em relação ao DAB II, nota-se que houve uma maior porcentagem de células com a bainha mitocondrial fragmentada, comprometendo, em parte, a atividade mitocondrial do grupo controle (sem adição de selênio). Para tentar explicar essa diferença, devemos lembrar que a motilidade da célula espermática exerce um papel fundamental na fertilização (KATO et al., 2001) e está diretamente relacionada com a atividade mitocondrial (AMANN, 1989). Surai (2002) relatou que a deficiência de selênio está associada com danos na arquitetura da peça intermediária do espermatozoide, o que compromete a mobilidade e a capacidade de fertilização deste.

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante que contém selênio em sua composição e remove radicais peroxil de vários peróxidos, aumentando assim, a motilidade espermática (GRIVEAU; LE LANNOU, 1994), então o tratamento com selênio induziria uma proteção ao dano inicial das mitocôndrias, como observado nos resultados das altas porcentagens de células encontradas no DAB I, visto que uma vez iniciada uma lesão na mitocôndria, inicia-se a produção de oxidantes e o decréscimo dos níveis de glutathione, que

estimulam a mitocôndria a liberar proteínas ativadoras de caspase, tais como a citocromo-c e o fator de indução de apoptose (VOLTARELLI et al., 2008). A partir daí o selênio não seria mais eficiente. Por isso, podemos citar que o selênio melhora a motilidade das células espermáticas que, no caso do experimento (DABII), foi encontrada no grupo tratamento, visto que tem menor porcentagem de células com a bainha mitocondrial fragmentada.

Em relação aos dados encontrados no DAB IV, era esperado um resultado contrário ao obtido se levarmos em consideração a explicação acima mencionada. Porém, a porcentagem apresentada tanto para o grupo com selênio (3,44%) quanto a do grupo sem selênio (1,50%) foi baixa em relação ao total do teste de avaliação da atividade mitocondrial, e poderia ser questionada se avaliássemos todas as classes juntas. Podemos também levantar uma questão de que apesar de não ter apresentado resultados significativos nas variáveis volume, motilidade, vigor e concentração espermática, verificamos que os valores absolutos mostraram um melhor resultado para o grupo suplementado com selênio, o contradiz o resultado encontrado para DAB IV. Valle (2007) relatou que, em seu experimento realizado com colheita, análise e cripreservação de sêmen de Sagui-de-Tufo-Branco (*Callithrix jacchus*), a avaliação da atividade mitocondrial demonstrou que, embora tenha ocorrido queda nos valores das variáveis motilidade, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática, as células apresentavam atividade mitocondrial e, portanto, havia respiração celular e metabolismo energético.

6.6 Variável: Avaliação da Integridade do DNA

Na tabela 6 estão apresentados os resultados das variável avaliação da integridade do DNA encontrados no experimento.

Tabela 6 – Média, erro padrão da média (EPM), e teste de probabilidade de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação de integridade do DNA (COMETA I, II, III e IV), dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

Variáveis	C/ Se	S/ Se	P
COMETA I	76,60 ± 18,99	65,25 ± 11,75	0.6490
COMETA II	56,60 ± 11,77	76,75 ± 9,51	0.2414
COMETA III	16,00 ± 0,82	34,75 ± 1,44	<.0001
COMETA IV	24,00 ± 5,77	23,25 ± 9,99	0.9473

Diferenças estatísticas (p<0,05)

De acordo com a tabela 6, foi possível verificar diferença estatística significativa entre os grupos estudados para a porcentagem de espermatozóides classe III para o teste de avaliação da integridade do DNA (COMETA III). Podemos perceber que para o grupo tratado tiveram menos células com cauda de cometa já formada, porém com núcleo ainda parcialmente corado, indicando danos evidentes no DNA, dessa forma sugere-se que o tratamento com o selênio tenha dado um resultado positivo nessa classe.

Sakkas et al., (2002), relata que uma das causas para que ocorra a desfragmentação do DNA é o estresse oxidativo.

O selênio é um elemento essencial para o correto desenvolvimento espermático em mamíferos, (BERTELSMANN et al., 2005). McCoy (1969), conduziram um experimento em ratos, onde era oferecida uma dieta deficiente em selênio e verificou que a partir da segunda geração os ratos tornaram-se inférteis. Foi verificado que a deficiência de selênio causou anomalias e danos na condensação da cromatina espermática desses ratos e na integridade estrutural da peça intermediária.

A intensidade do dano da cromatina espermática de eqüinos teve correlação negativa significativa com o índice de selênio presente no espermatozóide dessa espécie ($r=-0.53$, $p < 0.0001$, $n = 65$). Esse fato sugere que índices menores de selênio presentes em espermatozóides levam a uma baixa qualidade espermática (BERTELSMANN et al., 2005).

O selênio é capaz de desintoxicar muitos peróxidos na forma de 5 peróxidos de glutatona (KYRIAKOPOULOS; BEHNE, 2002) e dessa forma pode estar envolvido na prevenção de dano da cromatina espermática (BERTELSMANN et al., 2005).

Donnelly, Mc Clure e Lewis (2003) incubaram amostras seminais de homens durante 4 horas com GSH junto a peroxidação induzida pela água oxigenada e verificaram uma diminuição da fragmentação do DNA espermático.

Em aves Beletti e Soares (2006), citaram que sêmen de galos férteis possui uma pequena quantidade de espermatozóides com baixa compactação de cromatina e alterações morfológicas.

6.7 Variável: Concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Na tabela 7 estão apresentados os resultados da variável concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), encontrados no experimento.

Tabela 7 – Média, erro padrão da média (EPM), e teste de probabilidade das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ng/30 milhões de células espermáticas), dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento

(suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

Variáveis	C/ Se	S/ Se	P
TBARS	1079,58 ± 85,32	1102,04± 83,35	0.8530

Diferenças estatísticas (p<0,05)

Quanto à resistência dos espermatozóides à peroxidação lipídica, não houve diferença significativa entre os grupos controle e selênio (p= 0,8530).

Não podemos afirmar que a suplementação com selênio foi eficiente para diminuir o estresse oxidativo no sêmen desta espécie. Sabe-se que um dos causadores de estresse oxidativo é o próprio estresse sofrido pelos animais através de alterações fisiológicas o que leva ao aumento da produção de ROS (SIKKA, 1996). Este fato também foi observado num experimento realizado por Hatamoto et al. (2006) onde observou que cães da raça Rottweiler submetidos ao estresse de trabalho apresentaram uma maior produção de TBARS, um índice do grau de peroxidação lipídica e conseqüentemente do estresse oxidativo.

A vitamina E possui o papel de antioxidante natural, atuando na neutralização de radicais livres. Está relacionada metabolicamente com vários nutrientes, principalmente com o selênio. Atua como oxidante na membrana citoplasmática, enquanto que o selênio, como componente da glutathione peroxidase, atua no citoplasma destruindo peróxidos (MACARI et al., 1994).

O selênio é um componente da glutathione peroxidase, uma enzima que tem atividade anti-oxidante dentro da célula. Essa enzima tem grande relação com a vitamina E (alfa-tocoferol) na prevenção da formação de peróxidos dentro da célula. A deficiência de selênio aumenta os requerimentos de vitamina E, bem como a deficiência de vitamina E aumenta os requerimentos de selênio (MACARI et al., 1994).

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 uma diminuição da peroxidação lipídica.

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

Danikowski et al. (2002) encontraram níveis de TBARS em sêmen de galos sem suplementação de tocoferol de 3,37nmol/ml e suplementados com tocoferol (100, 1000, 10000 e 20000IU/Kg da dieta) de 2,72; 2,02; 2,04 e 1,90nmol/ml respectivamente. Esses mesmos autores observaram que níveis de suplementação crescentes de vitamina E apresentam uma relação inversa com a concentração de TBARs no plasma seminal de galos. Contudo a diminuição de TBARs não é proporcional ao aumento na suplementação de vitamina E.

A comparação entre os resultados obtidos no presente experimento e os resultados obtidos por outros pesquisadores torna-se complicada visto que são poucos os estudos sobre os níveis de TBARS no sêmen de aves. Essa linha de pesquisa, em animais, na maioria das vezes, objetiva verificar o efeito protetor de antioxidantes, adicionados às amostras espermáticas, nos níveis de peroxidação lipídica induzida. Esses fatos tornam-se ainda mais complicados, pois a peroxidação lipídica em espermatozóides ocorre, principalmente, ao nível da membrana espermática e quando a peroxidação lipídica é induzida, as concentrações encontradas de TBARS dependem do número de células presentes na amostra (BECONI et al., 1991; O'FLAHERTY et al., 1997; SCHÖNECK et al., 1996, apud NICHI, 2003).

6.8 Variável: Atividade da Enzima Antioxidante Glutathiona Peroxidase (GPx)

Na tabela 8 estão apresentados os resultados da variável atividade da Enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx) encontrados no experimento.

Tabela 8 – Média, erro padrão da média (EPM) e teste de probabilidade da atividade da enzima antioxidante Glutathiona Peroxidase (GPx) (UI/mL),

dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

Variáveis	C/ Se	S/ Se	P
GPx	989,97± 126,05	1357,68± 159,21	0.0748
Diferenças estatísticas (p<0,05)			

Analisando-se os dados da tabela 8, verificou-se uma tendência estatística de diferença entre os grupos controle e selênio (p= 0.0748) em relação à variável concentração de Glutathione Peroxidase (GPx), com o grupo suplementado com selênio apresentando valores menores para esta enzima.

Encontrando-se em altas concentrações no testículo e espermatozóide, o selênio atua como componente da glutathione peroxidase destruindo peróxidos em nível de citosol, auxiliando a fertilidade de reprodutores (SILVA et al., 2003).

Sabe-se que as glutathionas peroxidases (GPx) são uma família de enzimas que podem ser divididas em dois grupos: as selênio-dependentes e as selênio independentes. De fato, sabe-se que o selênio tem papel importante na estrutura dos espermatozoides por estar associado à formulação da glutathione peroxidase. Os dados do efeito do selênio no sêmen de aves são extremamente limitados. A GPx foi encontrada no sêmen de aves (BREQUE et al., 2003). Há diferenças espécie-específicas na atividade e distribuição de GPx no sêmen de aves. Por exemplo, em plasma seminal de perus a atividade da glutathione peroxidase era mais elevada quando comparada com o pato e o ganso. Por outro lado, nos espermatozoides de ganso e pato, encontrou-se atividades de GPx mais elevadas em relação a galos, perus ou Guiné (DIMITROV et al., 2007). O selênio orgânico adicionado ou não da vitamina E estimula a atividade da GPx Selênio dependente no plasma seminal. As observações preliminares em galos revelaram a eficácia do

suplemento dietético com vitamina E, selênio orgânico ou ambos para sustentar a fertilidade.

A forma da GPx selênio dependente foi detectada em sêmen e plasma seminal de várias espécies aviárias sendo uma porcentagem de 77,7% em galos, 87,4% em guinés, 61,7% em perus e 82% em gansos (BREQUE et al., 2003).

A elevada atividade da GSH-Px no plasma seminal (SURAI et al., 1998, 2002) reflete seu maior protagonismo na metabolização da H_2O_2 .

Apesar da tendência estatística para um aumento no nível de GPx dos animais suplementados com selênio, não houve alteração significativa nos níveis de TBARS no sêmen desses animais. Halliwell e Gutteridge (1989), citam que a GPx é dependente da glutathiona reduzida (GSH) para agir como antioxidante, onde, através da GSH vai ocorrer a metabolização do H_2O_2 em reação catalisada pela GPx, com a produção de H_2O e glutathiona oxidada (GSSG), que pode voltar novamente a forma reduzida (GSH), pela glutathiona redutase que a utiliza para metabolizar o H_2O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Sendo assim, caso não haja a presença de GSH, ou mesmo que haja sua presença, porém o H_2O_2 não seja a ROS responsável pelos danos, a suplementação com SE aumentando os níveis de GPx pode não ser eficiente (BARROS, 2007).

6.9 Variável: Atividade da Enzima Catalase

No presente experimento não foi possível verificar a presença de catalase nas amostras de sêmen de perdizes em nenhuma das coletas. Para aves, não foi possível corroborar esses dados com a literatura por falta de informações, porém Bilodeau et al. (2000), verificaram que espermatozóides bovinos que foram selecionados por gradiente de Percoll, não produziram níveis detectáveis de catalase.

Por outro lado, existe uma linha de pesquisa que cita que a presença de catalase em sêmen humano pode estar associada à presença de neutrófilos por

contaminação da amostra, já que essas células possuem catalase (LENZI et al., 2000)

Espermatozóides humanos são especialmente vulneráveis à peroxidação lipídica, causada pelo H_2O_2 , devido às baixas concentrações endógenas de catalase e glutathione peroxidase. Na análise de amostras, utilizando o ensaio enzimático, encontrou-se sempre o teor de catalase como sendo zero, ou seja, ausência da molécula de enzima ou ausência de atividade da mesma, ou mesmo de substâncias que possuísem atividade enzimática semelhante a da catalase (AITKEN et al., 1992, apud NICHI, 2003).

Kawakami et al. (2007) citam que os níveis de atividade da catalase em plasma seminal de cães da raça Beagle normoespérmicos ($2,18 \pm 0,38$ units/g protein) foi maior que o encontrado em cães astenozoospermico ($0,48 \pm 0,11$ units/g protein).

6.10 CORRELAÇÕES

Na Tabela 9, estão descritos os resultados encontrados dos coeficientes de correlação:

Tabela 9 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis: número de animal por *pool* (ANIM), volume (VOL), número de espermatozóides por ejaculado (SPTZ), concentração (CONC), volume de espermatozóides por animal (VOL. P), motilidade (MOT), vigor (VIG), avaliação da integridade de membrana plasmática (E/N), integridade do acrossomo, integridade (POPE), avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx), concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), morfologia espermática: normais (NORM), cauda fortemente dobrada (CAUFD), peça intermediária fortemente dobrada (PIFD), cabeça fortemente dobrada (CABFD), cabeça enrolada (CABE), peça intermediária dobrada (PID), cauda dobrada (CAUD), cauda enrolada (CAUE), cauda fortemente enrolada (CAUFE), gota proximal (GOTP), todo enrolado (TODOE) e avaliação de integridade do DNA (COMETAI, II, III e IV). dos *pools* de sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) do grupo tratamento (suplementado com selênio) e o grupo controle (sem suplementação de selênio), criadas em cativeiro – Jaboticabal – 2007, 2008

	ANIM	VOL	SPTZ	CONC	VOL_P	MOT	VIG	E/N	POPE	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	GPx	TBARS	NORM	CAUFD	PIFD	CABFD	CABE	PID	CAUD	CAUE	CAUFE	GOTP	TODOE	COM I	COM II	COM III	COM IV
ANIM	1,0	0,27 (0,28)	-0,53 (0,02)	0,04 (0,87)	-0,90 (<.0001)	-0,23 (0,36)	-0,01 (0,98)	-0,27 (0,30)	0,01 (0,97)	0,37 (0,12)	0,39 (0,16)	0,01 (0,97)	-0,12 (0,64)	0,23 (0,35)	0,01 (0,96)	-0,10 (0,68)	-0,10 (0,71)	0,22 (0,37)	-0,40 (0,10)	-0,03 (0,90)	-0,04 (0,86)	0,45 (0,06)	-0,38 (0,186)	0,54 (0,021)	0,02 (0,92)	0,15 (0,560)	-0,10 (0,649)	0,16 (0,672)	0,10 (0,808)	-0,36 (0,339)
VOL	-	1,0	0,11 (0,65)	0,11 (0,66)	0,05 (0,83)	-0,08 (0,75)	-0,02 (0,94)	-0,56 (0,019)	0,07 (0,78)	0,02 (0,92)	-0,09 (0,73)	-0,03 (0,89)	0,11 (0,67)	-0,07 (0,77)	-0,20 (0,43)	-0,14 (0,58)	-0,12 (0,62)	0,32 (0,19)	0,12 (0,64)	-0,11 (0,67)	0,17 (0,50)	0,04 (0,87)	-0,47 (0,047)	0,47 (0,048)	-0,02 (0,92)	-0,01 (0,95)	-0,33 (0,389)	0,55 (0,125)	0,02 (0,958)	-0,39 (0,304)
SPTZ	-	-	1,0	0,62 (<.0001)	0,62 (0,006)	0,30 (0,23)	0,16 (0,52)	0,17 (0,51)	0,06 (0,82)	0,25 (0,31)	-0,13 (0,62)	-0,08 (0,74)	0,01 (0,97)	-0,25 (0,31)	-0,10 (0,68)	-0,03 (0,89)	0,09 (0,72)	0,01 (0,99)	0,08 (0,76)	-0,10 (0,70)	0,19 (0,44)	0,09 (0,72)	-0,29 (0,244)	0,07 (0,72)	0,35 (0,15)	-0,13 (0,60)	-0,34 (0,370)	0,04 (0,925)	-0,53 (0,176)	-0,38 (0,307)
CONC	-	-	-	1,0	0,08 (0,75)	0,31 (0,20)	0,30 (0,21)	0,26 (0,31)	-0,04 (0,85)	0,05 (0,84)	-0,02 (0,93)	0,01 (0,99)	0,03 (0,91)	-0,24 (0,32)	0,05 (0,84)	-0,20 (0,44)	-0,07 (0,79)	0,01 (0,98)	-0,30 (0,22)	-0,20 (0,42)	0,15 (0,55)	0,31 (0,20)	-0,55 (0,016)	0,42 (0,080)	0,40 (0,10)	-0,13 (0,61)	0,03 (0,946)	0,01 (0,987)	-0,52 (0,183)	-0,61 (0,787)
VOL_P	-	-	-	-	1,0	0,08 (0,73)	-0,11 (0,66)	-0,05 (0,84)	0,14 (0,59)	0,36 (0,14)	-0,30 (0,23)	-0,04 (0,88)	0,10 (0,68)	-0,22 (0,38)	-0,17 (0,51)	0,12 (0,62)	0,07 (0,77)	-0,01 (0,97)	0,45 (0,05)	0,02 (0,94)	0,19 (0,44)	-0,39 (0,10)	0,17 (0,48)	-0,31 (0,214)	-0,05 (-0,8)	-0,14 (0,123)	0,55 (0,123)	-0,04 (0,901)	-0,25 (0,550)	0,12 (0,762)
MOT	-	-	-	-	-	1,0	0,60 (0,008)	0,52 (0,03)	-0,10 (0,70)	0,06 (0,79)	-0,25 (0,30)	0,31 (0,20)	0,46 (0,06)	-0,34 (0,17)	0,22 (0,37)	0,20 (0,43)	-0,02 (0,94)	-0,28 (0,26)	-0,24 (0,34)	-0,50 (0,35)	0,24 (0,32)	-0,06 (0,80)	-0,31 (0,21)	-0,09 (0,71)	0,02 (0,92)	0,01 (0,95)	-0,18 (0,643)	0,19 (0,616)	-0,54 (0,898)	0,08 (0,835)
VIG	-	-	-	-	-	-	1,0	0,27 (0,30)	-0,48 (0,05)	0,57 (0,013)	-0,53 (0,022)	-0,07 (0,77)	0,13 (0,62)	-0,10 (0,70)	0,07 (0,78)	-0,07 (0,76)	0,06 (0,79)	-0,11 (0,64)	-0,49 (0,03)	-0,08 (0,74)	0,26 (0,29)	-0,20 (0,41)	0,03 (0,89)	0,14 (0,588)	0,06 (0,79)	-0,19 (0,45)	-0,37 (0,331)	0,57 (0,109)	-0,05 (0,904)	-0,46 (0,210)
E/N	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,21 (0,41)	0,04 (0,86)	-0,07 (0,80)	0,04 (0,86)	0,05 (0,83)	-0,27 (0,29)	0,15 (0,55)	-0,14 (0,58)	0,12 (0,63)	0,33 (0,19)	-0,8 (0,76)	0,19 (0,47)	0,08 (0,74)	0,79 (0,76)	0,34 (0,18)	-0,20 (0,444)	0,41 (0,10)	0,00 (1,0)	-0,14 (0,716)	-0,21 (0,585)	0,37 (0,369)	0,26 (0,494)
POPE	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,39 (0,12)	0,46 (0,06)	-0,05 (0,85)	0,01 (0,98)	0,14 (0,57)	-0,16 (0,53)	0,61 (0,01)	-0,48 (0,052)	-0,07 (0,79)	0,14 (0,58)	-0,52 (0,0)	-0,42 (0,09)	0,13 (0,60)	0,22 (0,38)	0,12 (0,641)	0,20 (0,43)	-0,03 (0,904)	0,48 (0,193)	-0,64 (0,063)	-0,55 (0,161)	-0,04 (0,908)
DAB I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,54 (0,02)	-0,63 (0,005)	-0,25 (0,33)	0,09 (0,72)	-0,24 (0,33)	-0,04 (0,86)	-0,01 (0,96)	-0,15 (0,55)	-0,01 (0,97)	0,26 (0,29)	0,44 (0,65)	-0,26 (0,30)	0,39 (0,11)	0,12 (0,635)	0,02 (0,92)	-0,47 (0,046)	0,17 (0,229)	0,44 (0,229)	0,25 (0,550)	0,40 (0,919)
DAB II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,15 (0,54)	-0,48 (0,05)	0,42 (0,08)	0,14 (0,57)	0,28 (0,26)	-0,41 (0,09)	0,28 (0,25)	0,05 (0,84)	-0,01 (0,98)	-0,32 (0,19)	0,45 (0,62)	-0,32 (0,18)	0,15 (0,547)	0,14 (0,71)	0,42 (0,084)	0,37 (0,323)	-0,54 (0,133)	0,39 (0,342)	0,31 (0,419)
DAB III)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,57 (0,016)	-0,43 (0,07)	0,31 (0,21)	-0,14 (0,58)	0,02 (0,92)	0,06 (0,81)	0,21 (0,39)	-0,19 (0,44)	-0,16 (0,53)	-0,24 (0,34)	-0,13 (0,613)	-0,54 (0,214)	0,09 (0,21)	0,32 (0,199)	-0,40 (0,282)	-0,03 (0,935)	-0,26 (0,526)	-0,26 (0,490)
DAB IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,30 (0,24)	-0,35 (0,16)	0,10 (0,699)	-0,27 (0,30)	0,14 (0,58)	-0,27 (0,71)	-0,09 (0,67)	-0,10 (0,67)	-0,39 (0,69)	-0,10 (0,119)	-0,18 (0,49)	0,13 (0,628)	0,12 (0,755)	-0,52 (0,147)	-0,74 (0,036)	0,13 (0,733)	
GPx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,30 (0,22)	0,59 (0,01)	-0,60 (0,009)	0,21 (0,39)	0,01 (0,96)	0,36 (0,13)	0,01 (0,98)	0,20 (0,43)	0,03 (0,904)	0,43 (0,076)	0,70 (0,78)	-0,21 (0,390)	0,19 (0,626)	0,46 (0,208)	0,68 (0,053)	0,43 (0,248)
TBARS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,09 (0,70)	-0,01 (0,983)	0,21 (0,39)	-0,2 (0,94)	0,04 (0,87)	-0,46 (0,86)	0,17 (0,48)	-0,04 (0,86)	-0,27 (0,273)	0,16 (0,64)	0,44 (0,064)	0,55 (0,126)	-0,29 (0,447)	0,36 (0,831)	-0,08 (0,831)
NORM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,77 (0,0002)	-0,03 (0,89)	0,07 (0,78)	-0,54 (0,02)	0,06 (0,79)	-0,17 (0,38)	0,15 (0,506)	-0,30 (0,549)	-0,23 (0,22)	-0,23 (0,358)	0,31 (0,418)	0,09 (0,807)	0,10 (0,803)	0,22 (0,566)
CAUFD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,22 (0,38)	-0,07 (0,77)	0,11 (0,66)	-0,15 (0,56)	-0,03 (0,90)	0,23 (0,35)	-0,57 (0,012)	-0,02 (0,92)	0,23 (0,358)	-0,30 (0,434)	-0,20 (0,603)	-0,28 (0,493)	0,09 (0,809)
PIFD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,22 (0,38)	0,29 (0,24)	0,30 (0,22)	-0,03 (0,90)	-0,08 (0,77)	0,26 (0,298)	-0,16 (0,51)	0,23 (0,355)	0,12 (0,766)	0,27 (0,478)	0,57 (0,138)	-0,54 (0,136)
CABFD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,20 (0,41)	0,11 (0,66)	0,05 (0,82)	0,08 (0,73)	-0,17 (0,506)	0,19 (0,45)	0,10 (0,686)	0,74 (0,022)	-0,44 (0,240)	-0,02 (0,958)	0,23 (0,556)
CABE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,07 (0,77)	-0,24 (0,33)	0,50 (0,032)	0,04 (0,867)	0,26 (0,28)	0,16 (0,517)	-0,03 (0,936)	0,10 (0,794)	0,56 (0,149)	0,28 (0,471)
PID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,24 (0,33)	-0,03 (0,918)	0,19 (0,441)	0,17 (0,50)	-0,26 (0,299)	-0,19 (0,622)	0,31 (0,414)	0,56 (0,144)	-0,05 (0,897)
CAUD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,52 (0,028)	0,41 (0,088)	0,40 (0,100)	0,30 (0,220)	0,45 (0,218)	-0,37 (0,319)	-0,40 (0,325)	0,07 (0,847)
CAUE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,46 (0,051)	0,21 (0,401)	-0,26 (0,299)	0,90 (0,817)	-0,02 (0,962)	0,71 (0,045)	0,13 (0,73)
CAUFE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,21 (0,401)	-0,26 (0,299)	-0,12 (0,749)	0,40 (0,288)	0,73 (0,864)	-0,43 (0,250)
GOTP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,11 (0,668)	0	0	0	0
TODOE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,14 (0,716)	-0,10 (0,786)	0,13 (0,762)	0,30 (0,447)
COM I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-0,62 (0,764)	0,73 (0,039)	0,22 (0,562)
COM II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,73 (0,039)	-0,29 (0,477)
COM III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,07 (0,864)
COM IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0

Como não houve efeito do tratamento com selênio sobre a maioria das variáveis, as correlações foram calculadas levando-se em conta todos os animais.

Algumas variáveis são complementares entre si ou calculadas a partir de outras, sendo as correlações entre elas apenas efeitos matemáticos. Assim, estas correlações serão ignoradas para efeito de discussão.

A correlação positiva encontrada entre GPx e a porcentagem de células com ausência completa de atividade mitocondrial (DAB IV; $R=0,77$, $p=0,0003$) não indicaria, o que primeiramente poderia se supor, que a GPx tem um efeito negativo sobre a atividade mitocondrial. A explicação mais plausível para esta correlação seria que a GPx aumentaria, em resposta a lesão de mitocôndria, visto que esta lesão levaria a liberação de fatores pró-oxidativos. Segundo Sharma e Agarwal (1996), a mitocôndria é a maior fonte de ROS no plasma seminal, sendo que esta produção é maior em espermatozóides imóveis, anormais e mortos (ENGEL et al., 1999). Um aumento da GPx em resposta a um maior produção de ROS foi verificado por Nichi et al. (2006), que observaram uma maior atividade da GPx em touros de origem européia criados em regiões tropicais, em que um maior índice de estresse oxidativo espontâneo foi também encontrado. Pacifi et al. (2003) verificaram que em ratos tratados com cocaína houve um aumento dos níveis de GPx, acompanhado por um aumento nos índices de estresse oxidativo. No presente experimento, não houve correlação entre a atividade da GPx e os níveis de TBARS. No entanto, é importante frisar que os níveis de TBARS encontrados no presente experimento não são fisiológicos e sim induzidos através do sistema ascorbato/sulfato de ferro, visando medir a resistência das células espermáticas ao estresse oxidativo.

Verificou-se, no presente experimento, uma correlação positiva entre a atividade da GPx e a porcentagem de células normais ($R=0,59$, $p=0,01$). Isto indicaria que esta enzima apresentaria um papel importante na proteção das células espermáticas contra danos estruturais. Isto poderia indicar que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), importante espécie reativa de oxigênio, apresentaria um

papel na lesão morfológica do espermatozóide em perdizes. Isto pode ser explicado visto que, com a ausência da catalase observada no presente experimento, a GPx seria o principal mecanismo de proteção contra os danos causados pelo H_2O_2 nestes animais. Como quanto menor a atividade da GPx, maior a porcentagem de células com defeitos morfológicos, pode-se presumir que esta ROS não seria eficientemente destruída e atuaria no aumento das lesões nas células espermáticas.

A atividade enzimática da GPx também correlacionou-se com a porcentagem de espermatozóides apresentando a cauda fortemente dobrada ($R=-0,06$, $p=0,009$). Isto pode indicar que uma maior atividade da GPx possa estar ocorrendo durante o trânsito do espermatozóide pelo epidídimo. Potts et al. (1999), verificou uma maior atividade enzimática em homens normais quando comparado com homens vasectomizados. Assim, segundo estes autores, o epidídimo contribui de forma significativa na proteção antioxidante verificada no plasma seminal.

Outra correlação encontrada envolvendo a atividade enzimática da GPx foi com a porcentagem de células com DNA fragmentado do tipo III (Cometa III; $R=0,68$, $p=0,053$). Da mesma forma que a porcentagem de células com mitocôndria completamente inativa, a GPx poderia estar aumentada visando proteger o DNA espermático do ataque das espécies reativas de oxigênio. Vários autores verificaram que as ROS são capazes de provocar danos no DNA espermático (TWIGG et al., 1998; BERTOLLA et al., 2006). Segundo Bertolla et al. (2006), os principais mecanismos que poderiam levar a um aumento na fragmentação do DNA espermático são: a apoptose e o estresse oxidativo. Twigg et al. (1998), verificaram que as ROS afetam o genoma espermático causando uma maior frequência de quebras de DNA de fita simples e dupla. Os autores afirmam que tanto o anion superóxido como o radical hidroxila possuem capacidade mutagênica, causando deleções cromossômicas e trocas de cromátides irmãs. Isto indicaria que este aumento na GPx não seria eficiente, visto

que estas espécies reativas de oxigênio não sofreriam o efeito desta enzima antioxidante.

A porcentagem de células com DNA fragmentado do tipo III (Cometa III) correlacionou-se também com a porcentagem de células com ausência total de atividade mitocondrial (DAB IV; $R=-0,74$, $p=0,035$). Esta correlação, por ser negativa, não era esperada visto que vários experimentos anteriores verificaram que lesões mitocondriais levam a danos de DNA espermático (BARROS, 2007). Uma possível explicação para esta correlação seria que a lesão de mitocôndria seria o primeiro evento ocorrido. Em resposta a esta lesão de mitocôndria, que liberaria fatores pró-oxidativos, haveria um aumento na atividade da GPx. Este aumento na GPx levaria, inicialmente, a uma proteção maior do DNA espermático. Esta proteção, no entanto, seria limitada, visto que os principais responsáveis por danos de DNA, são o ânion superóxido e o radical hidroxila, espécies reativas estas que não são eliminadas pela GPx.

6.11 Considerações finais

Em geral, o tratamento com selênio não apresentou efeito na qualidade espermática em perdizes. Um dos fatores que poderia estar relacionado a esta falta de efeito foi a utilização de *pools*. Várias variáveis apresentaram valores bastante diferentes entre os dois grupos (selênio e controle), no entanto sem diferenças estatisticamente significativas. Caso os testes fossem realizados animal por animal, provavelmente estas diferenças se mostrariam significativas. No entanto, seria impossível realizar todos os testes em um mesmo animal devido à insuficiência de amostra.

Resultados contraditórios têm sido obtidos por diversos autores em relação ao tratamento de infertilidade com selênio. Scott et al. (1998), suplementou homens com baixa motilidade espermática com a dose diária oral de 100 µg de

selênio, combinadas ou não com uma suplementação vitamínica (Vitaminas A, C e E), e comparou-os a um grupo suplementado com placebo. Os autores verificaram um aumento significativo na motilidade espermática dos grupos tratados em comparação ao grupo controle apenas quando os grupos tratados foram comparados conjuntamente com o grupo controle. Em experimento realizado por Keskes-Ammar et al. (1991), os autores verificaram uma melhora na qualidade espermática em homens inférteis tratados com uma combinação de selênio (225 µg) e vitamina E (400mg). Bleau et al. (1984) verificaram uma correlação significativa entre as concentrações seminais de selênio e a concentração espermática. Os autores verificaram uma motilidade espermática máxima com níveis seminais de selênio entre 50 e 69 ng/mL. Acima e abaixo desta faixa a motilidade era diminuída e a incidência de astenospermia era alta. Por outro lado, Iwanier e Zachara (1995), comparando o efeito da suplementação oral com selênio (200 µg) obtido de levedura (orgânico) ou o selenito (inorgânico) em homens subférteis, verificaram que o primeiro aumentou a concentração selênio em sangue e plasma seminal enquanto que o segundo não apresentou efeito. No entanto, corroborando com os resultados encontrados no presente experimento, nenhuma das formas de selênio apresentou efeito sobre a qualidade espermática. Da mesma forma Behne et al (1988), também não verificaram qualquer correlações entre as concentrações de selênio em plasma seminal e a concentração espermática, motilidade, viabilidade e morfologia. No presente experimento calcula-se uma média de consumo selênio girando em torno 296,9 e 354,0 µg/animal/dia, incluindo o selênio já presente no *premix*. Considerando-se as devidas proporções entre as espécies, pode-se inferir que estes valores são bastante consideráveis estando bastante acima dos utilizados pelos autores citados. No entanto, os níveis dos animais tratados ou não com selênio estão bastante próximos, o que poderia explicar a ausência de diferenças significativas no presente experimento, não explicando, porém, os resultados contraditórios encontrados nos trabalhos anteriores.

Uma forma de se explicar os resultados contraditórios encontrados na literatura para o tratamento com selênio seria que a eficiência de um tratamento antioxidante depende de dois fatores principais: da presença de um estresse capaz de sobrepujar os mecanismos antioxidantes locais e da quantidade de antioxidante utilizada no tratamento (Nichi, comunicação oral). Vários eventos fisiológicos são dependentes de um certo nível de estresse oxidativo (AITKEN et al., 1991; DE LAMIRANDE et al., 1993; DE LAMIRANDE et al., 1997). Assim, quando na ausência de um estresse e/ou quando um antioxidante é administrado em doses insuficientes ou excessivas, vários processos fisiológicos podem ser bloqueados. Além disto, segundo Taylor (2001), é necessário que a suplementação oral com antioxidantes cause o aumento dos seus níveis no órgão alvo. Assim, seria importante verificar se os níveis de selênio no trato reprodutivo das perdizes do presente experimento estariam aumentados após a suplementação oral. Além disto, seria importante verificar se as perdizes criadas em cativeiro realmente apresentam um estresse significativo que pudesse exercer efeitos negativos na qualidade espermática dos animais. Neste caso, a mensuração do TBARS espontâneo traria informações importantes sobre os possíveis níveis de estresse oxidativo a que estes animais estão submetidos. No entanto, devido à pequena quantidade de sêmen, não seria possível dosar os níveis espontâneos de TBARS pelas técnicas utilizadas no presente experimento.

Levando-se em conta os resultados do presente experimento pode se inferir que o tratamento com selênio, nas condições do presente experimento, não foi eficiente no aumento da atividade da enzima Glutathione Peroxidase, não melhorando a qualidade espermática dos perdizes criadas em cativeiro.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Levando-se em conta os resultados do presente experimento pode se inferir que o tratamento com selênio, nas condições do presente experimento, não foi eficiente para melhorar os parâmetros seminais, aumentar a resistência ao estresse oxidativo e aumentar a atividade da enzima Glutathione Peroxidase, das perdizes criadas em cativeiro.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 19-24, 1994.

AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, 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.; BUCKINGHAM, D. W.; HARKISS, D. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 441-450, 1993a.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparations techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 367-376, 1988.

AITKEN, R. J.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v. 16, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 302-315, 1993b.

AITKEN, R. J.; IRVINE, D.S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 164, p. 542-551, 1991.

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, p. 338-348, 1987.

AMANN, R. P. Can the fertility potential of seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v.10, p. 89-98, 1989.

ARAÚJO, L. L.; OLIVEIRA, K. G.; LIMA, J. S.; PANTOJA, P. S. P.; ARAÚJO, J. B.; DOMINGUES, S. F. S. Preservação de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37°C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17. 2007, Curitiba. **Anais eletrônicos...** Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <www.cbra.org.br/publicacoes.do>. Acesso em: 18 mar. 2008.

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P. ; HELLSTROM, W. J.; SIKKS, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 7/8, p. 869-880, 1999.

ARMSTRONG, J. S.; STEINAUER, K. K.; FRENCH, J.; KILLORAN, P. L.; WALLECZEK, J. KOCHANSKI, J.; KNOX, S. J. Bcl-2 inhibits apoptosis induced by mitochondrial uncoupling but does not prevent mitochondrial transmembrane depolarization. **Experimental Cell Research**, v. 262, n. 2, p. 170-179, 2001.

BAJPAI, P. K. The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. **Poultry Science**, v. 42, n. 1, p. 462-465, 1963.

BARBER, S. J.; PARKER, H. M.; McDANIEL, C. D. Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals in vitro. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 100-105, 2005.

BARBOSA, R. T.; ESPER, C. R. Avaliação e demonstração da atividade da citocromo c oxidase em espermatozóides bovinos. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, n. 3, v.13, p.218-223, 1997.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BEHNE, D.; GESSNER, H.; WOLTERS, G.; BROTHERTON, J. Selenium, rubidium and zinc in human semen and semen fractions. **International Journal of Andrology**, v. 11, p. 415-423, 1988

BELETTI, M. E.; SOARES, J. M. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozóides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p. 543-553, 2006.

- BENOV, L.; FRIDOVICH, I. Growth in iron-enriched medium partially compensates *E. coli* for the lack of Mn and Fe. **Journal of Biological Biochemistry**, v. 273, p. 10313-10316, 1988.
- BERTELSMANN, H.; BOLLWEIN, H.; SIEME, H.; ALBER, D.; KYRIAKOPOULOS, A.; BEHNE, D. Selenium contents in equine semen and semen fractions and their relations with chromatin integrity and foal birthing rate. **Animal Reproduction Science**. v. 89, n. 1-4, p. 212-215.
- BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P.; HASSUN FILHO, P. A.; LIMA, S. B.; ORTIZ, V.; SROUGI, M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 3, p. 625-628, 2006.
- BILGILI, F. F.; RENDEN, J. A.; SEXTON, K. J. The influence of staining techniques and examiners on evaluation of the morphology of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v. 64, n. 12, p. 2358-2361, 1985.
- BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.
- BLEAU, G.; LEMARBRE, J.; FAUCHER, G.; ROBERTS, K. D.; CHAPDELAINE, A. Semen selenium and human fertility. **Fertility and Sterility**, n. 42, p. 890-894, 1984.
- BONGALHARDO, D.C.; SOMNAPAN-KAKUDA, N.; BUHR, M.M. Isolation and Unique Composition of Purified Head Plasma Membrane from Rooster Sperm. **Poultry Science**, v. 81, p.1877-1883 2002
- BOTINO, F.; BARALDI-ARTONI, S. M.; CRUZ, C.; SIMÕES, K.; OLIVEIRA, D.; ORSI, A. M.; CARVALHO, A. C. F.; ROQUE, A.; FRANZO, V. S. Estudo morfométrico do testículo de perdiz no decorrer do ano. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO – CIBR. 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2003. RAS.04.12.
- BREQUE, C.; SURAI, P.; BRILLARD, J. P. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. **MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT**, v. 66, n. 3, p. 314-323, 2003.
- BULL, M. L. Anatomia do aparelho reprodutor do macho e da fêmea. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: APINCO, 1994. p. 1-10.
- BURROWS, W.H.; QUINN, J.P. A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. **Poultry Science**, v.14, n.4, p.251-254, 1935.

CARRER, C. C.; KORNFELD, M. E. **A criação de avestruzes no Brasil**. Rio Claro: Editora Ultra Copy, 1999. 304 p.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J. F.; SILVEIRA, N. A., FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho; **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.38, n.1, p. ____, 2002.

CAVALCANTE, A. K. S. **Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro**: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados. 2005. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CAVALCANTE, T. V.; ESPER, C. R.; FERREIRA, J. L.; DIAS, F. E. F.; AZEVEDO, H.C.; CORDEIRO, M. F.; SOUZA, J. A. T. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós descongelação de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e primavera. **Archives of Veterinary Science** v. 10, n. 2, p. 89-93, 2005.

CELEGHINI, E. C.; ARRUDA, R. P.; de ANDRADE A. F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**.,v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E. C. C. **Avaliação do método de seleção de galos (*Gallus gallus domesticus*) para a reprodução pelo desenvolvimento da crista com relação à idade à puberdade, características seminais e testiculares**. 2000. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

CESÁRIO, M. D. Gametogênese e histologia dos aparelhos reprodutores. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: 1994. APINCO, p.13-30.

CHAUDIERE, J.; WILHELMSSEN, E. C.; TAPPEL, A. L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acid and other mercaptans. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 259, p. 1043-1050, 1984.

CLARKE, R. N.; BAKST, M. R.; OTTINGER, M. A. Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. **Poultry Science**, v. 63, n. 4, p. 801-805, 1984.

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

DEEMING, D. C. **The ostrich: biology, production and health**. New York: CABI Publishing, 1999. 358 p.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate (ATP) plays an important role in inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379-386, 1992.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p. 48-54, 1997.

DE MARTINO, C.; FLORIDI, A.; MARCANTE, M.L.; MALORNI, W.; SCORZA BARCELLONA, P.; BELLOCCI, M.; SILVESTRINI, B. Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. **Cell and Tissue Research**, v.196, n. 1, p. 1-22, 1979.

DIMITROV, S. G.; ATANASOV, V. K.; SURAI, P. F.; DENEV, S. A. Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. **Animal Reproduction Science**. v. 100, n. 3-4, p. 311-317, 2007.

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

DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 29, p. 443-445, 1972.

DUTY, S. M.; SINGH, N. P.; RYAN, L.; CHEN, Z.; LEWIS, C.; HUANG, T.; HAUSER, R. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. **Human Reproduction**, v.17, n. 5, p. 1274-1280, 2002.

EDDY, E. M. The spermatozoa. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **Physiology of reproduction**. New York, 276 p, 1988.

ENGEL, S.; SCHREINER, T; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v. 31, n.1, p. 17-22, 1999.

ETCHES, R. J. Inseminação artificial. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: APINCO, 1994. p.117-127.

ETCHES, R. J. **Reproduction in poultry**. Cambridge: University Press, 1996p. 318.

EVENSON, D. P.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay: DANN denaturability. **Methods in Cell Biology**, v. 42, p. 159-175, 1994.

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

FRANÇOIS, N.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M. Place preferences of Japanese quail given a permanent choice between a social or a non-social but enriched situation. **Behavioural Processes**, v. 43, p. 163-170, 1998.

GÓES, P. A. A. **Características reprodutivas de emas (*Rhea americana*) criadas em cativeiro no estado de São Paulo**. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GÓES, P. A. A.; CAVALCANTE, A. K. S.; HATAMOTO, L. K.; ALMEIDA, M. A.; MANTOVANI, A. P.; NICHI, M.; BARNABE, V. H. Utilização de técnicas de coloração para identificação da morfologia acrossomal em espermatozoides de emas (*Rhea americana*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Porto Seguro, v. 27, p. 386-387, 2003.

GRECO, E.; ROMANO, S.; IACOBELLI, M.; FERRERO, S.; BARONI, E.; MINASI, M. G.; UBALDI, F.; RIENZI, L.; TESARIK, J. ICSI em casos de danos esperma DNA: efeito benéfico do tratamento oral antioxidante. **Reprodução Humana**, v. 9, n. 20, p. 2590-2594, 2005.

GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. **International Journal of Andrology**, v. 17, p. 225-231, 1994.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004 p. 237-257. 2004.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p.14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Claredon Press, 1989. p. 543.

HATAMOTO, L. K.; BAPTISTA SOBRINHO, C. A.; NICHI, M. ; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, p. 1610-1614, 2006.

- HEMBERGER, M. Y.; HOPES, R.; BOSTEDT, H. Semen collection, examination and spermiogram in ostriches. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 36, p. 241-243, 2001.
- HICKS-ALLDREDGE, K. D. Ratite reproduction. In: TULLY, T. N.; SHANE, S. M. **Ratite – management, medicine and surgery**. Malabar: Krieger Publishing Company, 1996. 188 p.
- HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 6, p. 809-828, 1987.
- IWANIER, K.; ZACHARA, B.A. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoal quality characteristics in subfertile men. **J Androl.**, v. 16, n. 5, p. 441-447, 1995.
- IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 409-416, 1992.
- JANERO, D. J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 9, p. 515-540, 1990.
- JEULIN, C.; SOUFIR, J. C.; WEBER, P. ; LAVAL-MARTIN, D.; CALVAYRAC, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, v. 24, p. 185-196, 1989.
- JIMENEZ II, M.; JIMÉNEZ, M. G. **La martineta colorada, *Rhynchotus rufescens***. Disponível em: <<http://www.damisela.com/zoo/ave/ratities/tinam/rufescens/taxa.htm>>. Acesso em: 11 ago. 2007.
- JOHNSON, A. L. Reproduction in the male. In: STURKIE, P. D. (Ed.). **Avian Physiology**. 4. ed. New York: Springer - Verlag, 1986. p. 432- 451.
- KATO, M.; FUKUNISHI, K.; IKEGAWA, S.; HIGUCHI, H.; SATO, M.; HORIMOTO, M.; ITO, S. Overview of studies on rat sperm motion analysis using a Hamilton-Thorne Sperm Analyzer--collaborative working study. **Journal of Toxicology Science**. v. 26, n. 5, p. 285-297, 2001.
- KAUR, R.; PARSHAD, V. R. Effects of dietary selenium on differentiation, morphology and functions of spermatozoa of the house rat (*Rattus rattus*). **Mutation Research**. v. 309, n. 1, p. 29-35. 1994.

KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; TAKANO, M.; HIRANO, T.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic beagles. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 69, n. 2, p. 133-136, 2007.

KESKES-ARMMAR, L.; FEKI-CHAKROUN, N.; REBAI, T.; SAHNOUN, Z.; GHOZZI, H.; HAMMAMI, S.; ZGHAL, K.; FKI, H.; DAMAK, J.; BAHLOUL, A. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. **Archives of Andrology**, v. 49, n. 2, p. 83-94, 2003.

KESSOPOULOU, E.; POWERS, H. J.; SHARMA, K. K.; PEARSON, M. J.; RUSSELL, J. M.; COOKE, I. D.; BARRATT, C. L. A double-blind randomized placebo cross-over controlled 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.

KYRIAKOPOULOS, A.; BEHNE, D. Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 145, n. 1, p. 46, 2002.

LASSO, J. L.; NOILES, E. E.; ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 3, p. 255-265, 1994.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 5, p. 1-15, 2000.

LI, W.; JIANG, Y.; RAJPURKAR, A.; TEFILLI, M. V.; DUNBAR, J. C.; DHABUWALA, C. B. Lipid peroxidation and antioxidant activities in rat testis after chronic cocaine administration. **Urology**, v. 54, n. 5, p. 925-928, 1999.

LLEDÍAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 10630-10637, 1998.

LONG, J. A.; WILDT, D. E.; WOLFE, B. A.; CRITSER, J. K.; DEROSI, R. V.; HOWARD, J. G. Sperm capacitation and acrossome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 638-646, 1996.

LUKEFAHR, S. D.; HOHENBOKEN, W. Characteristics of spermatozoa midpiece length and its relationship with economically important traits incattle. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 508-512, 1981.

LUNEC, J. Oxygen radicals: their measurement *in vivo*. **Analytical Proceedings**, v. 26, p. 130-131, 1989.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALEZ, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1994.

MAEDA, T.; TERADA, T.; TSUTSUMI, Y. Studies of the factors causing abnormal acrosomes and crooked-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing. **British Poultry Science**, v. 27, n. 4, p. 695-702, 1986.

MCCOY, K. E.; WESWIG, P.H. Some selenium response in the rat not related to Vitamin E. **Journal of Nutrition**, v. 98, p.383–389, 1969

MALECKI, A. I.; MARTIN, G. B.; LINDSAY, D. R. Semen production by the Emu (*Dromaius novaehollandiae*). 1. Methods for collection of semen. **Poultry Science**, v. 76, p. 615-621, 1997a.

MALECKI, A. I.; MARTIN, G. B.; LINDSAY, D. R. Semen production by the Emu (*Dromaius novaehollandiae*). 2. Effect of collection frequency on the production of semen and spermatozoa. **Poultry Science**, v. 76, p. 622-626, 1997b.

MARTÍNEZ, F. A.; GAUNA AÑASCO, L.; TROIANO, J. C.; NUÑEZ, S.; RIGONATTO, T.; DUCHENE, A.; JUEGA SICARDI, J.; STANCATO, J. M. **Tinamiformes del nordeste argentino: estado actual**. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 2000. Disponível em: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/4_veterinarias/v_pdf/v_039.pdf>. Acesso em: 11 Ago. 2002.

MARTINS, M. I. M. Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo espermatozoides obtidos de epidídimo de cães e gatos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. **Anais eletrônicos...** Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <www.cbra.org.br/publicacoes.do>. Acesso em: 18 mar. 2008.

MAZZILLI, F.; ROSSI, T.; MARCHESINI, M.; RONCONI, C.; DONDERO, F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. **Fertility and Sterility**, v. 62, p. 862-868, 1994.

MENNELLA, M. R.; JONES, R. Properties os spermatozoal superoxide dismutase and lack of involment of superoxide in metal-ion-catalysed lipid peroxidation and reactions in semen. **Biochemical Journal**, v. 191, p. 289-297, 1980.

MORO, M. E. G; TAVARES, F. A.; LIMA, C. G. Desempenho produtivo da perdiz (*Rhynchotus rufescens*) submetida a rações com diferentes níveis energéticos. **Revista Brasileira de Ciências Avícola.**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2000.

MORO, M. E. G.; TAVARES, F. A.; LIMA, C. G. Desempenho reprodutivo da perdiz (*Rhynchotus rufescens*) submetida a diferentes níveis energéticos na

ração. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. Disponível em: <http://www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagesbz/Peq/PEQ029.htm>. Acesso em: 11 ago. 2002.

MOSTAFA, T.; ANIS, T. H.; EL-NASHAR, A.; IMAN, H.; OTHMAN, I. A. Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. **International Journal of Andrology**, v. 24, p. 261-265, 2001.

NAGAO, J. F.; MARTINS, M. I. M.; PADILHA, L. C.; SAVI, P. A. P. Características morfo-funcionais de espermatozoides canino mantidos em containers para transporte refrigerado de sêmen, utilizando o diluente "Botu-Sêmen®". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. **Anais eletrônicos...** Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: www.cbra.org.br/publicacoes.do. Acesso em: 18 mar. 2008.

NAKAGE, E. S.; CARDOZO, J. P.; PEREIRA, G. T.; QUEIROZ, S. A.; BOLELI, I. C. Efeito da forma física da ração sobre a porosidade, espessura da casca, perda de água e eclodibilidade em ovos de perdiz (*Rhynchotus rufescens*) **Revista Brasileira de Ciências Avícola.**, v. 4, n. 3, p.15-23, 2002.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, M.S.** 2003. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J. ; ZUGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006.

NORBERG, J.; ÁRNER, E. S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine.**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PACIFICI, R.; FIASCHI, A. I.; MICHELI, L.; CENTINI, F.; GIORGI, G.; ZUCCARO, P.; PICHINI, S.; DI CARLO, S.; BACOSI, A.; CERRETANI, D. Immunosuppression and oxidative stress induced by acute and chronic exposure to cocaine in rat. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 4, p. 581-592, 2003.

PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; CROMBERG, V. U. Ambiência na produção de bovinos de corte a pasto. **ANUALPEC**, p. 68-73, 2001.

PARKS J. E.; HAMMERSTEDT, R.H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology and Reproduction.**, v. 32, p. 653-68, 1985.

PASQUALOTTO, F. F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia.**, v. 29, n. 2, 2007.

PASQUALOTTO, F. F.; PASQUALOTTO, E. B.; UMEZU F. M.; SALVADOR, M. Atividades da superóxido-dismutase e catalase no sêmen de homens férteis e inférteis. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 50, n. 2, p. 130-134, 2006.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; KOBAYASHI, H.; NELSON, D. R.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 2, p. 316-322, 2001.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS JR., 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.

PAZ; R. C. R.; TEIXEIRA; R. H. F.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Avaliação das características seminais de macacos pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, antes e após vasectomia bilateral, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n. 4, p. 561-567, 2006.

PEIXOTO, J. E. I.; TISCHER, M. C. Avaliação do desempenho reprodutivo de Perdiz (*Rhynchotus rufescens*) em Zoológicos brasileiros durante o período 1991/2001. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE PAULISTA DOS ZOOLOGÍCOS, 14., 2005, Leme, São Paulo. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://www.spzoo.org.br/0205.htm>>. Acesso em: 18 mar. 08.

PÉREZ, W. Q.; SÁNCHEZ, L. M.; CURBELO, A. J. M.; JANER, N. L.; MIRANDA, E. C.; BENÍTEZ, G. M.; OLIVEROS, S. Y. Efecto Del estrés oxidativo sobre la calidad Del sêmen de pacientes infértiles com leucocitospermia. **Revista Cubana Invest. Biomedicina**, v. 19, n. 3, p. 183-85. 2000.

PHILLIPS, D. M.; ASA, C. S. Development of spermatozoa in the Rhea. **The Anatomical Record**, v. 223, p. 276-282, 1989.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSES, B. L. A. Simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

POTTS, R. J.; JEFFERIES, T. M. Antioxidant capacity of the epididymis. **Human Reproduction**, v. 14, n. 10, p. 2513-2516, 1999

PUKAZHENTHI, B. S.; PELICAN, K.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrossomal damage. **Biology and Reproduction**, v. 61, p. 135-141, 1999.

QUEIROZ, C. F.; SOLANO, R. F.; SOLANO, O. G.; BEZERRA, J. M. D.; ROLIM FILHO, S. T.; SIMÕES, A. R.; BOLIVAR, M. J. L. Influência da distância entre o nível de nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen ovino durante o processo de congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. **Anais eletrônicos...** Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <www.cbra.org.br/publicacoes.do>. Acesso em: 18 mar. 2008.

RAHEJA, K. L.; BURNSIDE, E. B.; SCHAEFFER, L. R. Heifer fertility and its relationship with cow fertility and production traits in Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science.**, v. 72, n. 10, p. 2665-2669, 1989.

REVIERS, M. L'insemination artificielle em aviculture. **Elevege Insemination**, v. 184, p. 3-8, 1981.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. Techniques in free radical research. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 260, 1991.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p.307-317, 2007.

SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G. C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1061-1067, 2002.

SAS. THE STATISTICAL ANALYZE SYSTEMS FOR WINDOWS Versão 8. Cary: SAS. 1999-2001.

SCOTT, R.; MACPHERSON, A.; YATES, R. W.; HUSSAIN, B.; DIXON, J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. **British Journal of Urology**, v. 82, n. 1, p. 76-80, 1998.

- SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.
- SHARMA, R. K.; PASQUALOTTO, F. F.; NELSON, D. R.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. The reactive oxygen species – total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, v. 14, n. 11, p. 2801-2807, 1999.
- SHEKARRIZ, M.; SHARMA, R. K.; THOMAS, JR., A. J.; AGARWAL, A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species in semen. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 12, p. 70-74, 1995a.
- SHEKARRIZ, M.; THOMAS, JR., A. J.; AGARWAL, A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. **Urology**, v. 45, p. 130-107, 1995b.
- SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 912.
- SIDHU, R. S.; SHARMA, R. K.; THOMAS, JR., A. J.; AGARWAL, A. Relationship between creatinine kinase activity and semen characteristics in sub-fertile men. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 43, p. 192-197, 1998.
- SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86, 1996.
- SILVA, J. R. Recolha e avaliação de ejaculados de garanhão em condições de campo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, n. 559-560 p. 305-309, 2006.
- SILVA, L. A.; SILVA, R. R.; ZAUKE, N. H. F.; DIONELLO, N. J.; POPOSKI, M.; ROVATTI, E.; ZIGUER, E.A.; RUTZ, F. Características seminais qualitativas em galos recebendo dietas contendo selênio inorgânico suplementado ou não com orgânico. In: XII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 12., 2003, Pelotas. **Anais eletrônicos...** Rio Grande do Sul: CIC, 2003. Disponível em: < http://www.ufpel.edu.br/cic/2003/relatorios/indice_CA.html >. Acesso em: 18 mar. 2008.
- SILVA, P. M. C.; COSTA, A. N.; REIS, J. C.; GUERRA, M. M. P. Efeito de diluente e de tempo de armazenamento sobre características qualitativas do sêmen de perus (*Melleagris gallopavo*, L.) mantidos em gaiolas. **Ciência Veterinária Tropical**, v. 5, n. 2/ 3, p. 107-120, 2002.

- SINHA, M. P.; SINHA, A. K.; SINGH, B. K.; PRASAD, R. L. The effect of glutathione on the motility enzyme leakage and fertility of frozen goat sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.
- SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 283-293, 1984.
- SOARES, J. M.; BELETTI, M. E. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozóides de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) através de microscopia eletrônica de transmissão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 554-560, 2006.
- SOLANO, G. O.; SOLANO, R. F.; BEZERRA, J. M. D.; ROLIM FILHO, S. T.; RODRIGUES, B. L. F. Efeito do tempo de estabilização sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino criopreservado com tris-glicerina-gema. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. **Anais eletrônicos...** Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <www.cbra.org.br/publicacoes.do>. Acesso em: 18 mar. 2008.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro: 1996. 881 p.
- SULEIMAN, S. A.; ALI, M. E.; ZAKI, Z. M.; MALIK, E. M.; 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.; BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; CHALAH, T.; BRILLARD, J. P.; WISHART, G. J.; CEROLINI, S.; SPARKS, N. H. C. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 527-533, 1998. Pt B.
- SURAI, P. F. **Natura antioxidants in avian nutrition and reproduction**. Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 615.
- SURAI, P. F.; BRILLARD, J. P.; SPEAKE, B. K.; BLESBOIS, E.; SEIGNEURIN, F.; SPARKS, N. H. C. Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1025-1039, 2000.
- TAVIAN, F. A. **Descrição dos achados seminais de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) tratadas com vitamina E e selênio**. 2005. 24 f. Relatório (Iniciação científica em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.
- TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygens species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 189-198, 2001.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, **The clinical utility of sperm DNA integrity testing Fertility and Sterility**. v. 86, n. 5, s. 1, p. s35-s37, 2006.

TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, A. S.; AITKEN, E. J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 1429-1436, 1998

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHE, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, n. 5432, p. 1393-1396, 1999.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007. Disponível em: < www.cbra.org.br>. Acesso em: 03 set. 2007.

VALLE, R.R. **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagüi-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*)**. 2007. 169 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R.; DUARTE, J. A. R. Apoptose e exercício físico: efeitos sobre o músculo esquelético. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 10, n. 1, p. 100-105, 2008.

WOLFF, H. The biological significance of white blood cells in semen. **Fertility and Sterility**, v. 63, p. 1143-1157, 1995.

WOOLLEY, D. M. Striations in the peripheral fibers of rat and mouse spermatozoa. **Journal of Cell Biology**, v. 49, n. 3, p. 936-939, 1971.

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.

ANEXO

ANEXO A

Fórmula da ração utilizada no experimento segundo Nakage et al. (2002):

IGREDIENTES	
Milho	68,530%
Farelo de soja	20,105%
Calcário	5,440%
Fosfato bicálcico	1,774%
Sal comum	0,400%
Suplemento mineral e vitamínico	
Vit. A	3500000UI
Vit. D	700000UI
Vit. E	2500mg
Vit. K3	670mg
Vit. B12	6000mg
Vit. B2	1500mg
Pantotenato de Ca	2500mg
Niacina	6000mg
Antioxidante	20g
Fe	15000mg
Cu	12000mg
Mn	35000mg
Zn	30000mg
I	600mg
Se	70mg
DL-metionina	0,09%
Inerte	3,16%